

Ângela Filipa Sampaio Oliveira

Veiculação de fitoquímicos com atividade antitumoral em sistemas nanoestruturados

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Ângela Filipa Sampaio Oliveira

Veiculação de fitoquímicos com atividade antitumoral em sistemas nanoestruturados

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Veiculação de fitoquímicos com atividade antitumoral em sistemas nanoestruturados

Ângela Filipa Sampaio Oliveira

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

A nanotecnologia e a fitoterapia são áreas promissoras e em grande expansão. Estas áreas têm sido cada vez mais exploradas para obtenção de resultados na área da saúde.

Nos últimos anos, o cancro tem sido uma das patologias mais investigadas no que diz respeito à saúde, tentando-se desenvolver sistemas de veiculação de compostos bioativos mais eficazes e seguros. A quercetina é um fitoterápicos com efeitos promissores na área oncológica em virtude da sua atividade antitumoral.

A presente dissertação tem como objetivo explorar as vantagens e desvantagens da aplicação de várianossistemas na encapsulação da quercetina: nanopartículas proteicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanocristais, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de ouro. Foram descritos vários ensaios, *in vitro* e *in vivo*, que comprovam tanto a eficácia da quercetina como dos nanossistemas e as suas vantagens no tratamento do cancro. Adicionalmente, explorou-se a possível toxicidade destes nanossistemas.

Palavras-Chave: atividade antitumoral, fitoquímicos, quercetina, nanossistemas, toxicidade, local alvo.

Abstract

Nanotechnology and phytotherapy are promising and expanding areas. These areas have been increasingly exploited to achieve health outcomes.

In the last few years, cancer has been one of the pathologies more investigated in health, trying to develop delivery systems of bioactive compounds safer and more effective. Quercetin is a phytochemical with promising effects in the oncological area because of its antitumor activity.

The present dissertation aims to explore the advantages and disadvantages of the application of several nanosystems in quercetin encapsulation: proteic nanoparticles, polymeric nanoparticles, lipid nanoparticles, liposomes, micelles, nanoemulsions, nanocrystals, cyclodextrins, dendrimers, magnetic nanoparticles and gold nanoparticles. Several *in vitro* and *in vivo* assays have been described and they have proved both the action of quercetin and nanosystems and their advantages in the treatment of cancer. Additionally, the possibility of toxicity of these nanosystems was explored.

Keywords: antitumor activity, phytochemicals, quercetin, nanosystems, toxicity, target

Agradecimentos

À Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Um especial e grande obrigada à Professora Doutora Carla Martins Lopes, pela incansável e gigante ajuda e interesse, porque sem o seu apoio não teria sido possível.

Aos meus pais, porque sempre me ensinaram que nada se conquista sem trabalho, e por me instruírem a lutar pelos meus sonhos. Por sempre estarem do meu lado, agradeço pelo empenho, pela compressão nas ausências, e por tornarem possível e por tudo aquilo que não consigo colocar em palavras.

À minha irmã companheira de todas as horas.

À minha avó pelo exemplo de coragem que sempre foi, pelo carinho, apoio, e por me tornar uma pessoa melhor.

Aos meus tios e primos por estarem incansavelmente presentes.

Ao meu namorado por sempre ter sido um ouvinte atento das inquietações, desânimos e sucessos. Pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelo amor.

À amiga Carla Pinto, companheira de casa, por todas as horas que partilhamos, pelos momentos de interajuda e de compreensão, por todas as aventuras e pela presença nos bons e nos maus momentos durante estes 5 anos.

Aos amigos, Andreia, Isabel, Lara, Tiago, Daniela, Sara, Cecília e Mara por sempre me incentivarem e por estarem constantemente por perto em todas as conquistas.

Aos amigos da faculdade que são para sempre, Ana Barros, Gerson Pinheiro, Micaela Rocha, Anabela Macedo e André Pinto por terem tornado este percurso académico muito mais divertido e por todos os bons momentos que proporcionaram.

Aos que já não estão cá, mas ainda assim, fazem parte de mim.

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Índice de Figuras	viii
Índice de tabelas	ix
1. Introdução.....	1
2. Nanossistemas para veiculação da quercetina	9
2.1. Nanopartículas proteicas	9
2.1.1. Estudos in vitro.....	10
2.1.2. Estudos in vivo	12
2.2. Nanopartículas poliméricas.....	12
2.2.1. Estudos in vitro.....	13
2.2.2. Estudos in vivo	14
2.3. Nanopartículas lipídicas.....	16
2.3.1. Estudos in vitro.....	18
2.3.2. Estudos in vivo	19
2.4. Lipossomas	20
2.4.1. Estudos in vitro.....	21
2.4.2. Estudos in vivo	22
2.5. Micelas.....	23
2.5.1. Estudos in vitro.....	23

2.5.2. Estudos in vivo	24
2.6. Nanoemulsões	25
2.6.1. Estudos in vitro	25
2.7. Nanocristais	26
2.7.1. Estudos in vitro	27
2.8. Ciclodextrinas	27
2.8.1. Estudos in vitro	28
2.8.2. Estudos in vivo	29
2.9. Nanopartículas inorgânicas	30
2.9.1. Nanopartículas magnéticas	30
2.9.1.1. Estudos in vitro	30
2.9.1.2. Estudos in vivo	31
2.9.2. Nanopartículas de ouro	31
2.9.2.1. Estudos in vivo	32
3. Toxicidade	33
4. Conclusão	35
5. Bibliografia	36

Lista de abreviaturas:

AuNPs: Nanopartículas de Ouro;

- BSA:** Albumina de Soro Bovino, do inglês *Bovine Serum Albumine*;
- HPH:** Homogeneização de Alta Pressão do inglês *High Pressure Homogenizer*;
- IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
- LUV:** Vesículas Unilamelares Grandes, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*;
- MDCK:** Células Madin–Darby do rim canino, do inglês *Madin–Darby Canine Kidney*;
- MLV:** Vesículas Multilamelares, do inglês *Multilamellar Vesicles*;
- MNPs:** Nanopartículas Magnéticas, do inglês *Magnetic Nanoparticles*;
- MPEG:** Metoxi-polietilenoglicol, do inglês *Methoxy Poly(ethylene glycol)*;
- MQC:** Nanopartículas Magnéticas de Quercetina com Copolímero;
- NLC:** Vetores Lipídicos Nanoestruturados, do inglês *Nanostructured Lipid Nanoparticle*;
- PBS:** Tampão Fosfato-Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*;
- PCL:** Poli(ϵ -caprolactona), do inglês *Poli(ϵ -Caprolactone)*;
- PEG-PBA-PEG:** Polietilenoglicol-Polibutadieno-Polietilenoglicol;
- PLA:** Ácido Poliláctico do inglês *Poly (Lactic Acid)*;
- PLGA:** Ácido Poliláctico-co-glicólico, do inglês *Poly (lactic-co-glycolic acid)*;
- TGPS:** Succinato de d- α -Tocoferol Polietileno Glicol 1000, do inglês *d- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 succinate*;
- QC12:** Pró-fármaco de Quercetina-Carbamato de Glicina solúvel em água, do inglês *Glycine Carbamate Prodrug of Quercetin*;
- Cys-CdTe QDs:** Complexo de Ciclodextrina e *Quantum Dots* com Cistamina;
- Q-NL:** Nanolipossomas contendo Quercetina;
- Q-NLC:** Quercetina em GeluPearl-NLC;

QPN: Quercetina encapsulada em Nanopartículas de PLGA;

QPTN: Quercetina encapsulada em Nanopartículas de PLGA-TGPS;

Q-SLN: Quercetina em GeluPearl-SLN;

QU-E: Quercetina com o ácido glutâmico;

ROS: Espécies de Oxigênio Reativas, do inglês *Reactive Oxygen Species*;

SOD: Superóxido Dismutase, do inglês *Superoxide Dismutase*;

SLN: Nanopartículas de Lípidos Sólidos, do inglês *Solid Lipid Nanoparticle*;

SRE: Sistema Reticuloendotelial, do inglês *Reticulo-Endothelial System*;

SUV: Vesículas Unilamelares Pequenas, do inglês *Small Unilamellar Vesicles*;

UVB: Raios Ultravioleta B, do inglês *Ultraviolet B radiation*.

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da molécula da quercetina.	3
Figura 2: Mecanismos de ação da quercetina.....	7
Figura 3: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	13
Figura 4: Representação esquemática das nanopartículas lipídicas: (1) SLN; (2) NLC	17
Figura 5: Representação esquemática dos tipos de lipossomas mais utilizados	21
Figura 6: Tipos de ciclodextrinas	27

Índice de tabelas

Tabela 1: Atividades da quercetina e estudos realizados.	4
Tabela 2: Solubilidade, estabilidade e permeabilidade da quercetina, QC12 e (QU-E).	11
Tabela 3: Volume tumoral (mm ³) a uma concentração de quercetina de 50mg/kg.	29
Tabela 4: Efeitos da toxicidade das nanopartículas.....	33

1. Introdução

O cancro é uma das doenças que mais afeta a população a nível mundial, sendo incontestável, a contínua necessidade de intervenção e investigação nesta área (Siegel *et al.*, 2017).

Na medicina tradicional, os fitoquímicos são muito utilizados. Desta forma, nos últimos anos tem-se assistido a uma investigação intensiva sobre a atividade destes fitoquímicos, avaliando possíveis estratégias para os incluir na medicina moderna (Zubair *et al.*, 2017).

Os fitoquímicos são compostos que se encontram facilmente nas plantas comestíveis, na fruta, nos vegetais e nos grãos (Liu, 2003). Estes compostos são extraídos, maioritariamente, das plantas devido à sua fácil obtenção na natureza. Por este mesmo motivo, são considerados compostos económicos.

Alguns estudos demonstram que os fitoquímicos derivados de fontes alimentares são, geralmente, considerados seguros e benéficos (Chien *et al.*, 2009; Gescher *et al.*, 1998; Gibellini *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2014; Vijayababu *et al.*, 2006; Wang, 2012; Wei *et al.*, 1994). Quando usados em concentrações benéficas, podem demonstrar baixa ou nula toxicidade para os humanos. É de notar que estes estudos têm comprovado que estas substâncias têm eficácia quer no tratamento, quer na prevenção de diversos tipos de cancro.

Este efeito promissor dos fitoquímicos na área oncológica justifica-se em virtude das propriedades anticancerígenas naturais destes compostos, nomeadamente anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora e especificidade para múltiplos processos cancerígenos (e.g. remoção de radicais livres de oxigénio, inibição de enzimas que ativam a carcinogénese, interação com retores de estrogénio, síntese de ácidos gordos, interação com o ciclo celular) (Nathiya, Durga and Devasena, 2014).

No entanto, os fitoquímicos apresentam também várias limitações associadas, entre as quais se podem citar: baixa solubilidade em meio aquoso; reduzida absorção a nível intestinal; problemas de estabilidade; elevado peso molecular que dificulta a permeação nas células; rápida eliminação; elevada taxa de metabolização, originando produtos metabólicos inativos. Todas estas características resultam em problemas de

biodisponibilidade oral, a qual é geralmente muito baixa, comprometendo a eficácia dos fitoquímicos em meio fisiológico (Anand *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2016).

Tal como acontece para a maioria das substâncias, a via de administração de eleição para os fitoquímicos é a oral, representando a via de entrada mais fisiológica, barata e cómoda. Desta forma, possibilita que os doentes apresentem autonomia no tratamento. Uma revisão da literatura permite concluir relativamente à intensa investigação na procura de estratégias alternativas que visam aumentar a biodisponibilidade oral, quer de fármacos, quer dos fitoquímicos. Uma das técnicas utilizadas para ultrapassar algumas destas limitações é a encapsulação de compostos bioativos (Reis, 2011).

Algumas das vantagens associadas à encapsulação de fitoquímicos incluem (Chuan *et al.*, 2017; Jahanshasi *et al.*, 2008; Wang, 2014; Burgess and Hickey 2002):

- Aumento da biodisponibilidade;
- Aumento da estabilidade dos compostos, protegendo o material encapsulado da ação dos agentes externos (e.g. humidade, luz, temperatura) e evita processos de oxidação e isomerização;
- Possibilita o direcionamento do material encapsulado para o local alvo, através do aperfeiçoamento dos processos de permeabilidade e retenção. Isto é, devido ao seu tamanho pequeno os nanossistemas conseguem penetrar melhor nos tecidos/órgãos acumulando-se no local alvo;
- Protege o fármaco de interações com outras moléculas, evitando a sua captura pelos macrófagos e outros órgãos que fazem parte do sistema reticuloendotelial (SRE, do inglês *Reticulo-Endothelial System*) e garantindo que atinja o local alvo com a atividade farmacológica intacta;
- Mascara características organolépticas desagradáveis, nomeadamente o sabor e o odor
- Elimina ou reduz possíveis efeitos secundários, como do trato gastrointestinal (e.g. irritação gástrica causada por alguns fármacos).

A quercetina é um flavonóide natural que pertence à classe dos polifenóis e pode ser encontrada naturalmente em vários alimentos, como: maçãs, cebolas, bagas, chá, nozes,

sementes, cascas flores, folhas, hortaliças brássicas, vinho tinto e em algumas plantas medicinais, como por exemplo, *Solanum trilobatum*, *Ginkgo biloba* e *Hypercerium perforatum*. (Nathiya, Durga and Devasena, 2014; Wu *et al.*, 2008).

O nome IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) da quercetina é 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona (Figura 1) e apresenta 3 anéis planares e 5 grupos hidroxilo. Dois dos anéis são benzénicos aromáticos e estão ligados por um anel heterocíclico, tal como é caraterístico dos flavonóides (Joshi *et al.* 2011).

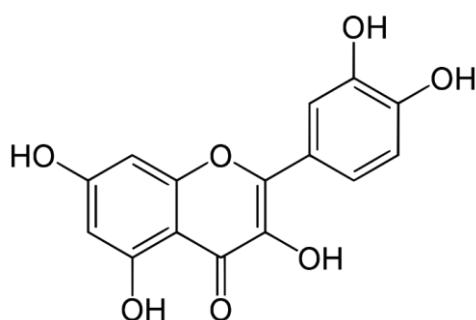


Figura 1: Representação esquemática da molécula da quercetina.

Adicionalmente, a quercetina é dos principais constituintes de muitos suplementos alimentares e de alguns nutracêuticos. Este composto é um potente antioxidante *in vitro*, tal como a própria estrutura indica, em virtude do número e da posição dos seus grupos -OH (Figura 1). Esta caraterística principal deve-se à capacidade de quelatação de iões metálicos e inibição da atividade das oxidases, bem como, à aptidão para transportar hidrogénio e iões (Nathiya, Durga and Devasena, 2014).

Para além da atividade antioxidante bem documentada, a quercetina possui diversas outras atividades biológicas e farmacológicas que a tornam um fitoquímico de eleição (Chien *et al.*, 2009; Gibellini *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2008) (Tabela1).

Tabela 1: Atividades da quercetina e estudos realizados.

Atividade Farmacológica e Biológica	Tipo de Ensaio	Estudo	Referências Bibliográficas
Antiviral	<i>In vitro</i>	(1) A quercetina inibiu a replicação do ciclo do vírus <i>Japanese encephalitis</i> . (2) A quercetina apresentou efeitos inibitórios na replicação do vírus da dengue.	(1) Johari <i>et al.</i> , 2012 (2) Zandi <i>et al.</i> , 2011
Analgésica	<i>In vivo</i>	(1) A quercetina demonstrou um significativo efeito analgésico quando testada em ratos diabéticos. (2) A quercetina comprovou efeitos analgésicos em ratos com o carcinoma ascítico de Ehrlich .	(1) Narenjka <i>et al.</i> , 2011 (2) Campos <i>et al.</i> , 2015
Antibacteriana	<i>In vitro</i>	A quercetina inibiu o crescimento das bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	Wang <i>et al.</i> , 2018
Anticancerígena	(1) <i>In vitro</i> (2) <i>In vivo</i>	(1) Constatou-se que as micelas de quercetina mostraram	(1) Zhao <i>et al.</i> , 2017. (2) Kale <i>et al.</i> , 2006

		<p>eficácia anticérgena em células A549 do cancro do pulmão.</p> <p>(2) A encapsulação de quercetina em ciclodextrinas demonstrou um efeito anticancerígeno quando testado em ratos com melanoma B16F10.</p>	
Anti-inflamatória	<i>In vivo</i>	<p>(1) Ficou demonstrada a atividade anti-inflamatória da quercetina em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina.</p> <p>(2) A quercetina encapsulada em microemulsões provou ter um efeito anti-inflamatório quando administrado em ratos com uma inflamação alérgica nas vias respiratórias.</p>	<p>(1) Baowen <i>et al.</i>, 2010</p> <p>(2) Rogerio <i>et al.</i>, 2010</p>
Indução da apoptose	<i>In vitro</i>	<p>Células HepG2 de hepatoma humano foram expostas a diferentes quantidades de quercetina, demonstrando-se que</p>	Granado-Serrano <i>et al.</i> , 2006

		a quercetina promovia a apoptose destas células cancerígenas.	
Antienvhecimento	<i>In vivo/In vitro</i>	Comprovou-se que as nanopartículas de quercetina protegeram a pele de danos causados pelos raios Ultra Violeta B (UVB).	.Zhu <i>et al.</i> 2016
Imunossupressora	<i>In vivo</i>	Demonstrou-se que a quercetina encapsulada em nanopartículas de PLGA-TPGS apresentava uma atividade imunossupressora no crescimento tumoral no fígado do rato.	Guan <i>et al.</i> 2016

A capacidade anticancerígena da quercetina relaciona-se com os seus diversos mecanismos de ação, tal como ilustra a Figura 2 (Ambudkar, 2003; Huang, 2010; Martinez-Perez, 2014; Nathiya, Durga and Devasena, 2014; Shankar, 2015).

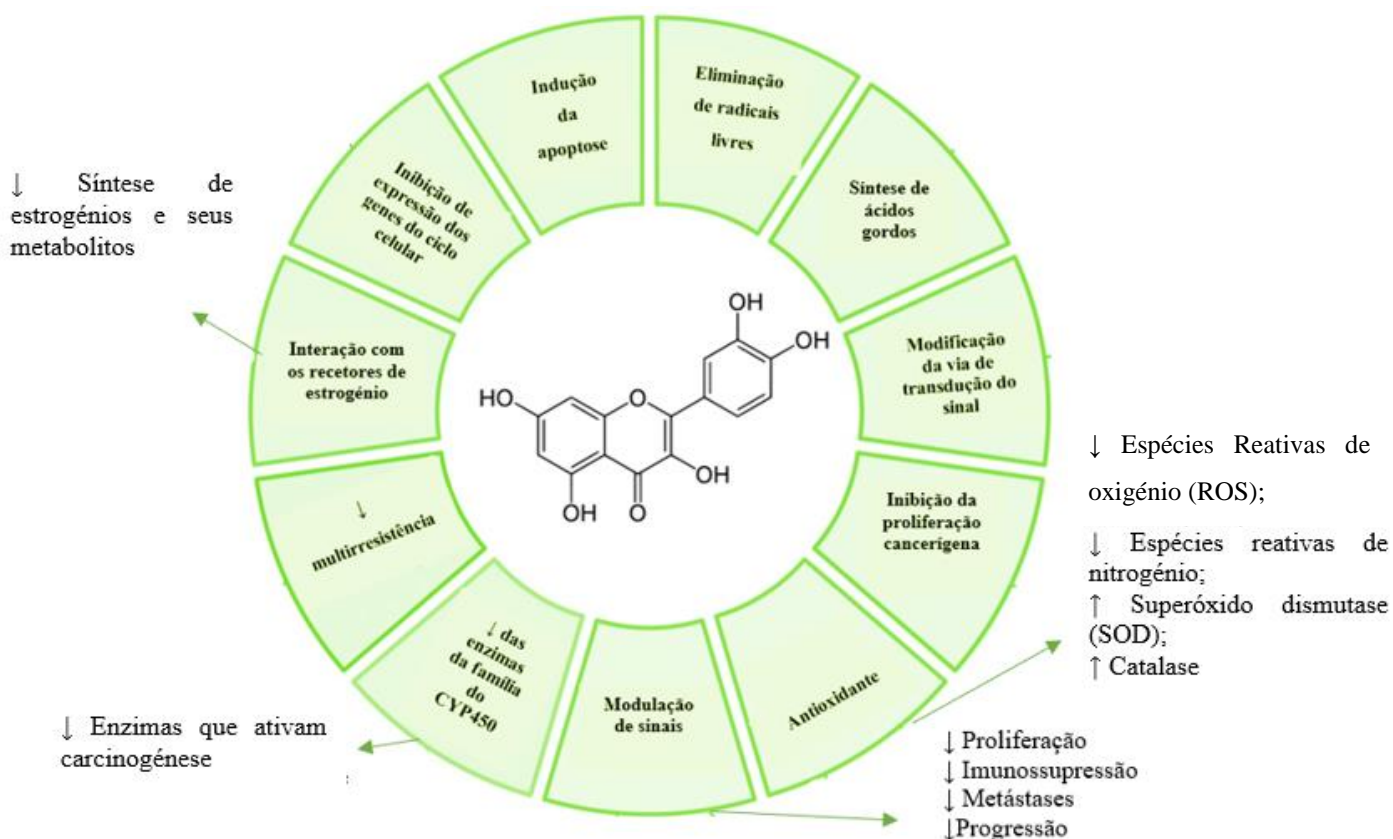


Figura 2: Mecanismos de ação da quercetina (adaptado de Martinez-Perez *et al.*, 2014).

Apesar da quercetina ser um fitoquímico bastante promissor, possui diversas limitações que restringem a sua utilização na prática clínica. Este composto apresenta os mesmos inconvenientes dos fitoquímicos, mencionados anteriormente, sendo a reduzida biodisponibilidade oral a principal. Através de estudos farmacocinéticos, confirmou-se que esta limitação resulta da lenta absorção e rápida metabolização da quercetina (Cai *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2005; Justino *et al.*, 2004).

Na tentativa de ultrapassar alguns destas limitações, têm sido desenvolvidas várias estratégias, sendo uma das mais promissora a sua encapsulação em sistemas nanoestruturados, como por exemplo nanopartículas lipídicas; nanopartículas poliméricas; nanopartículas proteicas; complexos de inclusão, como as ciclodextrinas;

nanocristais; microemulsões; dendrímeros; lipossomas; nanopartículas metálicas e magnéticas e micelas poliméricas.

1.1. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo apresentar o estado da arte, através de uma revisão bibliográfica, das estratégias desenvolvidas para veicular a quercetina, um fitoquímico com atividade antitumoral comprovada, em nanossistemas com o objetivo de melhorar a sua eficácia. Desta forma, são apresentados vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, da sua encapsulação em vários nanossistemas e as vantagens relativamente à atividade farmacológica da quercetina.

Adicionalmente, a dissertação explora possíveis estratégias de encapsulação para direcionar os nanossistemas ao local alvo e ainda possíveis efeitos de toxicidade.

Os estudos reportados no presente trabalho permitem concluir que a encapsulação de fitoquímicos em nanossistemas é um estratégia promissora, uma vez que, muitas vezes, permite melhorar a eficácia destes compostos, repercutindo-se em eventuais melhorias em doentes com cancro, nomeadamente possível cura, melhoria na recuperação e melhoria da qualidade de vida do doente.

1.2. Metodologia

Para alcançar o objetivo proposto, realizou-se uma pesquisa bibliográfica, utilizando as seguintes bases de dados: PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Google Académico (<http://scholar.google.pt/>), o Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) e a b-on (<http://www.b-on.pt/>).

O intervalo temporal da pesquisa dos artigos relativos ao desenvolvimento de nanossistemas contendo quercetina foi compreendido entre 2003 e 2018, restringindo a pesquisa a publicações com o artigo completo. Foram também incluídas algumas informações contidas em livros médicos.

Para realizar o estado da arte, a pesquisa baseou-se nas seguintes palavras-chave: “antitumor activity”, “phytochemicals”, “quercetin”, “nanosystems”, “toxicity”, “target”.

2. Nanossistemas para veiculação da quercetina

Os nanossistemas quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais oferecem diversas vantagens, incluindo (Grobmyer *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015a,b): diminuição da toxicidade e dos efeitos adversos, proteção das moléculas, libertação das moléculas no local da ação terapêutica, melhoria na eficácia e um aumento da adesão à terapêutica .

Atualmente, existe um grande direcionamento dos estudos para aplicação da nanotecnologia no tratamento do cancro. Diferentes sistemas têm sido desenvolvidos, quer para diagnóstico quer para terapia do cancro, como por exemplo: nanopartículas proteicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanocristais, ciclodextrinas, nanopartículas inorgânicas (Grobmyer *et al.*, 2015). Este capítulo apresenta a descrição geral de cada um dos nanossistemas referidos, bem como, alguns dos estudos da literatura relativos à encapsulação da quercetina nestes nanossistemas, explorando as vantagens para a atividade antitumoral.

2.1. Nanopartículas proteicas

As nanopartículas são sistemas coloidais sólidos com tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm (Locharoenkal *et al.*, 2014). As vantagens das nanopartículas incluem a possibilidade de controlar o tamanho da partícula e a libertação do composto bioativo, com o objetivo de alcançar o local alvo em quantidades terapêuticas através de várias vias de administração (Jahanshasi *et al.*, 2003; Soppimath *et al.*, 2001; Verma e Garg, 2001). Estes nanossistemas podem ser utilizados para conseguir um aumento do tempo de circulação do fármaco, para melhorar a capacidade de captação celular e, ainda, para proteção da molécula, facilitando o direcionamento para o local alvo (Andrade *et al.* 2011; Cryan, 2005; Gref *et al.* 1994; Grenha *et al.* 2008; Oner *et al.* 2013).

Para o desenvolvimento de nanopartículas proteicas que apresentem uma eficácia de encapsulação adequada e uma eficiente administração do fármaco no organismo é necessário que o polímero seleccionado seja biocompatível e, preferencialmente, biodegradável. A maioria dos péptidos, polipéptidos e proteínas são normalmente biocompatíveis e biodegradáveis (Reis, 2011). As proteínas mais utilizadas para

desenvolver estas nanopartículas são a albumina, a gelatina, o colagénio, a caseína, as lectinas e as lipoproteínas (Kreuter, 1994; Reis, 2011).

A preparação das nanopartículas proteicas é, geralmente, feita por processos de coacervação/dessolvatação e extração/emulsificação, sendo que o processo mais comum é o de coacervação/dessolvatação utilizado para preparação de nanopartículas de albumina (Oner *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008).

Estas nanopartículas são de manipulação simples, permitindo uma fácil transposição à escala industrial. No entanto, aquando da sua administração podem desencadear reações imunológicas e inflamatórias e, ainda, podem estar sujeitas a alterações devido à variabilidade das condições *in vivo* (e.g. pH e temperatura). Esta instabilidade *in vivo* pode provocar modificações na estrutura das nanopartículas, levando a uma mudança da sua biodisponibilidade (Reis, 2011).

2.1.1. Estudos *in vitro*

A fim de se testar a melhoria das propriedades da quercetina quando encapsulada em nanopartículas proteicas foram realizados vários ensaios *in vitro*, alguns dos quais são explorados de seguida.

Num estudo realizado por Kim *et al.* (2009) foram preparadas séries de aminoácidos conjugados com quercetina e foram realizados vários ensaios. O objetivo deste estudo foi comparar os conjugados com um pró-fármaco de quercetina-carbamato de glicina solúvel em água (QC12) e com a quercetina livre, a fim de tentar perceber se seria vantajosa esta associação. Foram testados conjugados de lisina, ácido glutâmico, monoácidos de fenilalanina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Os autores concluíram que a encapsulação da quercetina com os ácidos aspártico e glutâmico aumentou significativamente a solubilidade em água em relação à quercetina livre. A estabilidade em tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) para os conjugados de quercetina ($t_{1/2} > 17$ h) foi maior que para a QC12 (16,9 h), por outro lado, a encapsulação da quercetina com o ácido glutâmico e a lisina demonstrou resistência às hidroxilases e, desta forma, um aumento no seu tempo de semi-vida (180 min.) quando comparada com a QC12 (0,39 h). Adicionalmente, verificou-se que as conjugações da quercetina com o ácido aspártico,

glutâmico e alanina-ácido aspártico mostraram um aumento significativo na permeabilidade quando testada em células Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) em comparação com a quercetina livre. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que, comparando as propriedades farmacocinéticas da análise dos conjugados de quercetina com aminoácidos, verificou-se que o conjugado de quercetina com o ácido glutâmico (QU-E) foi o mais eficaz na melhoria da solubilidade aquosa, estabilidade e permeabilidade, tal como apresentado na Tabela 2 .

Tabela 2: Solubilidade, estabilidade e permeabilidade da quercetina, QC12 e (QU-E) (adaptado de Kim *et al.*, 2009).

Composto	Quercetina livre	QC12	Conjugado de quercetina-ácido glutâmico (QU-E)
Tamanho da partícula (µm)	50	Não determinado	2649
Estabilidade (t_{1/2}, h) em tampão PBS buffer	-	16,9	> 17
Permeabilidade (células MDCK)	1,0	Não determinado	5,2

Num outro estudo, desenvolvido por Fang e seus colaboradores em 2011, o objetivo foi desenvolver um novo método para encapsular eficazmente compostos hidrófobos, tal como a quercetina, utilizando nanopartículas de Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês *Albumine Serum Bovine*). Neste estudo, foram comparadas as capacidades de ligação e libertação da quercetina em nanopartículas de lisozima, mioglobina e BSA (formadas por processos de reticulação “*cross-linking*”). Verificou-se que aquando da encapsulação da quercetina, as nanopartículas diminuíam as suas dimensões, sendo as nanopartículas de BSA-quercetina as que apresentaram menor tamanho. Os autores demonstraram que uma molécula de lisozima tem capacidade de ligação a 7 moléculas de quercetina, uma molécula de mioglobina a 9 de quercetina e uma molécula de BSA a 11

de quercetina, sendo estas ligações estudadas em pH ácido e neutro. Adicionalmente, constatou-se que, quer em pH ácido quer em pH neutro, as nanopartículas de BSA protegeram a quercetina das reações de oxidação. O mesmo não se verificou para as nanopartículas de lisozima e mioglobina. Em suma, as nanopartículas de BSA demonstraram uma maior proteção da atividade antioxidante da quercetina e uma melhoria nas suas propriedades. Os autores perspectivaram um aumento do tempo de circulação do composto bioativo no organismo e uma potencial eficiência no seu transporte.

2.1.2. Estudos *in vivo*

Durante a pesquisa bibliográfica não foram encontrados estudos *in vivo* relativos de nanopartículas proteicas contendo quercetina.

2.2. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais constituídos por partículas sólidas, que podem ser formadas por polímeros naturais (e.g. quitosano, alginato, celulose, ácido hialurónico) ou por polímeros sintéticos/semi-sintéticos biodegradáveis (e.g. poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL)). Os polímeros naturais são sempre os materiais preferíveis porque apresentam menos incompatibilidades (Ajazuddin *et al.*, 2010; Alexis *et al.*, 2008; Schaffazick *et al.*, 2003).

Estas nanopartículas apresentam várias vantagens, nomeadamente (Lee *et al.*, 2007): capacidade de aumentar a solubilidade das moléculas encapsuladas, reduzir a dose terapêutica, melhorar a absorção e permitir uma libertação controlada dos fármacos/compostos bioativos. A libertação controlada deve-se ao facto destes nanossistemas serem constituídos por uma matriz sólida, fazendo com que formem um sistema de reservatório (Kumari *et al.*, 2010a).

Existem dois tipos de nanopartículas poliméricas, que diferem na sua composição e estrutura: as nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 3).

As nanocápsulas são constituídas por uma matriz que é revestido por uma invólucro polimérico (Schaffazick *et al.*, 2003). Nestas estruturas, as moléculas a encapsular podem estar dissolvidas no núcleo (Figura 3-(1)) e/ou adsorvidas na membrana polimérica (Figura 3-(2)). As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica homogénea e as moléculas estão retidas (Figura 3-(3)) e/ou adsorvidas na matriz polimérica (Figura 3-(4)) (Ajazuddin *et al.*, 2010; Alexis *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2011; Schaffazick *et al.*, 2003).

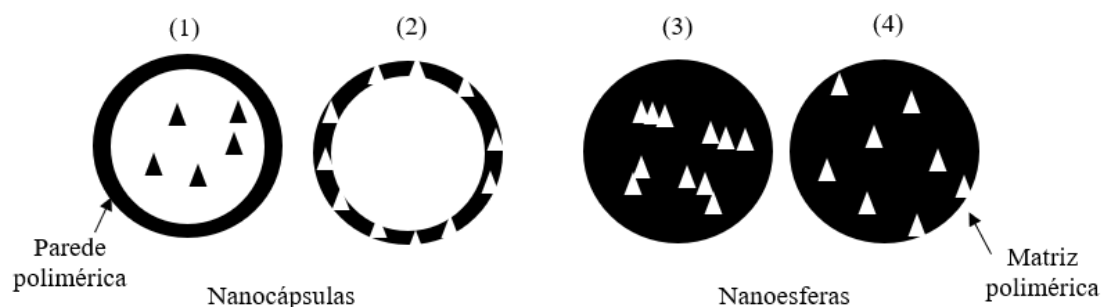


Figura 3: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas (adaptado de Schaffazick *et al.*, 2003).

Os métodos de produção mais utilizados neste tipo de nanopartículas são a nanoprecipitação, emulsão-difusão e evaporação do solvente. O método de evaporação do solvente pode conferir eventual toxicidade, uma vez que são utilizados solventes orgânicos (e.g. clorofórmio) para dispersão do lípido, podendo deixar resíduos nas preparações (Attama *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2010b; Masood *et al.*, 2016; Schaffazick *et al.*, 2003).

2.2.1. Estudos *in vitro*

Na literatura estão reportados vários estudos *in vitro* que testam a veiculação da quercetina em nanopartículas poliméricas, os quais demonstram uma melhoria das propriedades da quercetina.

Pool *et al.* (2012) testaram a encapsulação de quercetina e da catequina em nanopartículas de PLGA. Este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades físico-químicas e antioxidantes dos compostos quando encapsulados, a sua eficácia de encapsulação e as propriedades de libertação *in vitro* em meios com diferentes pH. As nanopartículas de PLGA foram preparadas pelo método de evaporação do solvente, obtendo-se

nanopartículas com tamanho compreendido entre 385 e 410 nm. As eficiências da encapsulação da quercetina e da catequina foram 79% e 76%, respetivamente. A encapsulação aumentou significativamente a capacidade antioxidante dos compostos, podendo se justificar pela eficaz eliminação dos radicais livres de oxigénio, inibição das reações de oxidação e das suas propriedades de quelatação. No entanto, estas nanopartículas demonstraram ser dependentes do pH, obtendo melhores resultados para pH ácido. Contudo, estes autores concluíram ser necessário realizar mais estudos para demonstrar as características e vantagens da encapsulação em nanopartículas de PLGA. Outros autores também encapsularam a quercetina em nanopartículas de PLGA. Por exemplo, Song *et al.* (2008) obtiveram nanopartículas de PLGA mais pequenas (≈ 200 nm) e Kumari *et al.* (2010b) conseguiram uma eficiência de encapsulação da quercetina em nanopartículas de PLGA ($\geq 95\%$).

Khoei *et al.* (2012) utilizaram nanopartículas de copolímero tribloco anfifílico PEG-polibutadieno-PEG (PEG-PBA-PEG) preparadas pelo método de nano-precipitação, com o intuito de melhorar o direcionamento da quercetina para o local alvo, incrementando os efeitos citotóxicos e genotóxicos em células tumorais. Os autores selecionaram os PEG, uma vez que não são tóxicos, não provocam resposta imunológica e são solúveis em vários solventes orgânicos e aquosos. Estas nanopartículas foram testadas em células da linha celular DU145 do cancro da próstata. As nanocápsulas apresentaram um tamanho de 62 nm e a encapsulação da quercetina nestas nanopartículas diminuiu significativamente a proliferação celular. Os resultados deste estudo demonstraram que as nanocápsulas de PEG-PBA-PEG facilitaram a captação da quercetina, verificando-se uma supressão da proliferação das células cancerígenas provocada pela toxicidade da quercetina para a linha celular.

2.2.2. Estudos *in vivo*

A verificação de que a quercetina encapsulada em nanopartículas poliméricas tem resultados benéficos para o tratamento do cancro está documentada em alguns dos estudos *in vivo*.

Sharma *et al.* (2014) testaram a encapsulação de quercetina em nanopartículas de MPEG-PLA (metoxi-polietilenoglicol-ácido polilático, do inglês *methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide)*), preparadas pelo método da nano-precipitação. Este estudo teve como

objetivo avaliar a eficácia da atividade anticancerígena e indução da apoptose na linha celular MDA-MB-231 de cancro da mama de um roedor. Os autores reportaram um aumento da apoptose na linha celular, ocorrendo uma relação entre o aumento da concentração da quercetina encapsulada nas nanopartículas e o aumento da apoptose. As taxas de apoptose foram 22,4; 29,8 e 31,1% quando as células foram tratadas com 3,375; 6,75 e 13,5 µg/ml de quercetina, respetivamente. Foi ainda efetuado um controlo (nanopartícula sem quercetina) que obteve uma taxa de apoptose de 14,6%.

Num outro estudo, conduzido por Baksi *et al.* (2018), o objetivo foi desenvolver nanopartículas de quitosano contendo quercetina para melhorar as propriedades anticancerígenas no cancro da mama e do pulmão. Para esta investigação, os estudos em células foram realizadas nas seguintes linhas celulares: A549 do cancro do pulmão e MDA MB 468 do cancro da mama. A encapsulação da quercetina aumentou o tamanho das nanopartículas (339,37 nm) relativamente às nanopartículas vazias (577,63 nm) e promoveu uma diminuição da proliferação celular nas duas linhas testadas. Os estudos *in vivo*, realizados em ratos aos quais inocularam as mesmas linhas celulares citadas anteriormente, revelaram um aumento da eficácia da quercetina quando encapsulada nas nanopartículas relativamente à quercetina livre, uma vez que ficou comprovado que as nanopartículas promoveram a acumulação do fármaco no local alvo (i.e. células cancerígenas) através do fenómeno “*passive targeting*”. Estas nanopartículas aumentaram a atividade antioxidante da quercetina, aumentando a superóxido dismutase que induz a morte celular, resultando na redução do tumor. Em conclusão, a atividade antioxidante e antitumoral da quercetina foi melhorada pela sua encapsulação nas nanopartículas de quitosano.

Guan e seus colaboradores (2016) também encapsularam a quercetina em nanopartículas poliméricas. O polímero utilizado para a preparação destas nanopartículas foi o PLGA, ao qual foi acoplado o TGPS (succinato de d- α -tocoferol polietileno glicol 1000, do inglês *d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate*), as quais foram preparadas pelo método de evaporação do solvente. Para comprovar a eficácia das nanopartículas foi injetada a linha celular HepG2 do carcinoma hepatocelular na veia da cauda de dois grupos de ratos, enquanto no grupo controlo não foi efetuada qualquer administração. Foram utilizados 3 grupos de estudo: um grupo controlo, um grupo tratado com quercetina encapsulada em nanopartículas de PLGA (QPN) e um grupo tratado com

quercetina encapsulada em nanopartículas de PLGA-TGPS (QPTN). No grupo controlo não se verificou apoptose nem necrose das células e nos grupos de tratamento, QPN e QPTN, ocorreu um aumento da apoptose, de acordo com a concentração de quercetina. A inibição tumoral foi 12,93% superior para o grupo QPTN (59,07%) do que para o grupo QPN (46,14%). Este estudo demonstrou que as QPTN exibem um maior efeito supressor do crescimento tumoral do que a quercetina livre.

2.3. Nanopartículas lipídicas

Este tipo de nanopartículas apresenta dimensões compreendidas entre 0,1 e 1000 nm (Silva *et al.*, 2011) e podem definir-se como dispersões aquosas compostas por 5-30% de fase lipídica, um ou dois tensioativos e uma fase aquosa. Os tensioativos devem ser utilizados para manter a estabilidade da preparação e evitar a agregação das nanopartículas. As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas no início da década de 90 com o intuito de ultrapassar as limitações de outros sistemas coloidais (Silva *et al.*, 2011).

Estas nanopartículas são considerados sistemas bastante promissores, uma vez que apresentam várias vantagens comparativamente aos sistemas coloidais tradicionais (Mehnert e Mader, 2001; Muller e Runge, 1998; Wissing *et al.*, 2004):

- elevada estabilidade físico-química, sem necessidade de recorrer a processos de liofilização ou secagem por atomização;
- estatuto GRAS do inglês “*Generally Regarded as Safe*”, ou seja, têm reduzida ou nula toxicidade;
- não há necessidade de utilização de solventes orgânicos, tal como acontece nas nanopartículas poliméricas;
- matriz sólida à temperatura ambiente, permitindo modular a libertação do material encapsulado;
- baixo custo de produção;
- direcionamento para o local-alvo através da modificação físico-química da superfície das nanopartículas lipídicas. Desta forma, a quantidade de fármaco que atinge as células cancerígenas é maximizada e a toxicidade sistémica é diminuída.

Existem dois tipos de nanopartículas lipídicas: (a) nanopartículas de lípidos sólidos (SLN, do inglês *Solid Lipid Nanoparticle*) e (b) vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured Lipid Nanoparticle*) (Figura 4).

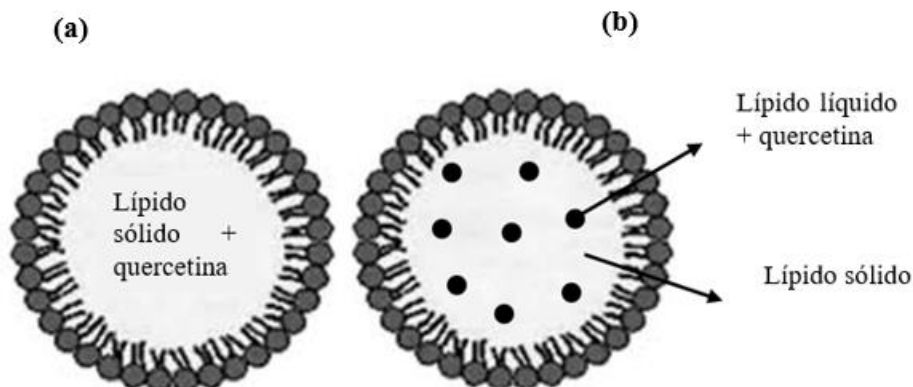


Figura 4: Representação esquemática das nanopartículas lipídicas: (1) SLN; (2) NLC (adaptada de Muller *et al.*, 2000).

As SLN (Figura 4a) são sistemas coloidais compostos por lípidos ou misturas de lípidos que são sólidos à temperatura ambiente e corporal. Na maioria das vezes, os lípidos utilizados são triglicerídeos com elevado grau de pureza, no entanto, também podem ser utilizados triglicerídeos compostos, misturas de triglicerídeos, ácidos gordos ou ceras (Mehnert *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1994). Nas SLN, a matriz lipídica apresenta uma estrutura cristalina “quase perfeita”. A matriz lipídica é sólida, revestida por uma camada de moléculas tensioativas, o que permite modular a libertação do material encapsulado e protegê-lo de forma mais eficiente.

Contudo, as SLN apresentam potenciais desvantagens, nomeadamente (Mehnert *et al.*, 2001) : insuficiente capacidade de carga do fármaco na matriz lipídica sólida; ocorrência de transições polimórficas em função do tempo que podem levar a problemas de estabilidade e à libertação da molécula ativa da matriz do nanossistema e o facto de terem cerca de 70-90% de água na sua composição

Para tentar colmatar estas desvantagens, desenvolveram-se os NLC. Os NLC (Figura 4b) diferem das SLN na sua matriz nanoestruturada e resultam da mistura de lípidos líquidos (óleos) com lípidos sólidos, os quais são dispersos numa fase aquosa e estabilizados por uma camada de tensioativo(s), originando uma estrutura cristalina com várias

imperfeições da matriz lipídica. Estas imperfeições na matriz permitem aumentar a capacidade de encapsulação relativamente às SLN (Santos *et al.*, 2013).

O processo mais comum para produzir as nanopartículas lipídicas é a homogeneização de alta pressão (HPH, do inglês *High Pressure Homogenizer*), no entanto também podem ser preparadas através de outras técnicas, como a sonicação, microemulsão, evaporação do solvente, fluidos supercríticos, extrusão (Battaglia *et al.*, 2014).

2.3.1. Estudos *in vitro*

Li *et al.* (2009) desenvolveram SLN contendo quercetina (Q-SLN) com um tamanho compreendido entre 20 e 500 nm. Os autores realizaram estudos de absorção da Q-SLN nos 4 segmentos do intestino. Os resultados demonstraram que as Q-SLN foram absorvidas em todos os segmentos. As percentagens de absorção de Q-SLN foram: duodeno ($13,00 \pm 2,41\%$), jejuno ($17,57 \pm 1,84\%$), íleo ($30,44 \pm 2,21\%$) e cólon ($22,03 \pm 1,77\%$). As nanopartículas lipídicas encapsulando quercetina demonstraram ser bem absorvidas a nível intestinal, destacando-se a sua absorção no íleo e no cólon. Estes resultados provam que as SLN podem funcionar como nanossistemas de libertação modificada e são promissores no aumento da absorção oral para fármacos pouco solúveis em água, como é a quercetina.

Sun *et al.* (2014) estudaram a encapsulação da quercetina em NLC (Q-NLC), sendo utilizada uma mistura de lípidos. O objetivo deste estudo foi verificar se os Q-NLC aumentam a solubilidade e estabilidade da quercetina e os efeitos que provoca nas linhas celulares testadas (MCF-7 e MDA-MB-231 do cancro da mama). Neste estudo, os Q-NLC, com um diâmetro aproximadamente de 30 nm, foram preparados com lípidos biocompatíveis e biodegradáveis e apresentaram uma eficiência de encapsulação de 95%. Antes da realização do ensaio *in vitro* foi efetuada a medição da estabilidade das Q-NLC e da quercetina livre numa solução de 20% (v/v) de metanol. Foram avaliados os resultados após 4 e 24 h de incubação:

- incubação de 4 horas: degradação de 50% da Q livre e 12% da Q nas Q-NLC ;
- incubação de 24 horas: Q livre completamente degradada e a Q nas Q-NLC de 40%.

Estes resultados comprovam que a estabilidade da quercetina foi melhorada pelos NLC. Relativamente aos efeitos da quercetina veiculada nos Q-NLC, verificou-se que em períodos de exposição de 24 e 48 horas, a viabilidade das linhas celulares diminuiu para 80% e 64%, respetivamente, observando-se também uma indução da apoptose. Os autores reportaram que os Q-NLC aumentaram a estabilidade, solubilidade e o efeito anticancerígeno da quercetina.

2.3.2. Estudos *in vivo*

Nesta secção são apresentados alguns estudos da administração de nanopartículas lipídicas contendo quercetina em animais.

Jain *et al.* (2013) também realizaram um estudo comparativo da encapsulação da quercetina em GeluPearl-SLN (Q-SLN) e GeluPearl-NLC (Q-NLC). Para este estudo, as nanopartículas foram preparadas pelo método da microemulsão, sendo utilizado como lípido sólido, o Precirol ATO 5 (Distearato de Glicerilo, do inglês *Glycerol Distearate*), como lípido líquido, o Capryol 90 (Monocaprilato de propilenoglicol, do inglês *Propylene glycol monocaprylate*) e como surfatante, o Gelucire 50/13 (*Stearoyl polyoxyl-32 glycerides NF*) e o Labrafil M1944 CS (*Oleoyl polyoxyl-6 glycerides*). Os estudos *in vivo* foram efetuados em ratos fêmeas, aos quais foram inoculadas células da linha celular B16F10 do melanoma. O tratamento com Q-SLN e Q-NLC demonstrou uma redução significativa do volume tumoral quando comparado com o grupo controlo. Em termos de comparação, as Q-SLN demonstraram uma maior eficácia na redução do tumor em relação às Q-NLC. Esta maior eficácia por parte das Q-SLN deve-se à sua capacidade de manter a quercetina mais tempo encapsulada na sua matriz lipídica, tal como verificado nos ensaios *in vitro* do mesmo estudo. Como a Q-SLN demonstrou ser a nanopartícula mais eficaz, foi avaliada a sua capacidade antimetástica, comprovando que possibilitou uma diminuição das metástases no pulmão ($p > 0,05$) comparado com o grupo controlo. Com este estudo comprovou-se que a quercetina encapsulada em SLN apresentou atividades anticancerígena e antimetástica.

2.4. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas pequenas, que contêm uma ou mais bicamadas de lípidos anfifílicos, geralmente fosfolípidos de origem natural ou sintética, com um compartimento interno aquoso (Bangham *et al.*, 1965).

De acordo com a sua estrutura, estes sistemas permitem a encapsulação quer de compostos hidrossolúveis, quer de compostos lipossolúveis. Os fármacos hidrossolúveis são encapsulados no compartimento aquoso, enquanto os fármacos lipossolúveis ficam adsorvidos nas membranas lipídicas (Chorilli *et al.*, 2004; Chorilli *et al.*, 2007; Edwards and Baeumner, 2006; Raj *et al.*, 2012). Os lipossomas são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogénicos e, por este motivo, são de grande interesse na indústria farmacêutica (Edwards, 2006; Sandip *et al.*, 2000; Verma e Garg, 2001)

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de camadas, que variam com o método de produção (Edwards, 2006; Sandip *et al.*, 2000; Verma e Garg, 2001). Os lipossomas mais frequentemente utilizados incluem (Figura 6):

- Vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *Small Unilamellar Vesicles*) que possuem apenas uma camada e têm diâmetro compreendido entre os 20 nm e os 100 nm;
- Vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*) que possuem apenas uma camada e têm diâmetro compreendido entre os 100 nm e os 800 nm;
- Vesículas multilamelares grandes (MLV ou MVL, do inglês *Multilamellar Vesicles*) que possuem várias camadas e têm diâmetro compreendido entre os 500 nm e os 5000 nm.



Figura 5: Representação esquemática dos tipos de lipossomas mais utilizados (adaptada de Pandey *et al.*, 2016).

Estes sistemas coloidais apresentam várias vantagens, nomeadamente (Allen and Culis, 2004): proteger o fármaco/composto bioactivo de condições externas (e.g. pH, temperatura), melhorar a solubilidade dos mesmos em água, diminuir a potencial toxicidade e o tempo necessário de tratamento através do direcionamento do fármaco para o local alvo. Este direcionamento é conseguido através da acoplação de ligantes (e.g. imunoglobulinas, enzimas e citoquinas) à superfície do lipossoma, que lhe vai conferir seletividade para acumulação no sítio de ação desejado (Sihorkar, Vyas, 2001; Sapra, Allen, 2003).

Estes nanossistemas têm demonstrado um aumento da eficácia no tratamento de doenças cancerígenas, uma vez que (Cai *et al.*, 2013): aumentam a exposição do tumor ao fármaco anticancerígeno através do aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo e permitem um aumento na permeabilidade e retenção dos fármacos no tumor, designado de direcionamento passivo, do inglês *passive targeting*.

2.4.1. Estudos *in vitro*

Diversos autores desenvolveram lipossomas para veiculação da quercetina, alguns desses estudos estão descritos seguidamente.

Wang *et al.* (2012) avaliaram a encapsulação da quercetina em lipossomas (Q-NL) e estudaram a sua ação numa linha celular de glioma C6.

Os lipossomas apresentaram forma esférica com um tamanho compreendido entre 62.3 e 191.5 nm. A linha celular foi incubada com diferentes concentrações de Q-NL durante 12 horas a fim de se verificar o efeito. A indução da apoptose mostrou-se dependente da concentração e observou-se que quando a linha celular foi incubada com concentrações de Q-NL de 0,50 e 100 μ M ocorreu um aumento significativo da indução da apoptose. Quando, a linha celular foi exposta a concentrações mais elevadas demonstrou mesmo a morte celular (necrose). Desta forma, comprovou-se que os Q-NL aumentaram o efeito anticancerígeno da quercetina, resultando numa diminuição da viabilidade das células através de indução da apoptose e necrose.

2.4.2. Estudos *in vivo*

São vários os autores que desenvolveram estudos *in vivo* para comprovar a melhoria das propriedades da quercetina quando encapsuladas em lipossomas.

Yuan *et al.* (2006) desenvolveram lipossomas de PEG para veicular a quercetina (Q-PEGL). Foi avaliada a biodistribuição lipossomal da quercetina em ratos inoculados com células de diferentes linhas celulares, nomeadamente CT26 do cancro colorectal, células de Lewis LL/2 do cancro do pulmão e H22 do hepatoma. Foram efetuados 2 estudos: **1)** Os animais foram divididos em grupos e tratados com PEGL (100mg/kg) e com concentrações crescentes de Q-PEGL (12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg); **2)** Os animais foram divididos em 3 grupos distintos com tratamentos diferentes: Q-PEGL (50 mg/kg), quercetina livre (50 mg/kg) e quercetina livre (50 mg/kg) com PEGL (100 mg/kg). No estudo **1)** o grupo tratado com 12,5 and 25 mg/kg de Q-PEGL demonstrou moderada inibição do crescimento tumoral e o grupo tratado com 100 mg/kg mostrou uma redução significativa das metástases do cancro do pulmão. No estudo **2)** verificou-se um aumento da supressão do crescimento tumoral no grupo de animais tratados com Q-PEGL, que aumentou a eficácia da atividade anticancerígena da quercetina. Em conclusão, este estudo demonstrou que os Q-PEGL têm capacidade de aumentar o tempo de circulação da quercetina, são eficazes na acumulação da quercetina nas células cancerígenas e são

eficazes na inibição do crescimento tumoral. Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por Baowen *et al.* (2010).

2.5. Micelas

As micelas são agregados supramoleculares de moléculas anfifílicas, formadas espontaneamente quando estas moléculas se encontram, em solução aquosa, numa concentração acima da concentração micelar crítica (Hanna *et al.*, 2005). Os tensioativos acoplam-se através das suas caudas hidrófobas, originando um núcleo que possibilita a veiculação de compostos hidrófobos .

Existem dois tipos de micelas: as fosfolipídicas e as poliméricas. Estas últimas foram descobertas mais recentemente. As micelas poliméricas são formados por polímeros, tal como o próprio nome indica, e têm demonstrado bastante promissores como sistemas de veiculação.

As micelas poliméricas têm a capacidade de permanecer mais tempo no organismo, uma vez que conseguem escapar às células do sistema reticuloendotelial, devido ao seu tamanho reduzido (5nm - 100 nm) (Bromberg, 2008). São constituídas por um núcleo contendo um invólucro composto por polímeros hidrófilos, possuem elevada estabilidade e permitem obter uma libertação controlada de diversos fármacos (Bromberg, 2008).

A parte hidrófila destas micelas confere-lhe elevada biocompatibilidade (Nishiyama and Kataoka, 2006). Outras vantagens associadas a estes nanossistemas incluem (Oerlemans *et al.*, 2010; Dhembre *et al.*, 2011): método de preparação simples, eficácia na encapsulação, melhor permeabilidade e direcionamento para o local alvo através da ligação de ligandos específicos (e.g. anticorpos, transferrina) à superfície da micela.

2.5.1. Estudos *in vitro*

Khonkarn *et al.* (2011) prepararam micelas poliméricas, utilizando dois polímeros, mPEG750-b-OCL-Bz e mPEG750-b-OCL-Np. As linhas celulares testadas para verificar o efeito anticancerígeno da quercetina foram: K562 da leucemia e a GLC4 do carcinoma do pulmão. Os autores verificaram que a quercetina encapsulada em micelas de mPEG750-b-OCL-Bz foi eficaz na inibição tumoral das linhas celulares K562 da

leucemia e GLC4 do cancro do pulmão, apresentado valores de IC₅₀ de 10,0 ± 0,1 e 6,8 ± 0,9 µg/ml respetivamente. Através de estudos de citotoxicidade, os autores comprovaram que a quercetina encapsulada é eficaz na inibição das células cancerígenas, induzindo a paragem do ciclo celular na fase G2/M. Adicionalmente, verificou-se que as micelas conjugadas com mPEG750-b-OCL aumentam a solubilidade do fármaco, sendo uma ótima opção para o tratamento do cancro.

2.5.2. Estudos *in vivo*

Tan *et al.* (2012) utilizaram micelas conjugadas PEG para encapsulação da quercetina, tendo este estudo o objetivo de avaliar a eficácia e a atividade anticancerígena dos sistemas desenvolvidos em duas linhas celulares, A549 do cancro do pulmão MDA-MB-231 do cancro da mama, e em ratos inoculados com células da linha celular A549. Para testar a citotoxicidade das micelas utilizadas diferentes concentrações de quercetina, sendo a mais alta de 100 µM. Verificou-se um aumento significativo da atividade anticancerígena quer *in vitro* quer *in vivo* quando a quercetina é encapsulada nas micelas comparativamente à quercetina livre. As micelas foram bem toleradas pelo modelo animal, não provocando aparentemente toxicidade no epitélio intestinal. Adicionalmente, não se verificou uma perda significativa do peso do animal após um período de 10 semanas. Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por outros investigadores, como por exemplo Zhao *et al.* (2017).

Dian *et al.* (2014) realizaram um estudo *in vivo* com o objetivo de desenvolver uma micela. Este estudo utilizou cães *Beagle* para confirmar a eficácia das micelas. A atividade da quercetina encapsulada nas nanomicelas foi comparada com a da quercetina livre. Para tal, foi administrada por via oral uma dose de 16 mg/kg, quer de quercetina livre, quer de quercetina encapsulada em micelas. O t_{1/2} da quercetina livre foi de 4,94 h, enquanto o da quercetina encapsulada foi de 10,81 h, confirmando-se um aumento da biodisponibilidade da quercetina.

2.6. Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas heterogêneos constituídos por gotículas uniformes de tamanho nanométrico (20 nm - 200 nm). Estes nanossistemas pertencem à classe dos colóides líquido-líquido, ou seja, são uma dispersão de dois líquidos imiscíveis com uma fase dispersa e uma fase contínua, que podem ser água (A) ou óleo (O) estabilizada por tensoativos. A fase dispersa e contínua determina o tipo da emulsão que pode ser Água/Óleo (A/O) ou Óleo/Água (O/A).

As nanoemulsões são normalmente transparentes ou translúcidas, têm baixa viscosidade e baixa estabilidade termodinâmica (Keck, Muller, 2006; Solans *et al.*, 2005).

A fase aquosa é, normalmente, constituída por água ou por uma solução tampão e a fase oleosa é constituído por óleos de origens diversas. O agente tensoativo é uma das partes mais importantes, uma vez que reduz a quantidade de energia necessária para se obterem as nanoemulsões (L'alloret *et al.*, 2006).

Para obtenção das nanoemulsões, são necessários processos com elevada energia, os quais promovem a rutura das gotículas em gotículas de tamanho nanométrico. Para este efeito são utilizados homogeneizadores de alta pressão, que utilizam a energia da alta pressão, ou sonicadores, que utilizam a energia dos ultrassons.

As nanoemulsões têm mostrado ser sistema de veiculação eficazes, aumentando a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis. Estes nanossistemas apresentam a capacidade de solubilização de fármacos/compostos bioactivos quer na fase aquosa, quer na fase lipídica, possibilidade de produção e tranposição para a escala industrial e também têm reduzida ou isenta toxicidade (Azuma *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2013; Jaiswal *et al.*, 2015).

2.6.1. Estudos *in vitro*

Arbain *et al.* (2018) desenvolveram nanoemulsões (O/A) contendo quercetina para administração pulmonar. Estes autores comprovaram que as nanoemulsões apresentaram um perfil de libertação modificada, libertando aproximadamente 27% da quercetina ao fim de 48 horas. . Verificaram também que após 48 e 72h de incubação, e sob o efeito do

aumento das concentrações de quercetina, houve uma diminuição da viabilidade das células da linha celular A549 do cancro do pulmão. De acordo com os resultados obtidos ao longo do trabalho, pode afirmar-se que houve uma eficaz deposição da quercetina no trato respiratório.

2.7. Nanocristais

Os nanocristais de fármaco são cristais com tamanho inferior a 100 nm (Chen *et al.*, 2011). Estes nanossistemas apresentam diversas vantagens, nomeadamente (Junghanns, Müller, 2008; Shegokar, Muller, 2011; Sigfridsson):

- aumentam a solubilidade dos fármacos em água; (Muller *et al.*, 2011);
- são de simples formulação, o que facilita a transposição à escala industrial;
- a sua produção é económica e
- não necessitam do uso de solventes orgânicos.

Ao contrário da maioria dos nanossistemas, os nanocristais podem ser administrados por diferentes vias, sendo a administração oral a forma preferida pelos doentes (Keck and Muller, 2006; Yallapu *et al.*, 2012).

As técnicas utilizadas para obtenção deste tipo de nanopartículas são o “*bottom up*” e o “*top down*” (Keck and Muller, 2006; Muller and Jan, 2006; Patravale, *et al.*, 2004). A técnica de “*bottom up*” utiliza métodos de precipitação e a técnica de “*top down*” utiliza métodos de homogeneização a alta pressão e de moagem com esferas.

Na técnica da moagem com esferas, método mais utilizado na produção de nanocristais de fármaco, a câmara de moagem é carregada com as esferas de moagem (e.g. esferas de zircónia), são submetidas a uma elevada velocidade, gerando fortes forças de corte, o que resulta na desintegração do pó de fármaco em nanocristais. As características dos nanocristais dependem do número de esferas usadas, da quantidade de fármaco e estabilizantes, do tempo de moagem, da velocidade e da temperatura (Chen *et al.*, 2011).

2.7.1. Estudos *in vitro*

Lucida *et al.* (2016) produziram e caracterizaram nanocristais de quercetina, usando Planetary Ball Mill[®]. Os nanocristais foram obtidos através do método de moagem de esferas. Verificou-se um aumento significativo da solubilidade da quercetina quando encapsulada nos nanocristais - i.e. $18,03 \pm 1,53 \mu\text{g/mL}$, após moagem de 15 minutos, e de $20,82 \pm 4,42 \mu\text{g/mL}$, após 30 minutos. O aumento da solubilidade foi de cerca de 5 vezes mais após os 30 minutos de moagem. Quanto ao perfil de dissolução, após 5 minutos, a quercetina livre dissolvida foi de $4,83 \pm 1,58\%$ e a dos nanocristais de $32,50 \pm 0,53\%$. Após 45 minutos, a percentagem de quercetina livre dissolvida aumentou para $13,42 \pm 0,27\%$ e a dos nanocristais de quercetina aumentou para $36,03 \pm 1,75\%$.

2.8. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido, com forma toroidal. As ciclodextrinas (CD) mais abundantes são as α -CD, β -CD e γ -CD, que contêm, respectivamente, 6, 7 e 8 unidades de glucose (Figura.

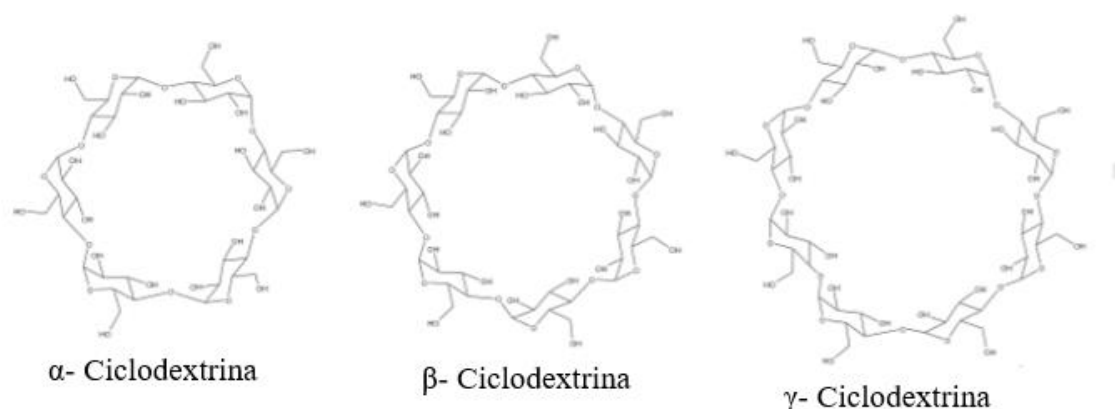


Figura 6: Tipos de ciclodextrinas

(adaptado de Gharib *et al.*, 2015).

A ciclodextrina mais utilizada na indústria farmacêutica é a β -CD, devido à sua capacidade de complexar com uma elevada variedade de fármacos, ao tamanho da cavidade e à disponibilidade quer em quantidades abundantes, quer a baixo custo (Jambhekar and Breen, 2016; Miranda *et al.*, 2011; Sergey and Loftsson, 2013).

Estas moléculas facilmente formam complexos de inclusão, o que as torna particularmente interessantes para veicular compostos. Desta forma, as ciclodextrinas têm capacidade de interagir com compostos com reduzida solubilidade em água, uma vez que, a forma e a geometria característica das ciclodextrinas, permitem-lhes ter uma cavidade interna hidrófoba e uma parte externa hidrófila (Loftsson and Brewster, 1996; Pralhad and Rajendrakumar, 2004; Szejtli, 1988).

As ciclodextrinas são particularmente utilizadas com o objetivo de melhorar a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos. No entanto, também melhoram as propriedades organolépticas, evitam incompatibilidades indesejáveis e reduzem efeitos secundários e possíveis interações (Challa *et al.*, 2006; Szejtli, 1994; Szente and Szezl, 2004).

Algumas limitações destes compostos incluem (Jambhekar and Breen, 2016; Miranda *et al.*, 2011; Sergey and Loftsson, 2013): capacidade de potenciar as reações de hidrólise de alguns fármacos; baixa solubilidade aquosa; toxicidade; podem complexar moléculas de impurezas que estejam presentes na formulações; alguns derivados das CDs naturais estão disponíveis em quantidades limitadas, porque são sintetizados em laboratório.

2.8.1. Estudos *in vitro*

Num estudo levado a cabo por Wu *et al.* (2014) foi desenvolvido um complexo de ciclodextrinas e quantum dots conjugadas com cistamina para explorar a atividade anticancerígena da quercetina e foram testadas na linha celular HepG2 do carcinoma hepatocelular. Esta linha celular foi testada com diferentes concentrações do complexo de quercetina encapsulada em ciclodextrina com cistamina (Cys-CdTe QDs) (entre 0 e 110 nmol/L) e quercetina livre (entre 0 e 485 µmol/L). A concentração de 110 nmol/L do complexo Cys-CdTe QDs provocou uma diminuição significativa da viabilidade celular, após 24h de exposição. Com um tempo de exposição maior (48 h e 72h), a diminuição da viabilidade celular foi mais significativa, até mesmo para concentrações mais baixas de quercetina (e.g. com uma concentração de 13,8 nmol/L do complexo Cys-CdTe QDs, por períodos de 48 e 72h, houve uma diminuição da viabilidade celular de 25% e 43%, respetivamente). Desta forma, os autores reportaram que o complexo Cys-CdTe QDs potenciou a ação anticancerígena da quercetina, uma vez que o complexo

sem a quercetina encapsulada não mostrou efeito de diminuição na viabilidade das células cancerígenas.

2.8.2. Estudos *in vivo*

No estudo efetuado por Kale *et al.* (2006) foram utilizados complexos de quercetina com um derivado das β -ciclodextrinas. Estes complexos foram testados na linha celular de B16F10 melanoma e foram inoculados na região abdominal em ratos fêmea BDF1. Após inoculação do melanoma constatou-se que este cresceu até um tamanho de 1800 mm³. A fim de se tentar prever a influência da quercetina no tratamento do melanoma, foram testadas concentrações de 25 e 50 mg/kg, provocando uma inibição do crescimento tumoral de 90 e 93%, respetivamente. Quando foi testada a inibição do crescimento tumoral com a quercetina encapsulada nas ciclodextrinas, confirmou-se um aumento da atividade anticancerígena, tal como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Volume tumoral (mm³) a uma concentração de quercetina de 50mg/kg (adaptado de Kale *et al.*, 2006).

Dia	Controlo	Quercetina Livre (50mg/kg)	Quercetina no complexo de ciclodextrina
9	2,64 ± 1,55	Não Definido	Não Definido
11	3,88 ± 2,09	0,78 ± 0,38	0,52 ± 0,30
13	24,10 ± 22,13	1,80 ± 1,27	2,69 ± 1,35
15	238,93 ± 14,49	6,99 ± 5,11	3,40 ± 2,36
17	827,56 ± 38,92	71,90 ± 19,25	6,91 ± 2,38
19	1369 ± 82,27	94,34 ± 15,92	7,80 ± 1,87
21	1755,84 ± 98,03	115,98 ± 11,59	8,68 ± 0,76

2.9. Nanopartículas inorgânicas

2.9.1. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (MNPs, do inglês *Magnetic Nanoparticles*) apresentam tamanhos inferiores a 100 nm e são de possível manipulação através de um campo magnético externo. As MNPs são compostas por elementos magnéticos, tais como ferro, níquel, cobalto e os seus óxidos (Yu *et al.*, 2013).

Estas nanopartículas têm sido usadas maioritariamente como agentes de contraste na imagem de ressonância magnética. Para além disso, as MNPs também são utilizados como agentes terapêuticos hipertermiais e como agentes de veiculação, porque são de fácil preparação, separação e têm capacidade de acumulação no local alvo (fenómeno de superparamagnetismo). Por estas propriedades, as MNPs são uma boa estratégia para a terapêutica do cancro (Butter *et al.*, 2005; Chertok *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2013).

2.9.1.1. Estudos *in vitro*

Num estudo realizado por Barreto *et al.* (2011), foram desenvolvidas nanopartículas magnéticas de iões de ferro (Fe_3O_4) pelo método de co-precipitação com um tamanho compreendido entre 11,5 e 32,5 nm. Nestas nanopartículas foi incorporado um copolímero de óxido de etileno e oxifeniletileno. A encapsulação da quercetina nestes nanossistemas teve como objetivo direcionar a quercetina para o local alvo. Estas nanopartículas magnéticas demonstraram apresentar propriedades superparamagnéticas, o que é importante para o direcionamento da quercetina porque o bloqueio capilar por agregações formadas por magnetismo residual vai ser evitado após remoção do campo aplicado. A libertação da quercetina das nanopartículas magnéticas com copolímero (MQC) demonstraram ser dependente do pH. Para um pH de 7,4 ocorreu uma libertação de 13,5% da quercetina ao final de 48h e de 14,5% após 96h. Desta forma, e também devido ao fenómeno de superparamagnetismos, as MQC demonstram ser promissoras no direcionamento da quercetina para o local alvo (i.e. células cancerígenas).

2.9.1.2. Estudos *in vivo*

Estudo *in vivo* de nanopartículas magnéticas de quercetina ainda são escassos. No entanto, alguns autores (Najafabadi *et al.*, 2018; Boyer *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008) chegaram a conclusões semelhantes. Estes autores observaram que as nanopartículas magnéticas são seguras porque são eliminadas do corpo rapidamente e não se acumulam nos órgãos vitais. Adicionalmente, verificaram que estas nanopartículas são uma mais valia para o tratamento do cancro.

2.9.2. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs), também conhecidas como ouro coloidal, fazem parte das nanopartículas metálicas, sendo consideradas as mais estáveis deste grupo. Estas nanopartículas possuem uma coloração vermelha intensa que é proporcionalmente crescente com o aumento do seu tamanho (Daniel *et al.*, 2004; Malikova *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2011).

As nanopartículas podem ter forma triangular, hexagonal ou esférica. São ainda caracterizadas pela sua capacidade de associação a outras nanopartículas (dendrímeros) e a metais, formando as designadas *nanoshells* (Connor *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2004; Homberger *et al.*, 2010; Malikova *et al.*, 2002; Lévy *et al.*, 2009). O seu núcleo é inerte e não são tóxicas para as células (Lévy *et al.*, 2009).

A adição de ligandos à superfície das AuNPs, assim como, em todos os nanossistemas pretendendo funcionalizá-los, tem como objectivo (Connor *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2004; Homberger *et al.*, 2010; Malikova *et al.*, 2002; Lévy *et al.*, 2009): estabelecer uma maior afinidade para um alvo específico.

As AuNPs têm sido incorporadas na nanotecnologia devido às suas propriedades únicas e diversas. Podem ser utilizadas para diagnóstico e tratamento do cancro (Bajaj *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2008a,b; El-Sayed *et al.*, 2005).

2.9.2.1. Estudos *in vivo*

Com o objetivo de se comprovar as teorias estudadas, foram elaborados estudos *in vivo* que mostram a benéfica utilização das nanopartículas de ouro contendo quercetina, no tratamento do cancro.

Para o estudo realizado por Balakrishnan *et al.* (2016), foram encapsuladas moléculas de quercetina em nanopartículas de ouro e foram inoculadas as seguintes linhas celulares MCF- 7 e MDA- MB- 231 do cancro da mama em ratos fêmeas Sprague- Dawley. Com o objetivo de se verificar a eficácia anticancerígena, os animais foram divididos em 4 grupos e foram testados as várias formulações:

- Grupo 1: grupo controlo;
- Grupo 2: animais tratados com nanopartículas de ouro livre;
- Grupo3: animais com cancro da mama tratados com quercetina livre e
- Grupo 4: animais com cancro da mama tratados com nanopartículas de ouro com quercetina.

Quer para a linha celular MCF-7 quer para a MDA-MB-231 houve uma maior inibição das células cancerígenas quando os animais foram tratados com nanopartículas de ouro com quercetina, sendo tanto maior a inibição conforme a concentração da quercetina.

Não obstante, Chen *et al.* 2008 verificaram que as nanopartículas de ouro têm boa biocompatibilidade com as células humanas e não foi observada qualquer toxicidade em animais. Com o ensaio *in vivo* realizado por este autor, observou-se uma melhoria no direcionamento do fármaco para o local alvo e, conseqüente, acumulação nas células cancerígenas. Estes resultados demonstram o papel promissor destas nanopartículas como sistemas de veiculação de agentes com atividade anticancerígena, como é o caso da quercetina.

3. Toxicidade

A avaliação da toxicidade dos nanossistemas é feita através de estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Os nanossistemas podem provocar diversos efeitos adversos ao ser humano, os quais estão especificados na Tabela 4.

Os nanossistemas podem causar toxicidade para os humanos, quando passam para a corrente sanguínea. A citotoxicidade e genotoxicidade que causam, tem que ver com: o tamanho, a composição química, a forma, a capacidade agregação, a solubilidade e com a complexação com grupos funcionais ou químicos (Shinde *et al.*, 2012).

O primeiro mecanismo de toxicidade acontece quando os nanossistemas interagem diretamente como os cromossomas ou o DNA. Os nanossistemas têm capacidade de permear através dos poros durante a mitose e pode causar perturbações na replicação e transcrição do RNA (Schins and Knaapen 2007; Siegrist, K. *et al.*, 2014).

O segundo mecanismo de toxicidade tem a ver com o facto de se envolverem na produção de ROS e radicais livres, que pode levar a inflamação, stress oxidativo e, desta forma provocar danos nas membranas, proteínas e DNA. Quanto menor o tamanho da partícula, maior é a sua superfície específica e, conseqüentemente, maior é a sua atividade biológica e reatividade química, sendo mais fácil a sua permeação ao nível das membranas(Chakraborty *et al.* 2011; Yang *et al.*, 2010).

Tabela 4: Efeitos da toxicidade das nanopartículas (adaptada Nel *et al.*, 2006).

Efeito no nanossistemas	Efeito no Ser Humano
Stress oxidativo	Distúrbio mitocôndrial e inflamação
Disfunção no sistema endotelial	Acidente Vascular Cerebral, Trombose
Danos no DNA	Carcinogénese, mutagénese, metaplasia
Espécies reativas de oxigénio	Danos nas proteínas
Inflamação	Infiltração de células inflamatórias nos tecidos, fibrose

Captura pelo sistema reticuloendotelial	Efeitos assintomáticos no fígado, baço e nódulos e possibilidade de aumento de órgão ou disfunção. Isto deve-se ao facto do SRE ser constituído por células fagocitárias e ocorrendo alguma interação com as nanopartículas pode ser iniciada uma resposta imunitária.
Alterações no ciclo celular	Proliferação celular
Distúrbio nos fagócitos	Inflamação crónica, interferência na eliminação de agentes infecciosos
Distúrbio mitocondrial	Danos na membrana interna, mudanças na permeabilidade.

Os estudos de toxicidade *in vivo* são demorados e envolvem questões éticas com o uso de animais. Neste contexto, os ensaios *in vitro* são utilizados com mais frequência pela maioria dos investigadores. Os ensaios *in vitro* são mais rápidos, convenientes, menos dispendiosos e acima de tudo não envolvem quaisquer questões éticas. No entanto, a realização de ensaios *in vivo* é indispensável, uma vez que para o estudo de algumas propriedades é necessário que as células a ser estudadas mantenham as suas atividades vitais (Dhawan and Sharma, 2010).

4. Conclusão

A fitoterapia é uma prática terapêutica utilizada desde os tempos mais antigos. Nos últimos anos, tem sido verificado um interesse acrescido por esta área, uma vez que tem demonstrado ser eficaz no tratamento de várias doenças. Nesta dissertação ficaram comprovadas as potenciais propriedades benéficas da quercetina quando incorporada em nanossistemas, assim como a sua utilização no tratamento do cancro.

A nanotecnologia é uma área em expansão e tem-se verificado a sua aplicação na área da medicina. O desenvolvimento de nanossistemas tem explorado inúmeras alternativas no tratamento de doenças, assim como no aumento da eficácia de diversos fármacos, especificamente da quercetina.

Sendo o cancro e o seu tratamento uma das maiores preocupações dos tempos atuais, os estudos dos nanossistemas têm sido direcionados para esta área.

Ao longo da dissertação foram descritos vários estudos, realizados por diferentes autores e elaborados através de diferentes metodologias, de diferentes nanossistemas de que mostraram ser uma mais valia para a potenciação da ação da quercetina e do seu direcionamento para os locais alvo.

As características antioxidantes, antiproliferativas e anticancerígenas da quercetina foram potenciadas quando encapsulada nos nanossistemas, verificando-se uma melhoria na eficácia e segurança, nomeadamente diminuição da toxicidade e dos efeitos adversos.

Estes resultados foram verificados através de confirmação *in vitro* ou *in vivo*.

Nesta dissertação, a maior dificuldade foi encontrar ensaios *in vitro* e *in vivo* específicos para o cancro, que comprovassem ao mesmo tempo as vantagens da quercetina e dos nanossistemas.

5. Bibliografia

Aditya, N. *et al.* (2014). Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *Food Science and Technology*, 59(1), pp. 115–121.

Ajazuddin, S. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*, 81 (7), pp.680-689.

Allen, T. and Cullis, P. (2004). Drug delivery systems: entering the main-stream. *Science*, 303, pp.1818-1822.

Alexis, F. *et al.* (2008). Factors affecting the clearance and distribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*, 5 (4), pp. 505-515.

Ambudkar, S. *et al.* (2003). P-Glycoprotein: From genomics to mechanism. *Onco*, 22, pp. 7468-7485.

Anand, P. *et al.* (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises.

Andrade, F. *et al.* (2011). Nanocarriers for pulmonary administration of peptides and therapeutic proteins. *Nanomedicine*, 6(1), pp. 123–41.

Arbain, N. *et al.* (2018). In vitro evaluation of the inhalable loaded nanoemulsion for pulmonary delivery.

Attama, A., Momoh, M. and Builders, P. (2012). Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*.

Bajaj, A. *et al.* (2009). Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays. *Proc Nat Acad Sci USA*, 106, pp. 10912-10916.

- Baksi, R. *et al.* (2018). In vitro and in vivo anticancer efficacy potential of Quercetin loaded polymeric nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, pp. 1513–1526.
- Balakrishnan, S. *et al.* (2016). Gold nanoparticle–conjugated quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell proliferation*, 49 (6), pp. 678-697.
- Bangham, A., Standish, M. and Watkins, J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13, pp. 238-252.
- Baowen, Q. *et al.* (2010). A further investigation concerning correlation between anti-fibrotic effect of liposomal quercetin and inflammatory cytokines in pulmonary fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, 642(1-3), pp. 134–139.
- Barreto, A. *et al.* (2011). Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), pp. 6545–6553.
- Battaglia, L. *et al.* (2014). Techniques for the Preparation of Solid Lipid Nano and Microparticles. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*.
- Boyer, C. *et al.* (2010). The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Materials*, 2(1), pp. 23–30.
- Bromberg, L. (2008). Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 128(2), pp. 99–112.
- Burgess, D. and Hickey, A. (2002). Microsphere technology and applications. In Burgess, D. and Hickey, A. (Ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York, Marcel Dekker Inc., pp. 1783-1794.
- Butter, K. *et al.* (2005). Preparation and properties of colloidal iron dispersions. *J. Colloid Interface Sci*, 287, pp. 485–495.
- Cai, X. *et al.* (2013). Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. *Current Medicinal Chemistry*, 20, pp. 2572-2582.

Campos, C. *et al.* (2015). Quercetin Reduces Ehrlich Tumor-Induced Cancer Pain in Mice. *Analytical Cellular Pathology*, pp.1-18.

Chakraborty, S. *et al.* (2011). Antioxidative effect of folate-modified chitosan nanoparticles. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(1), pp. 29-38.

Challa, R. *et al.*(2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6, pp. E329-E357.

Chen, X. *et al.* (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm. Res.*, 22, pp. 892-901.

Chen, H. *et al.* (2011). Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today*, 16(7-8), pp. 354–360.

Cheng, Y. *et al.* (2008). Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. *Journal of the American Chemical Society*, 130(32), pp. 10643–10647.

Chertok, B. *et al.* (2008). Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29, pp. 487–496.

Chien, S. *et al.* (2009). Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 28, pp. 493-503.

Chorilli, M. *et al.* (2004). Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*, 88(4), pp.75-76.

Chorilli, M. *et al.* (2007). Estudo da estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína por turbidimetria. *Infarma*, 88(4), pp.194-199.

Chuan, L. *et al.* (2017). Biocompatible and biodegradable nanoparticles for enhancement of anti-cancer activities of phytochemicals. *Chin J Nat Med.*, 13(9), pp. 641-652.

Connor, E. *et al.* (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1, pp. 325-327.

- Cryan S. (2005). Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *The AAPS journal*, 7(1), pp. 20–41.
- Daniel, M. and Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104, pp. 293-346.
- Dhawan, A. and Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), pp. 589–605.
- Dhembre, G., Moon, R. and Kshirsagar, R. (2011). A review on polymeric micellar nanocarriers. *Int. J. Pharmaceut. Bio Sci.*, 2, pp. 109-116.
- Dian, L. *et al.* (2014). Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. *Nanoscale Research*, 9, pp. 684.
- Dubey, V. *et al.* (2007a). Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, pp. 398–405.
- Dubey, V. *et al.* (2007b). Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *J. Control. Release*, 123, pp. 148–154.
- El-Sayed, I. *et al.* (2005). Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett*, 5, pp. 829-834.
- Fang, R. *et al.* (2011). Design and characterization of protein-quercetin bioactive nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(19), pp.1-14.
- Figueiras, A. *et al.* (2007). Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, pp. 531-539.
- Gescher, A. *et al.* (1998) Suppression of tumour development by substances derived from the diet-mechanisms and clinical implications. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45, pp. 1-12.

- Gharib, R. *et al.* (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*, 129, pp. 175–186.
- Gibaud, S. *et al.* (2005). Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. *Int J Pharm*, 306, pp.107-121.
- Gibellini, L. *et al.* (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid. Based Comp. Alternat. Med.*, 591356.
- Ghosh, P. *et al.* (2008a). Efficient gene delivery vectors by tuning the surface charge density of amino acid-functionalized gold nanoparticles. *ACS Nano*, 2, pp. 2213-2218.
- Ghosh, P. *et al.* (2008b). Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, pp. 1307-1315.
- Granado-Serrano, A. *et al.* (2006). Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *The Journal of Nutrition*, 136(11), pp. 2715–2721.
- Gref, R. *et al.* (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(5153), pp. 1600–1603.
- Grenha, A. *et al.* (2008). Nanoand micro-particulate carriers for pulmonary drug delivery. In: Kumar MNVR, ed. *Handbook of Particulate Drug Delivery*. *American Scientific Publishers*, pp. 1–28.
- Grobmyer, S *et al.* (2011). The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 103(4), pp. 317–325.
- Guan, X. *et al.* (2016). Quercetin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles for the targeted treatment of liver cancer. *Drug Delivery*, 23(9), pp. 3307–3318.
- Heijnen, C. *et al.* (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In vitro*, 15, pp. 3-6.

Homberger, M. and Simon, U. (2010). On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine. *Philosophical Transitions of the Royal Society*, 368, pp. 1405-1453.

Honeywell-Nguyen, P. *et al.* (2002). Transdermal delivery of pergolide from surfactant-based elastic and rigid vesicles: characterization and in vitro transport studies. *Pharmacol. Res.*, 19, pp. 991–997.

Huang, J. *et al.* (2017). Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering*, 215, pp. 1–12.

Huang, S., Hsu, C. and Yen, G. (2006). Growth inhibitory effect of quercetin on SW 872 human liposarcoma cells. *Life Sci.*, 79, pp. 203-209.

Huang, R. *et al.* (2010). Immunossuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *J Immunol*, 184, 167-174.

Indap, M. *et al.* (2006). Quercetin: Antitumor Activity and Pharmacological Manipulations for Increased Therapeutic Gains. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 465-469.

Jahanshahi, M. *et al.* (2003). Fabrication by three-phase emulsification of pellicular adsorbents customized for liquid fluidized bed adsorption products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78, pp. 1111–1120.

Jahanshahi, M. *et al.* (2008). Applying the Taguchi method for optimized fabrication of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles as drug delivery vehicles. *African J*, 7, pp. 362-367.

Jain, A. *et al.* (2013). Lipid Colloidal Carriers for Improvement of Anticancer Activity of Orally Delivered Quercetin: Formulation, Characterization and Establishing In Vitro–In Vivo Advantage. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(7), pp.1230–1240.

Jambhekar, S. and Breen, P. (2016) Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov Today*, 21, pp. 363-368.

- Johari, J. *et al.* (2012). Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. *Int J Mol Sci*, 13(12), pp. 16785-16795.
- Joshi, U. *et al.* (2011). Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of Quercetin and its analogues. *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 2, pp. 1756-1766.
- Junghanns, J. and Muller, R. (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*, 3(3), pp. 295-309.
- Justino, G. *et al.* (2004). Plasma quercetin metabolites: Structure-antioxidant activity relationships. *Arch. Biochem. Biophys.*, 432, pp.109-121.
- Kale, R. *et al.* (2006). Decreased B16F10 melanoma growth and impaired tumour vascularization in BDF1 mice with quercetin-cyclodextrin binary system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(10), pp. 1351–1358.
- Keck, C. and Müller, R. (2006). Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. *Eur. Pharm. Biopharm.*, 62, pp. 3-16.
- Kim, M. *et al.* (2009). In vitro solubility, stability and permeability of novel quercetin–amino acid conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(3), pp. 1164–1171.
- Khoie, S. *et al.* (2012). Effect of Hyperthermia and Triblock Copolymeric Nanoparticles as Quercetin Carrier on DU145 Prostate Cancer Cells. *Current Nanoscience*, 8(5), pp. 690–696.
- Khonkarn, R. *et al.* (2011). PEG-OCL micelles for quercetin solubilization and inhibition of cancer cell growth. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, pp. 268-275.
- Kreuter, J. (1994). Nanoparticles. In: Kreuter, J. (Ed.). *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker. New York, NY, USA. pp. 219–342.
- Kumar, A. e Goyal R. (2008) Quercetin protects against acute immobilization stress-induced behaviors and biochemical alterations in mice. *J Med Food*, 11, pp. 469-473.
- Kumari, A., Yadav, S. eandYadav, S. (2010a). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery system . *Colloids Surf, B*, 75(1), pp. 1-18.

Kumari, A. *et al.* (2010b). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surf, B*, 80, pp. 184-192.

Lee, S., Zhang, Z. and Feng, S. (2007). Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-PGS) copolymers for protein drug delivery. *Biomaterials*, 28, pp. 2041-2050.

Lévy, R. *et al.* (2010). Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review. *Nano Reviews*, 1(1), pp. 4889.

Li, H. *et al.* (2009). Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133(3), pp. 238–244.

Liu, R. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*, 78, pp. 517S-520S.

Lohcharoenkal, W. *et al.* (2014). Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International*, pp.1-12.

Loftsson, T. and Brewster, M. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *J.Pharm Sci*, 85, pp. 1017-1025.

Lucida, H. *et al.* (2016). Preparation of Quercetin Nanocrystals by Planetary Ball Mill to Increase the Solubility and the Dissolution Profile. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (18), pp. 53-58.

Maghraby, G. *et al.* (2004). Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *Int. J. Pharm.* 276, pp.143–161.

Majoros, I. *et al.* (2005). Poly(amidoamine) Dendrimer-Based Multifunctional Engineered Nanodevice for Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(19), pp. 5892–5899.

Malikova, N. *et al.* (2002). Layer-by-Layer Assembled Mixed Spherical and Planar Gold Nanoparticles: Control of Interparticle Interactions. *Langmuir*, 18(9), pp. 3694–3697.

Martinez-Perez, C. *et al.* (2014). Novel flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 42, pp.1017-1042.

Men, K. *et al.* (2014). Nanoparticle-Delivered Quercetin for Cancer Therapy.

Miranda, J. *et al.*(2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian J Pharm Sci*, 47, pp. 665-681.

Muller, R. and Jan, M. (2006). Method and device for producing very fine particles and coating such particles. *Patent 009930*.

Muller, R., Gohla, S. and Keck, C. (2011). State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), pp.1–9.

Najafabadi, R. *et al.* (2018). Using superparamagnetic iron oxide nanoparticles to enhance bioavailability of quercetin in the intact rat brain. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1).

Narenjka, J. *et al.* (2011). The Effect of the Flavonoid Quercetin on Pain Sensation in Diabetic Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, 2 (3), pp. 51-57.

Nathiya, S., Durga, M. and Devasena, T. (2014). Quercetin, encapsulated quercetin and its application-a review. *Int J Pharmacy Pham Sci*, 6(10), pp. 20-26.

Nel, A. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(5761), pp. 622–627.

Oerlemans, C. *et al.* (2010). Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm. Res.*, 27, pp. 2569-2589.

Pandey, H., Rani, R. and Agarwal, V. (2016). Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(0).

Patravale, V., Date, A. and Kulkarni, R. (2004). Nanosuspension: a promising drug delivery strategy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, pp. 827-840.

- Patri, A. *et al.* (2004). Synthesis and *in Vitro* Testing of J591 Antibody–Dendrimer Conjugates for Targeted Prostate Cancer Therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 15(6), pp. 1174–1181.
- Pool, H. *et al.* (2012). Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, pp. 1-12.
- Pralhad, T. and Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried QC-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, pp. 333-339.
- Rajabi, S. *et al.* (2015). Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1).
- Reis, C. (2011). Micro e Nanopartículas Biomacromoleculares. *In: Souto, B. e Lopes, C. (Ed.). Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 199-237.
- Ren, X. *et al.* (2014). Iron oxide nanoparticle-based theranostics for cancer imaging and therapy. *Front. Chem. Sci. Eng.*, 8, pp. 253–264.
- Remsberg *et al.* (2008). Pharmacometrics of Pterostilbene: Preclinical Pharmacokinetics and Metabolism, Anticancer, Antiinflammatory, Antioxidant and Analgesic Activity. *Phytother*, 22, pp. 169–179.
- Rogério, A. *et al.* (2010). Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res*, 61, pp. 288-297.
- Santos, F. *et al.* (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of hyperproliferative skin diseases – a review. *Curr Nanosci*, 9, pp.159-167.
- Sappra, P. and Allen, T. (2003). Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.*, 42, pp. 439- 462.
- Schaffazick, S. *et al.* (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*, 26 (5), pp. 726-737.

Schins, R. and Knaapen, A. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal. Toxicol.*, 19, pp. 189–198.

Sergey, V. and Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins, *IntJ Pharm*, 453, pp.167–180.

Sharma, G. *et al.* (2014). Methoxy Poly(ethylene glycol)-Poly(lactide) Nanoparticles Encapsulating Quercetin Act as an Effective Anticancer Agent by Inducing Apoptosis in Breast Cancer. *Pharmaceutical Research*, 32, 2, pp. 723–735.

Shegokar, R., Singh, K. and Muller, R. (2011). Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles—From lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(2), pp. 461–470

Shi, X. *et al.* (2011). Multifunctional dendrimer/combretastatin A4 inclusion complexes enable in vitro targeted cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, pp.2337.

Shinde, S. *et al.* (2012). Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(4), pp.331–334.

Siegel, R. *et al.* (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67, pp. 7-30.

Siegrist, K. *et al.*, (2014). Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part. Fibre Toxicol*, 11, pp. 6.

Sihorkar, V. and Vyas, S. (2001). Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. *J. Pharm. Sci.*, 4, 2, pp. 138- 158.

Silva, A. *et al.* (2015a). Delivery systems for biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticals, *Curr Pharm Biotech* , 16(11), pp. 955-65.

Silva, A. *et al.* (2015b). Delivery systems for biopharmaceuticals. Part II: Liposomes, Micelles, Microemulsions and Dendrimers, *Curr Pharm Biotech* , 16(11), pp. 955-65.

Silva, A. *et al.* (2011). Nanopartículas Lipídicas. In: Souto, B. e Lopes, C. (Ed.). *Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 199-237.

- Silva, M. *et al.* (2002). Structure antioxidant activity relationships offlavonoids: a re-examination. *Free Radical Res.*, 36, pp. 1219-1227.
- Song, X. *et al.* (2008). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 2, pp. 445–453.
- Song, C. *et al.* (2012). A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 92, pp. 299–304.
- Soppimath, S. *et al.*, (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-2, pp. 1–20.
- Sun, M. *et al.* (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, pp. 15–24.
- Szejtli, J. *et al.* (1994). Medical applications of cyclodextrins. *Med Res Rev*, 14, pp. 353-386.
- Szejtli, J. (1988). Cyclodextrins; chemical and physical properties. *In: Szejtli, J. (Ed.) Cyclodextrin Technology*. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp.1-20.
- Szente, L. and Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci Technol*, 15, pp. 137-142.
- Tan, B. *et al.* (2012). Perorally active nanomicellar formulation of quercetin in the treatment of lung cancer. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 651.
- Touitou, E. *et al.* (1998). Novel lipid vesicular system for enhanced delivery. *J. Lipid Res.*, 8, pp. 113–114.
- Touitou, E. *et al.* (2001). Intracellular delivery mediated by ethosomal carrier. *Biomaterials*, 22, pp. 3055–3059.
- Vasanthi, H., ShriShriMal, N. and Das, D. (2012). Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. *Curr Med Chem.*, 19, pp. 2242-2251.

- Verma, R. and Garg, S. (2001). Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmaceutical Technology*, 25, pp. 1–14.
- Vijayababu, M. *et al.* (2006). Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol. Cell Biochem.*, 287, pp. 109–116.
- Wang, G. *et al.*, (2008). Preparation of BMP-2 containing bovine serum albumin (BSA) nanoparticles stabilized by polymer coating. *Pharmaceutical Research*, 25, 12, pp. 2896–2909.
- Wang, G. *et al.* (2012). Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 271.
- Wang, G. *et al.* (2016). Quercetin-loaded freeze-dried nanomicelles: Improving absorption and anti-glioma efficiency in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 235, pp. 276–290.
- Wang, S. *et al.* (2018). Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *Journal of Food Protection*, 81(1), pp. 68–78.
- Wei, Y. *et al.* (1994). Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Res.*, 54, pp. 4952-4957.
- Wissing, S, Kayser, O. e Muller, R. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, pp. 1257-1272.
- Wu, C. *et al.* (2014). Enhanced in vitro anticancer activity of quercetin mediated by functionalized CdTe QDs. *Science China Chemistry*, 57(11), pp. 1579–1588.
- Wu, T. *et al.* (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int J Pharm*, 346(1-2), pp.160-168.
- Xie, J. *et al.* (2016) Nanotechnology for the delivery of phytochemicals in cancer therapy.

Yallapu, M., Jaggi, M. and Chauhan, S. (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17, pp.71-80.

Yang, Z. *et al.* (2010). A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *J R Soc Interface*, pp. S411-S422.

Yu, J. *et al.* (2013). Magnetic nanoparticle-based cancer therapy. *Chin. Phys. B*, 22, pp. 027506.

Yuan, Z. (2006). Liposomal Quercetin Efficiently Suppresses Growth of Solid Tumors in Murine Models. *Clinical Cancer Research*, 12(10),pp. 3193–3199.

Zandi, K. *et al.* (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology*, 8, pp. 560.

Zhang, Y. *et al.* (2007). Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), pp. 891–897.

Zhao, M. *et al.* (2017). Quercetin-loaded mixed micelles exhibit enhanced cytotoxic efficacy in non-small cell lung cancer in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*.

Zhu, X. *et al.* (2016). The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), pp. 623–632.

Zubair, H. *et al.* (2017). Cancer Chemoprevention by Phytochemicals: Nature's Healing Touch. *Molecules*, 22.