

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**NANOEMULSÃO CONTENDO QUERCETINA: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E DE
PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS**

GABRIELA HÄDRICH

Rio Grande, 2014

GABRIELA HÄDRICH

**NANOEMULSÃO CONTENDO QUERCETINA: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIOXIDANTE E DE
PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Cristiana Lima Dora

Rio Grande, 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Cândida e Werner e a minha irmã
Julia, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Universidade do Rio Grande pela oportunidade de estudo,
Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por contribuírem com meu aperfeiçoamento profissional,

A minha orientadora, Prof. Dra. Cristiana Lima Dora, por todo conhecimento, companheirismo e amizade transmitida durante toda a jornada e principalmente por acreditar em mim. Além disto, pelo seu otimismo, suas críticas construtivas e toda a sua disponibilidade que tornaram sem dúvida mais fácil a elaboração deste trabalho.

A Prof. Dra. Ana Luiza Muccillo Baisch por desde muito tempo contribuir para a minha formação, por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto, por contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) do governo federal pela bolsa concedida,

A minha colega de laboratório Marília Garcez Correa da Silva por contribuir significativamente em todas as etapas da minha jornada, auxiliando tanto na execução dos experimentos quanto na escrita desta dissertação,

Aos meus colegas de laboratório, Gustavo Richter Vaz e Michele Maidana, excelentes profissionais, por me ajudarem de forma substancial na realização dos experimentos e por tornarem os longos dias mais agradáveis,

Aos alunos de iniciação científica Fernanda Soares, Breno Hädrich Pavão Xavier, Carolina Veloso, Fernanda Sousa e Guilherme Sousa por exercerem um papel fundamental na execução do projeto. Em especial a Samantha Oliveira Monteiro por seu admirável desempenho, exercendo sempre uma grandiosa contribuição.

Aos colegas do Laboratório de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos (LEFT), Prof. Dr. Flavio Manuel Rodrigues, Krissia Almeida, Edariane Menestrino (Nana), Alexandre Fonseca e a técnica Gianni Peraza pela ajuda valiosa em todo o decorrer do trabalho, vocês foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

Aos colegas do Centro de Microscopia da Região-Sul (CEME-Sul) Carol, Érica, Rud e Milene pela agradável companhia, pelas conversas e por estarem sempre dispostos a ajudar,

Aos professores Alexandre Rogério, Vânia Rodrigues de Lima e Eliana Furlong por aceitarem ser banca da minha qualificação, pelos seus ensinamentos e por permitirem a execução de parte deste trabalho em seus laboratórios,

Ao meu noivo, Carlos Puttini por todo amor e dedicação incondicionais em todos os momentos,

Aos meus pais, Cândida e Werner pela minha vida, por investirem na minha formação pessoal e profissional, pelo apoio em todas as etapas, juntamente com a minha irmã Julia principalmente pela compreensão da ausência que muitas vezes o trabalho exige.

"Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais, que vêm de muito longe com a origem do indivíduo, e de tão perto como o pulsar do coração". (Pablo Neruda).

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

“As tarefas que nos propomos, devem conter exigências que pareçam ir além de nossas forças. Caso contrário, não descobrimos nosso poder, nem conhecemos nossas energias escondidas e assim deixamos de crescer.”

Leonardo Boff

RESUMO

A inflamação é um mecanismo de defesa natural do organismo a qualquer agressão eventualmente sofrida, entretanto, mediante a persistência da causa subjacente, o resultado é uma inflamação crônica, sendo lesiva ou deletéria. Existem vários anti-inflamatórios no mercado, porém estes apresentam uma série de efeitos colaterais. Atualmente, o interesse sobre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio aumentou, uma vez que estudos revelaram sua relação com as doenças inflamatórias, tornando os fármacos antioxidantes interessantes para este tipo de tratamento. A quercetina (QU) é um composto de origem natural, que apresenta diversas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. No entanto, não é utilizado na prática médica em decorrência de sua baixa biodisponibilidade, que está relacionada a sua baixa solubilidade e ao seu extenso metabolismo intestinal e hepático. Neste sentido, a utilização de nanocarreadores para a liberação de fármacos, como as nanoemulsões (NE), parece ser interessante, uma vez que esses sistemas têm a capacidade de melhorar a biodisponibilidade de fármacos quando administrados por via oral. O objetivo deste trabalho é realizar um estudo de formulação para aumentar a quantidade de QU incorporada em uma NE previamente desenvolvida pelo e avaliar seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e os parâmetros toxicológicos *in vivo*. A QU-NE foi produzida pela técnica de difusão do solvente a quente associada à temperatura de inversão de fases e caracterizada morfológica e físico-quimicamente. A avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante foi realizada pelo teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos e peroxidação lipídica, respectivamente, em ratos. A QU-NE foi administrada por via intragástrica, uma vez ao dia durante cinco dias antes do teste, pela via intragástrica (20 mg/kg). A toxicidade da NE foi avaliada pelas análises hematológicas, bioquímicas e de mutagenicidade. Os resultados demonstraram que, com a variação adequada dos componentes da formulação, é possível encapsular altas quantidades de quercetina (1,5 mg/ml), mantendo a formulação estável, com tamanho e PDI de aproximadamente 20 nm e 0,2, respectivamente. No ensaio de avaliação das atividades anti-inflamatória e antioxidante foi verificado que a administração de QU-NE na dose testada foi capaz de reduzir o edema e diminuir a peroxidação lipídica quando comparado com o controle e com a quercetina na forma livre. Além disso, a formulação não apresentou toxicidade para os parâmetros testados. Esses resultados sugerem que a NE contendo quercetina desenvolvida nesse trabalho pode ser promissora para o tratamento de doenças de origem inflamatória.

Palavras chave: quercetina; nanoemulsão; inflamação; atividade antioxidante; toxicidade.

ABSTRACT

Inflammation is a body natural defense mechanism to any suffered aggression. However, the persistence of the underlying cause may lead to a chronic inflammation that could be damaging. To treat this pathology, a number of anti-inflammatory drugs are commercially available, but they do have a number of side effects. There is a growing interest in the understanding of reactive species of oxygen and nitrogen as the target for antioxidant drugs since studies showed their relationship with inflammatory diseases. The flavonoid quercetin (QU) is a naturally occurring compound that has several biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant and antitumor. However, the oral bioavailability of this compound is very low due to high pre-systemic metabolism in the colon and liver and its low water solubility. In this context, the development of quercetin-loaded nanocarriers can be considered an interesting approach to improve the QU oral bioavailability and to take advantage of its therapeutic properties in the clinical setting. In this work, a formulation study was carried out to increase the amount of QU on a previously developed nanoemulsion (NE) and to evaluate its potential anti-inflammatory, antioxidant and toxicological parameters. NE was produced by the hot solvent diffusion technique associated with phase inversion temperature. The morphological and physic-chemistry characteristics of the nanocarriers were correlated with the NE ability to incorporate and release QU. The anti-inflammatory and antioxidant activities were tested through the paw edema induced by carrageenan and lipid peroxidation, respectively. The toxicity was assessed by hematological, biochemical and mutagenic evaluations. The results show that the quantity variation of the compounds allow higher amounts of quercetin (1.5 mg/ml) to be encapsulated keeping the NE stability and its medium size to about 20 nm. The formulations exhibit negative zeta potential values near zero because of the steric stabilization created by the surfactant used. The release profiles exhibit biphasic kinetics with a fast release in the first 8 hours then followed by a sustained release for 24 hours. The results of anti-inflammatory and antioxidant assays show that the oral treatment with QU-NE decreased the paw edema and the lipid peroxidation when compared to the control group and free drug. Also, no toxicity was observed for the parameters tested. These results suggest that the nanoemulsion containing quercetin developed in this study is a promising treatment for certain inflammatory diseases

Keywords : quercetin; nanoemulsion; inflammation, antioxidant activity ,toxicity.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão bibliográfica.....	20
2.1. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	20
2.1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	20
2.1.2. Defesas antioxidantes.....	27
2.1.3. Estresse oxidativo.....	31
2.2. Inflamação e estresse oxidativo.....	33
2.2.1. Processo inflamatório.....	33
2.2.2. Estresse oxidativo e a resposta inflamatória.....	36
2.3. Quercetina.....	40
2.3.1. Características químicas e físico-químicas.....	41
2.3.2. Propriedades farmacocinéticas e farmacológicas.....	42
2.3.3. Toxicidade da quercetina.....	45
2.4. Nanocarreadores de fármacos.....	47
2.4.1. Sistemas nanoemulsionados.....	51
2.4.2. Nanocarreadores lipídicos contendo quercetina para administração por via oral.....	55
3. Objetivos.....	58
3.1. Objetivos específicos.....	58
4. Referências bibliográficas.....	59
Artigo 1. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies.....	69
<i>Abstract.....</i>	<i>1</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>1</i>
<i>Methods.....</i>	<i>1</i>
<i>Preparation of QU-NE</i>	<i>1</i>
<i>Size and zeta potential measurements.....</i>	<i>1</i>
<i>Transmission Electron Microscopy.....</i>	<i>2</i>
<i>Determination of QU concentration.....</i>	<i>2</i>
<i>In vitro release studies.....</i>	<i>3</i>
<i>HATR-FTIR measurements.....</i>	<i>3</i>

<i>NMR spectroscopy</i>	3
Results	3
<i>Preparation and characterization of the QU-NE</i>	3
<i>Size and zeta potential measurements</i>	3
<i>Transmission electron microscopy</i>	3
<i>Determination of QU concentration in the NEs</i>	4
<i>In vitro release studies</i>	4
<i>Molecular interaction studies</i>	4
<i>HATR-FTIR measurements</i>	4
<i>NMR spectroscopy</i>	5
Discussion	6
Conclusion	8
Declaration of interest	8
References	8
Artigo 2. Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats	79
<i>Abstract</i>	3
<i>Introduction</i>	4
<i>Material and Methods</i>	4
<i>Material</i>	4
<i>Preparation and Characterization of the Quercetin-Loaded Nanosized Emulsion and Quercetin Suspension</i>	4
<i>Size and Zeta potential measurements</i>	5
<i>Determination of Quercetin Concentration and Entrapment Efficiency in the Lipid Nanocarriers</i>	5
<i>In Vitro Release Studies</i>	5
<i>In Vitro Intestinal Permeability</i>	5
<i>In Vivo anti-oedematous Activity</i>	6
<i>Animals</i>	6
<i>Experimental design</i>	6
<i>Carrageenan-induced Hind Paw Edema</i>	6
<i>Immunohistochemistry</i>	6
<i>Antioxidant Activity</i>	6

<i>Toxicological Analysis</i>	7
<i>Biochemical and Hematological Analysis</i>	7
<i>Micronucleous Assay</i>	7
<i>Statistical Analysis</i>	7
<i>Results</i>	7
<i>Preparation and Characterization of the QU-NE</i>	7
<i>In Vitro Intestinal Permeability</i>	7
<i>In Vivo anti-oedematous Activity</i>	7
<i>Effect of QU-NE on the NF-κB Activation in Rat Hind Paw Edema</i>	8
<i>Antioxidant Activity</i>	8
<i>Toxicological Analysis</i>	8
<i>DISCUSSION</i>	8
<i>CONCLUSION</i>	11
<i>ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES</i>	12
<i>COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS</i>	12
<i>REFERENCES</i>	12

Lista de Tabelas

Revisão bibliográfica

Tabela 1. Principais espécies reativas de O₂ e N₂ nas formas de radicais e não radicais..... 23

Tabela 2. Classificação dos antioxidantes..... 28

Artigo 1..... 69

Table 1. Composition of the nanocarriers as prepared through the hot solvent diffusion technique associated with the phase inversion temperature method..... 2

Table 2. Physico-chemical characterization of quercetin-loaded nanocarriers..... 4

Table 3. Kinetics parameters obtained from QU release profile..... 5

Artigo 2..... 79

Table I Physico-chemical Characteristics of Nanosized Emulsion..... 8

Table II Effect of Quercetin Nanosized Emulsion, Free Quercetin and Diclofenac on the Carrageenan-induced Paw Edema Size..... 9

Table III Biochemical and Hematological Analysis..... 11

Lista de Figuras

Revisão bibliográfica

Figura 1. Redução tetravalente da molécula de O ₂ . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (ERO), como O ₂ ^{•-} (ânion superóxido), H ₂ O ₂ (peróxido de hidrogênio), OH [•] (radical hidroxila).....	22
Figura 2. Esquemas das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas (em cinza).....	29
Figura 3: (A) catecol, (B) estrutura química da quercetina.....	31
Figura 4. Componentes das vias inflamatórias.....	35
Figura 5: Estimulação de neutrófilos.....	37
Figura 6: Representação esquemática de lipossomas e nanopartículas lipídicas. (A) lipossoma: encapsulando composto hidrofílico (representado por quadrados cinzas) e lipofílico (representado por esferas pretas na porção lipídica dos fosfolipídios) e (B) nanopartícula lipídica.....	51
Artigo 1	69
<i>Figure 1. Visual inspection of nanosized emulsions.....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 2. TEM Images of nanocarriers QU-NE (a and b) and QU-NE 8 (c and d): (a and c) negative staining and (b and d) cryo-TEM. The inset in (b) is a magnified view of the particles. All scale bars: 50 nm.....</i>	<i>5</i>
<i>Figure 3. Cumulative percentage of QU released from nanocarriers.....</i>	<i>5</i>
<i>Figure 4. HATR-FTIR spectra of unloaded-NE and loaded with quercetin at 1.0 mg/ml (QU-NE 3) as well as at 1.5 mg/ml (QU-NE 8). Zooms of FTIR phosphate antisymmetric stretching vibration (U_s PO₂) and acyl chain methylenes symmetric stretching vibration (U_s CH₂) bands, related to unloaded-NE (A), nanocarriers containing quercetin 1 mg/ml, QU-NE 3 (B) and nanocarriers containing quercetin 1.5 mg/ml, QU-NE 8 (C) are also showed. Interferograms were obtained from the average of 50 scans, with a resolution of 2 cm⁻¹, in a frequency range of 400–4000 cm⁻¹.....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 5. Recovery of methylene protons FID (free induction decay) signals after several inversion pulses for unloaded NE (open squares) and</i>	

loaded with quercetin 1.5 mg/ml (QU-NE 8, open circles). From these curves, the proton spin-lattice relaxation time ($^1\text{H } T_1$) value for each sample was calculated. The $^1\text{H } T_1$ data were reached at 60 MHz, 23°C, using a t range of 0.2–102.4 s.....	7
Artigo 2.....	79
Fig. 1 Cumulative percentage of QU released from nanocarriers.....	8
Fig. 2 Activity anti-edematous of diclofenac, free quercetin (QUSUSP), unloaded nanosized emulsion (NE), and quercetin nanosized emulsion (QU-NE), on carrageenan-induced mouse paw oedema. Rats were evaluated for paw edema at 1, 2, and 3 h postcarrageenan injection. Results were expressed as the edema size (ml). Each point represents the mean \pm SEM of six rats. ***Statistically significant compared with control group at $p < 0.001$	9
Fig. 3 Quercetin nanosized emulsion reduced the NF- κ B expression in the paw stimulated with carrageenan. Rats were treated with saline or carrageenan (1% per paw) and then the paws were isolated at the 3 h. Rats were treated orally with unloaded nanosized emulsion (NE), free quercetin (QU-SUSP), quercetin nanosized emulsions (QU-NE) (20 mg kg^{-1} , p.o.) and diclofenac (10 mg kg^{-1} , i.p.), 90 min before carrageenan injection and then immunohistochemistry was performed for NF- κ B. Representative images of phospo-p65 NF- κ B imunohistochemistry staining of saline (a), carrageenan (b), NE (c) QU-SUSP (d), QU-NE (e) and Diclofenac (f) were stained with periodic acid-Schiff (original magnifications, $\times 200$).....	10
Fig. 4 Effect of diclofenac, free quercetin (QU-SUSP), unloaded nanosized emulsion (NE), and quercetin nanosized emulsion (QUNE) on the lipid peroxidation. Each point represents the mean \pm SEM of six rats. **Statistically significant compared with control group at $p < 0.01$	10

1. INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma reação microvascular induzida por um agente agressor aos tecidos e, conseqüentemente, movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas para o espaço extravascular. É um mecanismo de defesa natural do organismo a qualquer agressão eventualmente sofrida, entretanto, mediante a persistência da causa subjacente, o resultado é uma inflamação crônica, sendo lesiva ou deletéria. Um número significativo de doenças que requerem tratamento farmacológico envolve a inflamação, dentre elas podemos destacar a asma, a doença inflamatória intestinal, a artrite reumatóide, a glomerulonefrite, o câncer, entre outras (CRIELAARD et al., 2012; COLLNOT et al., 2012; SUBRAMANIAN et al., 2008).

Entre os medicamentos mais utilizados para o tratamento desta patologia destacam-se os anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) e os não esteroidais (AINES). Os glicocorticóides inibem diversas etapas na geração dos eicosanóides, incluindo a etapa da síntese da fosfolipase A2. Entretanto, o uso crônico destes está associado a numerosos efeitos adversos graves, incluindo osteoporose, consunção muscular e anormalidade do metabolismo dos carboidratos. Já os AINES inibem a enzima ciclooxigenase, bloqueando a primeira etapa da síntese de prostanóides. No entanto, o uso crônico destes medicamentos também pode acarretar efeitos adversos graves como esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal. Assim, observa-se que grande parte dos anti-inflamatórios atualmente utilizados na clínica possuem efeitos indesejáveis significativos. Desta forma, a pesquisa de novas moléculas, assim como de carreadores de fármacos, pode contribuir para o avanço do desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios mais seguros e eficazes (LONGUI, 2007; HILÁRIO; TERRERI, 2006).

A partir da década de 80 cresceu o interesse sobre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, uma vez que estudos revelaram sua relação com as doenças inflamatórias (SIES, 1997; WISEMAN et al., 1995). A inflamação é associada aos danos causados pelas espécies reativas que causam alterações nos níveis de radicais livres, provocando dano epitelial, ativação de proteases e

dano de outros tipos celulares causando lesão tissular. Desta forma, o uso de fármacos anti-oxidantes pode ser interessante para o tratamento da inflamação, especialmente se estes compostos forem capazes de diminuir e/ou não apresentarem efeitos adversos significativos como os medicamentos disponíveis atualmente.

Nos últimos anos, houve um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, os quais visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CALIXTO et al., 2004). Entre eles, os flavonoides têm sido reconhecidos pelas suas propriedades medicinais, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (AMIC et al., 2014; HAVSTEEN, 2002).

A quercetina (QU) é um dos flavonoides mais comuns presentes na natureza e tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, devido a suas propriedades farmacológicas (RAVICHANDRAN et al., 2014; CORNARD & MERLIN, 2002). No entanto, este composto apresenta uma biodisponibilidade muito baixa (inferior a 17% em ratos e até 1% em humanos) por apresentar baixa solubilidade em água e sofrer um extenso metabolismo no intestino e no fígado, fazendo com que a sua forma inalterada não seja detectada no sangue após administração por via oral (MOON et al., 2008; WALLE et al., 2005; SOOBRAATTEE et al., 2005; COMALADA et al., 2005). Assim, os efeitos biológicos da QU determinados *in vitro* não são reproduzíveis nas condições *in vivo*, o que dificultada a sua aplicação como um agente terapêutico (LIU et al., 2014; CHAN et al., 2003; KHALED et al., 2003; HOLLMAN et al., 1996; GUGLER et al., 1975).

Neste sentido, a utilização de nanocarreadores para a liberação de fármacos parece ser interessante, uma vez que somente o desenvolvimento de novos fármacos não tem sido suficiente para sustentar as necessidades terapêuticas. Fatores como a baixa solubilidade, alta toxicidade, concentração plasmática insuficiente, elevado grau de metabolismo, distribuição inadequada em tecidos não alvos, assim como esquemas terapêuticos de longa duração, comprometem a eficácia do tratamento. Desta forma, a escolha da forma farmacêutica mais adequada a um fármaco envolve o desenvolvimento de um tipo de sistema que possibilite o maior potencial terapêutico deste. Além disso,

a via de administração a qual o sistema será destinado também é um fator importante a ser considerado (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Recentemente, vários tipos de nanocarreadores lipídicos contendo quercetina foram desenvolvidos, sendo um sistema nanoemulsionado, o carreador mais promissor (DORA et al., 2011). Estes sistemas têm a capacidade de melhorar a biodisponibilidade de fármacos quando administrados por via oral, pois permitem aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos em espécies coloidais produzidas após digestão dos lipídios, além de interferir nos processos de absorção e metabolismo no interior dos enterócitos. Além disso, possuem a vantagem de apresentar os fármacos em um estado altamente disperso, com elevada superfície de contato para absorção. A elevada área interfacial acelera a ação das lipases e, conseqüentemente, a liberação do fármaco e/ou geração de micelas e vesículas (CHAKRABORTY et al., 2009).

Ensaio avaliando a atividade farmacológica da QU nanoemulsionada (QU-NE), foram realizados em modelo de asma alérgica murina. Neste estudo foi demonstrado que a QU-NE, administrada por via oral, na dose de 10 mg/kg, reduziu o recrutamento de eosinófilos e as concentrações de IL-4 e IL-5 no lavado broncoalveolar. Além disso, reduziu a expressão da P-selectina nos pulmões e a secreção de muco, provavelmente ao modular o fator de transcrição NF- κ B. Ao mesmo tempo, estes efeitos não foram observados após a administração de uma suspensão de QU em camundongos, na mesma dose, indicando o aumento da absorção da quercetina no nanocarreador. O aumento da biodisponibilidade deste composto polifenólico foi comprovado após identificação por HPLC-MS dos metabólitos da QU no plasma de ratos tratados, sendo os mesmos detectados somente após a administração da QU-NE (ROGERIO et al., 2010).

Devido ao potencial observado nos estudos anteriores, é importante dar continuidade ao desenvolvimento deste nanocarreador, assim como avaliar sua atividade farmacológica em outros modelos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é otimizar o sistema nanoemulsionado contendo quercetina desenvolvido anteriormente, na tentativa de aumentar a quantidade de fármaco encapsulado e avaliar as atividades anti-inflamatória e antioxidante, assim

como os parâmetros toxicológicos, em modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O estresse oxidativo foi definido por Helmut Sies, em 1985, como um desequilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes. No entanto, existem atualmente evidências consideráveis mostrando que este conceito é limitado a afirmar que sistemas biológicos respondem da mesma forma para uma diminuição de pró-oxidantes e um aumento de antioxidantes. Se o mecanismo do estresse oxidativo fosse somente limitado ao dano dos radicais livres às macromoléculas, este conceito poderia ser adequado, porém sabe-se que as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio possuem um papel vital na sinalização redox, sendo responsáveis pela modulação de vias de transdução de sinais, do balanço redox e de seus controles. Assim, têm sido sugerido que estresse oxidativo seja definido como uma desregulação da sinalização e do controle redox, criando a possibilidade de haver estresse oxidativo mesmo quando há apenas a alteração do circuito redox, sem a ocorrência de desbalanço redox global (JONES, 2006). Primeiramente, serão abordadas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes para que, em seguida, possa ser traçado um paralelo entre as atividades anti-inflamatória e antioxidante.

2.1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

O oxigênio compõe 21% dos gases atmosféricos e imprescindível para a respiração dos seres aeróbicos, através da obtenção de energia na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, que gera 80% da adenosina trifosfato (ATP) para as células. Além disto, 65% do corpo do homem adulto é composto por oxigênio, a maior parte dentro da molécula de água (SEN & PACKER, 2000). No entanto, o oxigênio molecular pode atingir condição tóxica através de suas espécies intermediárias, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), pois estas reagem com biomoléculas em diversos processos patológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Assim, teoricamente todo o componente celular está sujeito a sofrer danos oxidativos, pois pode reagir

tanto com o oxigênio quanto com o nitrogênio. Espécie reativa é um termo coletivo, que inclui as espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como pode ser observado na tabela 1. “Reativo” não é sempre um termo apropriado, uma vez que existem ERO e ERN pouco reativas não radicalares (pois não possuem um elétron desemparelhado no seu último orbital) e atuam quimicamente como um redutor suave (HALLIWELL, 2001).

O metabolismo energético celular, particularmente devido à atividade metabólica mitocondrial, faz o aproveitamento da energia contida nos alimentos através de uma sequência de reações químicas, finalizando com a produção de moléculas de ATP. Este processo se desenvolve em duas etapas: 1) Glicólise – a molécula de glicose origina duas moléculas de ácido pirúvico; 2) Ciclo de Krebs – o ácido pirúvico entra na mitocôndria, transformando-se em acetilcoenzima A, o qual por sua vez, após uma série de reações envolvendo hidrogênio e oxigênio, liberam CO_2 e H_2O ; e energia para a síntese de ATP. Desta forma, o oxigênio, por possuir no estado fundamental dois elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos, age como oxidante (combustão por oxigênio), recebendo elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e da flavina adenina nicotinamida reduzida (FADH) que atuam como redutores (ROVER et al., 2000).

Este processo de transporte de elétrons na mitocôndria, que finaliza com a redução do O_2 e formação de H_2O (Figura 1), pode se constituir na maior fonte endógena de ERO (MURRAY, 1990). A redução do O_2 a H_2O utiliza duas rotas: 1) Citocromo C-Oxidase – formação de H_2O após receber simultaneamente 4 elétrons (redução tetravalente). Acredita-se que em torno de 95% do oxigênio metabolizado na mitocôndria utiliza esta via; 2) Oxigenase – formação de espécies intermediárias reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (redução sequencial univalente). Em torno de 2 - 5% do oxigênio metabolizado na mitocôndria pode usar essa rota.

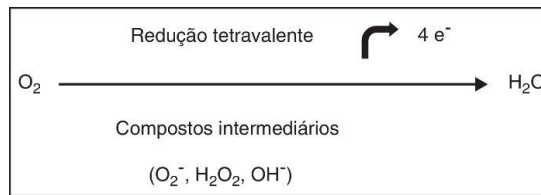


Figura 1. Redução tetravalente da molécula de O_2 . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (ERO), como $O_2^{\cdot-}$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $OH^{\cdot-}$ (radical hidroxila) (Adaptado de Franco, 2007).

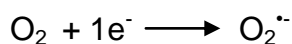
Entre as espécies reativas ou formas intermediárias existem os elementos mais instáveis e reativos conhecidos como radicais livres (RL). De maneira simples, o termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica ou orbital atômico mais externo, formados em um cenário de reações de óxido-redução (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A rotação de um elétron ímpar (livre) determina a atração para um campo magnético, peculiaridade que confere à espécie alta instabilidade química e tendência à reatividade inespecífica.

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos. Os mecanismos de geração de RLs ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (BARBOSA et. al., 2010).

Tabela 1. Principais espécies reativas de O₂ e N₂ nas formas de radicais e não radicais (Adaptada de HALLIWELL, 2001).

Espécies reativas de oxigênio (ERO)	
Radicais	Não radicais
Superóxido (O ₂ ^{•-})	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)
Hidroxil (•OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxil (RO ₂ •)	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxil (RO•)	Ozônio (O ₃)
Hidroperoxil (HO ₂ •)	Oxigênio singlete (¹ O ₂)
Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	
Radicais	Não radicais
Óxido nítrico (NO•)	Peroxinitrito (ONOO•)
Dióxido de nitrogênio (NO ₂ •)	Alquil peroxinitrito (ROONO)

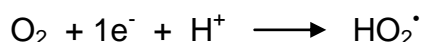
As espécies reativas de oxigênio são formadas através de redução parcial do oxigênio até água, através de sucessivas reações. A transferência de um elétron para o O₂ produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido (O₂^{•-}) (Reação 1), que ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação dos neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Quanto maior o tempo de meia-vida das ERO ou ERN, maior sua capacidade de difusão intra e extra celular (PRYOR, 1986), o ânion superóxido possui tempo de meia-vida média de 1x10⁻⁶ segundos e, apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas e não ter habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, limitando sua ação ao compartimento onde é produzido, tem sido observada lesão biológica secundária causada pelos sistemas geradores de O₂^{•-} (seja enzimático, fagocítico ou químico) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).



Reação 1: Formação do radical ânion superóxido.

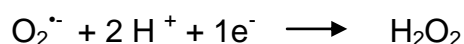
O radical hidroperoxil (HO₂•) representa a forma protonada do radical superóxido (Reação 2). Existem evidências que o hidroperoxil é mais reativo

que o superóxido, por sua maior facilidade de iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA; MATSURABA, 1997).



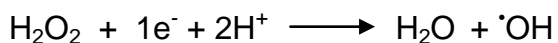
Reação 2: Formação do radical hidroperóxil

Outro metabólito do oxigênio é o radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação 3) que apesar de não ser um RL, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, ele possui meia vida longa (superior a 10^{-2} segundos) e é capaz de atravessar as membranas celulares e reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++5} , apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta capacidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (FANG et al., 2002).



Reação 3: Formação do peróxido de hidrogênio

Entre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil ($^\bullet\text{OH}$) (Reação 4) é a molécula mais reativa e está presente na maioria dos fenômenos biológicos. Podemos citar como ações citotóxicas, o dano celular por radiação ionizante, a destruição de micro-organismos por fagócitos ativados entre outros (COHEN, 1978; KLEINVELD et. al., 1989). Do ponto de vista benéfico, fisiologicamente ele é intermediário na biossíntese das prostaglandinas e de leucotrienos, por intermédio da cascata do ácido araquidônico, mediadores da dor. A combinação extremamente rápida do $^\bullet\text{OH}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxil for produzido próximo ao ADN e ele estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do ADN. Além disso, o hidroxil pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidril (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).



Reação 4: Formação do radical hidroxil

O radical hidroxil também pode ser formado quando o H₂O₂ reage com íons ferro ou cobre (Reação de Fenton) (Reação 6) (FERREIRA; MATSURABA, 1997; BARBOSA et. al., 2010).



Reação 6: Reação de Fenton

Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H₂O₂ e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxil (Reação de Haber-Weiss) (Reação 7).

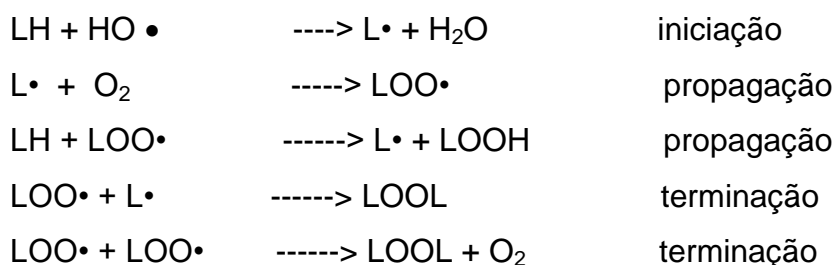


Reação 7: Reação de Haber-Weiss

O radical $\bullet\text{OH}$, por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação (LPO). A LPO pode ser definida como a ação oxidativa de lipídios poli-insaturados, ocasionando alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, sendo o radical hidroxil o principal iniciador de tal processo. Porém o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, pode também iniciar esse processo. Este radical livre é produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações e reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídios da membrana (DROGE, 2002).

Nem sempre os processos de LPO são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo, uma vez que a perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), podem culminar em morte celular. Além disso, o estresse oxidativo pode também estar associado aos mecanismos de envelhecimento, câncer, exacerbação de toxicidade por xenobióticos, entre outras patologias (FERREIRA; MATSURABA, 1997).

O mecanismo de LPO é um processo complexo que envolve a propagação de radicais lipídicos, o aumento de oxigênio, o rearranjo das ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados e a eventual destruição das membranas lipídicas, produzindo uma variedade de produtos de decomposição. Mais detalhadamente, o processo é iniciado quando o radical $\cdot\text{OH}$ captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo. Este ácido graxo agora se torna radical alquil ($\text{L}\cdot$), e este, com a presença de O_2 , gera radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que por sua vez é muito instável e captura um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente (reação de propagação na LPO) (PRYOR, 1986). Divide-se a lipoperoxidação em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Reação 5).



Reação 5 : Reação de peroxidação lipídica.

A participação do íon ferro também é considerada fator determinante no processo de LPO, ressaltando-se a importância da relação equimolar entre $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, para possibilitar a iniciação desse processo. Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais $\text{LO}\cdot$ e $\text{LO}_2\cdot$, que, por serem potencialmente reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas de acordo com a valência do ferro.

Além disso, é importante salientar que existem radicais que contêm nitrogênio, conhecidos por espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Dentre as ERNs, o radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) é produzido pela oxidação de um grupamento terminal guanido-nitroso do átomo de nitrogênio da L-arginina (PALMER et. al., 1988; DRÖGE, 2002). Este processo é catalisado pela enzima NO sintetase (NOS). Dependendo do microambiente onde este radical se encontra, ele pode se converter em outras ERNs. O óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e o

dióxido de nitrogênio (NO_2^\cdot) possuem número ímpar de elétrons e são considerados radicais livres. O óxido nítrico é um gás e um fraco agente redutor que possui efeitos fisiológicos importantes, tais como relaxamento da musculatura lisa e regulação da pressão arterial. Trata-se de uma molécula microbicida produzida pelos macrófagos ativados, é um fator importante na agregação plaquetária e no balanço entre crescimento e diferenciação das células vasculares da musculatura lisa, entre outras funções (PALMER et. al., 1987; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003).

Quando o O_2^\cdot reage com o NO^\cdot se forma o peroxinitrito (ONOO^-), que é um ERN, tipo não-radical livre, com poderosa ação oxidante, que atua principalmente na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), como o colesterol. No processo inflamatório, é capaz de nitrar e oxidar biomoléculas, compostos fenólicos, implicando um impacto considerável sobre a estrutura celular. Devido à produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos existe um sistema de defesa antioxidante endógeno e exógeno, que têm o objetivo limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. Este sistema de defesa será abordado no próximo item.

2.1.2 Defesas antioxidantes

Os organismos aeróbios, dependentes do metabolismo oxidativo, em sua evolução adaptativa à atmosfera rica em oxigênio, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante para detoxificar as formas reativas de oxigênio e nitrogênio. Em condições fisiológicas normais, os danos produzidos por radicais livres são combatidos por um complexo sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas aos substratos oxidáveis, previnem significativamente a oxidação (FANG et al., 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). O sistema de defesa antioxidante humano inclui antioxidantes produzidos no próprio organismo e também de fontes externas (nutricionais), que podem prevenir a formação de espécies reativas, remover os radicais antes que ocorra dano, reparar o dano oxidativo, eliminar moléculas danificadas e prevenir mutações (LAMPE, 1999).

Os antioxidantes são divididos, classicamente em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos (Tabela 2) e suas principais funções estão esquematizadas na Figura 2.

Tabela 2: Classificação dos antioxidantes (Adaptado de Ratman et al., 2006).

ANTIOXIDANTES	
ENZIMÁTICOS	NÃO ENZIMÁTICOS
Superóxido dismutase (SOD)	Minerais (Zinco e Selênio)
Catalase (CAT)	Vitaminas (A, C, E e K)
Glutaciona peroxidase (GPx)	Carotenoides
Glutaciona redutase (GR)	Polifenóis (Flavonoides e Ácidos
Glutaciona S-transferase (GST)	fenólicos)

Os principais sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos celulares são compostos pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos radicais livres. Secundariamente, a glutaciona redutase (GR) e a glutaciona S-transferase (GST) auxiliam a regeneração da glutaciona reduzida (GSH) e na conjugação de metabólitos reativos. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , evitando assim, a formação de $\cdot OH$, que embora de vida curta, na fração de segundos, e em reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS; CADENAS, 1997).

A superóxido dismutase é uma metaloenzima presente nos organismos aeróbicos e é encontrada no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço celular dos mamíferos, é considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das ERO. A SOD catalisa a conversão do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e O_2 (reação de dismutação) (PESKIN; WINTERBOURN, 2000). Já a catalase se encontra em abundância em muitos tecidos, sendo escassa apenas no cérebro, no coração e no músculo esquelético, e possui como sítio ativo um grupo heme. Ela catalisa a inativação do H_2O_2 , convertendo-o em O_2 e H_2O (GOODSELL, 2004).

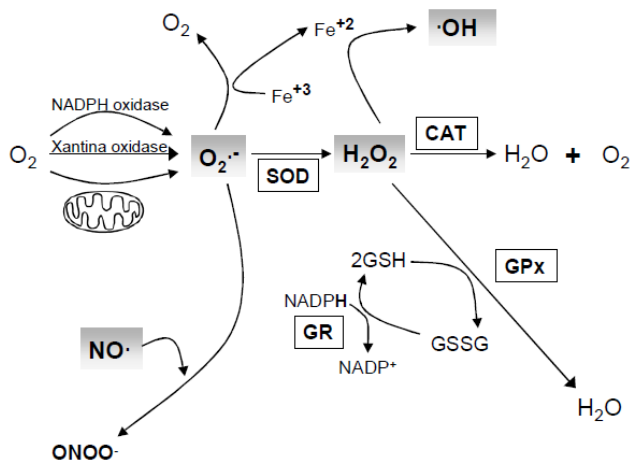


Figura 2: Esquemas das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas (em cinza) (Adaptado de Griendling & FitzGerald, 2003).

As peroxidases são enzimas que usam vários doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 a H_2O . A principal peroxidase em vertebrados é a glutatona peroxidase (GPx). Ela remove H_2O_2 oxidando a GSH à glutatona dissulfídica (GSSG). A glutatona consiste em um tripeptídeo (L γ -glutamina, L-cisteína-glicina), que contém na cadeia cisteína um grupo funcional $\text{CH}_2\text{-SH}$ que serve como sítio ativo para muitos tióis. Ela detoxifica metabólitos reativos de oxigênio oriundos do ambiente e do próprio organismo. Uma característica dos tióis é atuar como um agente redutor, aceitando elétrons das ERO, neutralizando-os e transformando-os em espécies menos tóxicas (SAGARA et al., 1998).

Como ilustrado na Figura 2, a mitocôndria, a NADPH-oxidase e outros sistemas convertem O_2 em $\text{O}_2^{\cdot-}$, o qual é dismutado pela superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertido em H_2O pela catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx), ou pode formar radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) após reação com o Fe^{+2} . A GPx reduz todos os hidroperóxidos, além do H_2O_2 , utilizando a glutatona reduzida (GSH), um doador de hidrogênio. Outra enzima, a glutatona redutase (GR), mantém o equilíbrio entre glutatona reduzida e glutatona oxidada. O $\text{O}_2^{\cdot-}$, se não retirado do meio, pode reagir rapidamente com o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) para formar peroxinitrito ($\text{OONO}\cdot$).

Já os antioxidantes não-enzimáticos (ou nutricionais) são os antioxidantes presentes na dieta e que assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores, uma vez que ajudam o corpo humano na

redução dos danos oxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). Dentre eles, o ácido ascórbico (Vitamina C) é considerado o principal antioxidante hidrossolúvel, porém não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a oxidação dos lipídios. Ele reage com o $\cdot\text{OH}$, O_2 e H_2O_2 , neutralizando ainda o oxigênio singlete. Do ponto de vista biológico, a propriedade mais interessante do ácido ascórbico é a sua habilidade em atuar como agente redutor, agindo sobre diversos radicais livres, principalmente na ação indireta como um antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b).

Os carotenoides, em especial o β -caroteno, são encontrados em vegetais e frutas de cor amarelo laranja. Possuem a importante função biológica em humanos de precursor para a vitamina A. O β -caroteno é reconhecido como um efetivo inativador do oxigênio singlete, por exemplo, para cada molécula de β -caroteno ingerido, pelo menos 1000 moléculas de oxigênio singlete são inativadas. Estudos epidemiológicos em humanos sugerem que ele é um protetor contra o câncer, exercendo este efeito independentemente do seu papel de precursor de vitamina A (OLSON, 1999). Já o α -tocoferol (Vitamina E), um constituinte lipossolúvel da membrana celular, reage com $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 protegendo a membrana dessas ERO. Ele possui sua maior ação antioxidante ao reduzir a propagação das espécies radicais peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Outra atividade antioxidante importante do α -tocoferol é sua habilidade para desativar o oxigênio singlete, embora seja menos eficiente que o β -caroteno (STAHL; SIES, 1999).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os flavonoides pertencem a um grupo de substâncias vegetais e naturais e são encontrados em frutas, verduras, grãos, flores, sucos, chás e vinhos (KNEKT; LOFT, 2003). De modo geral, os polifenóis, em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E.

A atividade antioxidante dos flavonoides pode ser determinada por cinco fatores: (i) reatividade como agente doador de H e elétrons, (ii) estabilidade do radical flavanoil formado, (iii) reatividade frente a outros antioxidantes, (iv)

capacidade de quelar metais de transição e (v) solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006).

Ainda, a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura. O potencial de quelação dos flavonoides é principalmente relacionado com a presença do catecol na porção em que está o anel B, enquanto que o comportamento redox de ligantes em complexos depende da presença do grupo 3-hidroxi nas suas estruturas (RAVICHANDRAN et al., 2014). Particularmente, a quercetina (QU) é um potente antioxidante pertencente à classe dos flavonoides, que sequestra radicais de oxigênio como $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$, inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica, além de possuir propriedades quelante e estabilizadora do ferro (KAHRAMAN et. al., 2003; SORATA et. al., 1984). Desta forma, QU pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes: na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxil de lipídeos) (AFANAS`EV et. al., 1989).

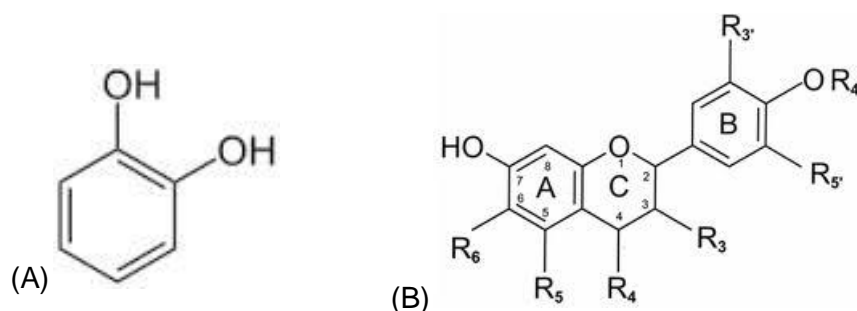


Figura 3: (A) catecol, (B) estrutura química da quercetina

2.1.3 Estresse oxidativo

Em organismos aeróbios saudáveis, a relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os sistemas de defesas antioxidantes, estão aproximadamente em equilíbrio. No entanto, os distúrbios no estado normal redox de células podem causar efeitos tóxicos, através da produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes da célula, incluindo as proteínas, lipídios e DNA (DONG et al., 2014). Esse desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo e conforme descrito

anteriormente, pode ser definido como uma desregulação da sinalização e do controle redox (JONES, 2006).

Em situações de estresse oxidativo, se manifestam os efeitos tóxicos dos RL, produzindo-se primeiro um dano celular reversível, que pode desencadear um dano irreversível e, inclusive, morte celular, se o estresse oxidativo persistir (FLECHA, 1990). Assim, este estresse está relacionado com diversos processos patológicos como a carcinogênese, a mutagênese, lipoperoxidação, oxidação e fragmentação de proteínas, envelhecimento, entre outros (SIES, 1997).

Entre as biomoléculas alvo das ERO e ERN encontram-se as que compõem membranas celulares, proteínas ADN e ARN. Os efeitos mutagênicos das ERO são derivados da modificação estrutural no ADN. As alterações são inúmeras, tais como quebra do ADN, oxidação de purinas, uniões de ADN a proteínas indesejáveis, entre outras, especialmente devido ao radical hidroxil. O sistema de reparo, que rapidamente regenera o ADN, evita mutações durante a replicação (NORDBERGER & ARNÈR, 2001). A sinalização de apoptose nas células poderia estar relacionada com o dano que as ERO e seus derivados medeiam no DNA, influenciada também por outros fatores, como o aumento da permeabilidade mitocondrial e consequente liberação de citocromo C (juntamente com a ativação de caspase-3 é uma rota bem descrita de indução apoptótica), aumento intracelular de Ca^{+2} e outros efeitos decorrente da apoptose (NORDBERGER; ARNÈR, 2001). Desta forma a alteração do DNA está envolvida em diversos processos patológicos e no próprio envelhecimento (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). Além disso, este mecanismo poderia, parcialmente, explicar porque indivíduos cronicamente expostos ao estresse oxidativo têm alta prevalência de câncer (GATÉ et al., 1999).

Nos aminoácidos e proteínas, OH^{\bullet} pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. O

ataque ocorre por adição do radical ou por abstração de hidrogênio (DROGE, 2002).

Como dito anteriormente, a peroxidação lipídica é o processo através do qual as ERO atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidios das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada das ERO nas estruturas intracelulares. Dentre os produtos gerados pela peroxidação lipídica está o malondialdeído (MDA), composto que pode atacar resíduos de aminoácidos (induzindo perda de função por parte de proteínas) ou bases nitrogenadas (causando propriedades mutagênicas) (FERREIRA; MATSURABA, 1997).

2.2. Inflamação e estresse oxidativo

2.2.1 Processo inflamatório

A reação inflamatória é um evento complexo, que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune, resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios, que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento do plasma e migração de leucócitos (CORSINI et al., 2005; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Na primeira fase da inflamação, a vasculatura ao redor do local da lesão reage para recrutar células do sistema imune. Na segunda fase, as células imunes circulantes migram desses vasos para os tecidos lesados, e os mecanismos da imunidade inata e adaptativa servem para neutralizar e remover o estímulo desencadeante. Em seguida começa o processo de reparo e cicatrização do tecido, com o término do processo inflamatório agudo. Se os eventos da inflamação forem detidos e continuarem latentes, pode ocorrer a inflamação crônica.

Sendo assim, o processo inflamatório pode ser dividido por etapas:

- 1) Dilatação dos vasos – A lesão de um tecido provoca a liberação de mediadores inflamatórios, que dilatam as arteríolas e as vênulas pós capilares; por sua vez, a vasodilatação leva a um aumento do fluxo

sanguíneo para o local de lesão, produzindo os sinais clínicos de vermelhidão e calor. Os mediadores inflamatórios também causam a contração das células endoteliais vasculares, levando a um aumento da permeabilidade capilar e à formação de exsudato (líquido intersticial com alto conteúdo de proteínas); por sua vez, o exsudato produz as manifestações clínicas de edema e dor, devido à pressão aumentada do tecido.

- 2) Recrutamento das células – A migração celular para fora da circulação sanguínea não é aleatória; com efeito, o recrutamento dos leucócitos é coordenado para otimizar a eliminação da infecção ou reparo local do tecido lesado. No início da resposta inflamatória, as respostas endoteliais no local da lesão são ativadas para expressar moléculas de adesão, que se ligam a receptores específicos expressos pelos leucócitos. Como resultado dessa interação, os leucócitos, que normalmente rolam ao longo da superfície do endotélio através de interações de ligações frouxas e transitórias, aderem firmemente ao endotélio ativado no local da lesão. A seguir os leucócitos aderentes ligam-se a outros receptores de células endoteliais, que promovem a transmigração ou diapedese dos leucócitos da vasculatura para o interstício. A especificidade da resposta imune é obtida de acordo com o padrão de moléculas de adesão expressas pelo endotélio ativado e pelos vários tipos de leucócitos; assim, por exemplo, os neutrófilos dominam a resposta inflamatória precoce, enquanto que os monócitos predominam depois de 24 horas.
- 3) Quimiotaxia – Após terem cruzado a barreira endotelial, as células do sistema imune podem migrar através do interstício até o local específico de lesão ou infecção. O direcionamento das células imunes para o seu alvo é efetuado pelo processo de quimiotaxia ou sinalização química. Os mediadores inflamatórios liberados no local da lesão criam um gradiente químico ao qual os leucócitos respondem, permitindo o seu deslocamento preferencial para o local da reação inflamatória.

- 4) Fagocitose – Com a sua chegada ao local de lesão ou de infecção, os neutrófilos, os macrófagos e outras células do sistema imune já estão prontos para executar suas funções. Todavia, essas células necessitam de um estímulo adicional para ativar os seus mecanismos de destruição. As substâncias estranhas precisam ser recobertas por uma opsonina para que possam ser fagocitadas. A interação entre uma célula fagocítica com uma partícula opsonizada desencadeia o processo de fagocitose e destruição do agente agressor.
- 5) Resolução – O reparo do tecido e o restabelecimento da homeostasia constituem os eventos finais da resposta inflamatória aguda. Os mesmos mediadores que ativam a inflamação também desencadeiam uma cascata de reparo tecidual; esse processo é mediado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas (principalmente IL-1 e TNF- α). Esses fatores atuam como mitógenos para as células endoteliais e os fibroblastos e, em última análise, estimulam a cura e a formação de cicatriz através de angiogênese e produção de tecido de granulação (ARMSTRONG; KLICKSTEIN, 2009).

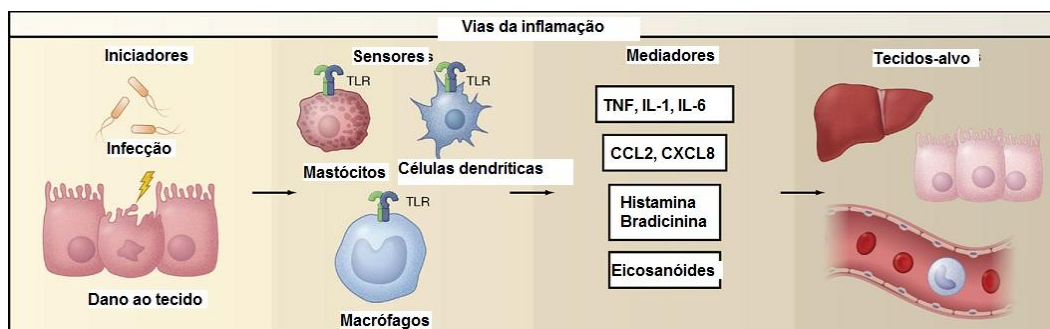


Figura 4: Componentes das vias inflamatórias (Adaptado de Medzhitov, 2010).

Como pode ser visualizado na figura 3, uma resposta inflamatória típica consiste em quatro componentes: os iniciadores da inflamação, os sensores que os detectam, os mediadores de inflamação induzidos por estes sensores e os tecidos-alvo que são afetados por estes mediadores. Cada componente existe em múltiplas formas e combinações, em função das vias inflamatórias distintas. O tipo de via induzida em determinadas condições depende da

natureza do estímulo inflamatório. Os iniciadores começam a resposta inflamatória e são detectados pelos sensores. Já os sensores, como os receptores Toll-like (TLRs), são expressos em células especializadas, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Eles induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas, eicosanóides bioativos, e produtos de cascatas proteolíticas, tais como bradicinina. Estes mediadores da inflamação podem agir em vários tecidos-alvo para provocar alterações nos seus estados funcionais que otimizam a adaptação à condição nociva (por exemplo, infecção ou lesão do tecido) associado com os indutores específicos que despertaram a resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2010).

2.2.2 Estresse oxidativo e a resposta inflamatória

A relação entre o estresse oxidativo e o processo inflamatório têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. As análises da comunicação celular durante as respostas ao estresse oxidativo são passíveis de revelar novos princípios de homeostase do tecido e adaptação às condições nocivas. Embora muitas moléculas têm sido estudadas como iniciadores da inflamação durante a lesão tecidual, suas contribuições relativas não estão bem definidas. Além disso, um dos aspectos que torna o estudo da inflamação desafiador é a diversidade e complexidade dos seus mediadores e dos seus efeitos sobre os tecidos alvo. Assim, embora os aspectos mecanicistas dos efeitos destes mediadores sejam bem compreendidos, a função de coordenadores e seus múltiplos modos de regulação ainda estão sendo estudados (MEDZHITOV, 2010).

Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) são as primeiras células que são ativadas na defesa imune do hospedeiro contra a infecção. Como explicado acima, estas células migram e infiltram-se no sítio inflamatório por gradientes quimiotáticos, onde juntamente com os macrófagos, destroem o agente causador da inflamação (BIASI et al., 2004; ARNHOLD, 2004). A destruição do agente estranho ocorre por meio da liberação de enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas e ERO estocadas nos grânulos dos polimorfonucleares (ARNHOLD, 2004). Os neutrófilos, quando

ativados (Figura 4), passarão a expressar as suas moléculas de adesão e passarão, também, a consumir ativamente oxigênio em suas mitocôndrias. Esse processo é chamado de explosão oxidativa e esse consumo não é direcionado para o metabolismo da célula e, sim, para a produção de ERO (SGARBI et al., 2006).

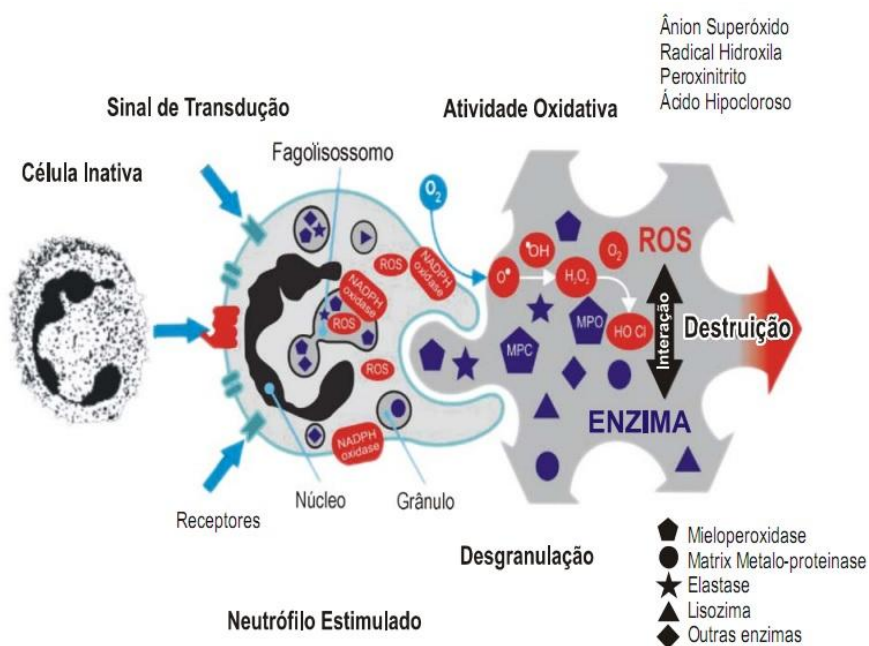


Figura 5: Estimulação de neutrófilos (Adaptado de Arnhold, 2004).

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos sofrem um processo de desgranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (MPO), uma protease presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (RODRIGUES et al., 2002; ARNHOLD, 2004). A mieloperoxidase, juntamente com o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, está envolvida na liberação de ERO. A MPO é uma heme proteína que compõe o sistema H_2O_2 -MPO-Hialida, ou seja, o neutrófilo sintetiza peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A MPO converte o peróxido de hidrogênio em presença de uma hialida como o cloreto (Cl^-) em ânion hipoclorito (OCl^-), que é um oxidante (AKAIKE, 2001) e age como uma potente citotoxina na defesa do organismo contra micro-organismos e células tumorais, porém pode causar dano aos tecidos normais (BABIOR, 1999). O NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido. A

seguir, a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual possui função de destruir bactérias diretamente ou após sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (ARNHOLD, 2004). Além disso, o ácido hipocloroso é considerado um potente agente microbicida, que possui papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão de bactérias, fungos e vírus.

Contudo, o aumento dos níveis de polimorfonucleares ativadas em tecidos e a liberação excessiva dessas espécies reativas podem promover lesão tecidual e vascular, especialmente se estes neutrófilos ativados estiverem aderidos às células endoteliais (HANSSON et. al, 2006).

Nas fases iniciais do processo inflamatório, além da migração de leucócitos e da liberação dos seus mediadores químicos, também ocorre a vasodilatação induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P e carragenina) e pelo óxido nítrico (WOTHERSPOON et al., 2005; YOUSIF, 2005). O óxido nítrico tem uma função importante na sinalização celular e está envolvido no relaxamento vascular, na modulação da agregação plaquetária e na inibição da adesão leucocitária (TAKEUCHI et al., 2004). Outros efeitos deletérios do óxido nítrico são decorrentes da sua interação com ERO, formando outras ERN.

O óxido nítrico é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS), que existe em três isoformas distintas: NOS neuronal (NOS_n ou NOS I), NOS endotelial (NOS_e ou NOS III), ambas formas são constitutivas e estão localizadas no tecido nervoso central e nas células endoteliais, respectivamente. A NOS induzida (iNOS ou NOS II) é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, como por mediadores endógenos: quemocinas e citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 beta: IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa: TNF α , interferon gama: IFN- γ , etc.), bem como por fatores exógenos: endotoxinas bacterianas, infecções virais, poluentes ambientais (estresse oxidativo), hipóxia, tumores, alergenicos, entre outros (RICCIARDOLO et al., 2004).

Um dos principais radicais livres envolvidos no processo inflamatório é o $\cdot\text{NO}$, que como dito anteriormente age em células próximas ao local de sua produção (células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos), além de suas funções fisiológicas normais, ele também possui ações deletérias quando

reage com $O_2^{\cdot-}$, levando à produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) e posterior conversão a $\cdot OH$ (DUSSE et. al., 2003).

Além do óxido nítrico, outros mediadores que participam do processo inflamatório são as citocinas. De forma geral, as citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento, quemocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda, podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como, por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , fator de crescimento transformante do tipo beta: TGF β) e anti-inflamatórias (interleucina-1 Ra: IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13) (WONG; FISH, 2003). Um balanço inadequado entre citocinas pró e anti-inflamatórias durante uma resposta imune é crítico na resolução, ou não, da inflamação local (CORSINI et al., 2005).

A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) são as duas citocinas produzidas como parte de uma resposta inflamatória aguda, pelo fato delas afetarem a proliferação e a função das células que medeiam as respostas imunes inatas e adaptativas, a inibição ou a estimulação seletivas das ações das citocinas têm o potencial de modular respostas imunes e inflamatórias (ARMSTRONG; KLICKSTEIN, 2009).

Em relação à atividade anti-inflamatória e antioxidante, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (COUTINHO et. al., 2009). Além disso, a inibição dessas enzimas exercidas pelos flavonóides é definitivamente um dos mecanismos anti-inflamatórios celulares importantes. Nos últimos anos, muitas evidências apoiaram a ideia de que certos flavonóides são os moduladores da expressão de genes, especialmente os moduladores da expressão de genes pró-inflamatórios, conduzindo assim para a atenuação da resposta inflamatória. No momento, não se sabe em que medida essas expressões de genes pró-inflamatórios contribuem para a resposta inflamatória. No entanto, é evidente que os flavonóides mostram atividade anti-inflamatória, pelo menos em parte, pela supressão da expressão de genes pró-inflamatórios (KIM et.al., 2004).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonoides. Tais mecanismos incluem: a) opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclo-oxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) sequestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes (BIANCHI et al, 2004). Portanto, esses agentes, entre eles a quercetina, podem ser interessantes para o desenvolvimento de novos medicamentos com a importante característica de atuarem tanto como anti-inflamatório, quanto como antioxidantes.

2.3 Quercetina

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é encontrada em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e nos produtos que os utilizam, tais como os chás e vinhos. Apresentam um núcleo característico C6-C3-C6, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético. A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (COUTINHO et al., 2009).

A quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) (Figura 1) é o principal flavonol encontrado na nossa dieta e foi isolada e biologicamente identificada em 1936 por Szent-Gyorgy. Este composto é amplamente encontrado no reino vegetal, incluindo legumes, frutas, ervas medicinais e vinho tinto. Hertog e

colaboradores (1992) encontraram altas concentrações de quercetina em cebola (284-486 mg/kg), couve (100 mg/kg), vagem (32-45 mg/kg), brócolis (30 mg/kg), repolho (14 mg/kg) e tomate (8 mg/kg). Entre as frutas estudadas, a concentração média de quercetina encontrada foi de 15 mg/kg, sendo que na maçã esta foi maior, entre 21 e 72 mg/kg. Em bebidas, como a cerveja, café, achocolatado e vinho branco, o teor foi de aproximadamente 1 mg/L. Já, para o vinho tinto, o teor observado foi de 4-16 mg/L, suco de limão, 7 mg/L e suco de tomate, 3 mg/L. O chá preto é a bebida que apresenta maior concentração de quercetina, em torno de 10-25 mg/L (BIANCHI et al., 2004).

A quercetina tem sido estudada como potencial agente terapêutico contra uma série de doenças, tais como, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, disfunções cardiovasculares, doenças inflamatórias, entre outros, assim como agente no combate do envelhecimento (BOOTS et al., 2008).

2.3.1 Características químicas e físico-químicas

A quercetina se apresenta na forma de um pó amarelo-alaranjado, com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e peso molecular de 320,24 g/mol para a forma anidra e de 338,24 g/mol para a forma diidratada. Ela torna-se anidra na faixa de temperatura de 93 a 97°C e decompõe-se a 314°C. Em relação à solubilidade, este composto é praticamente insolúvel em água (cerca de 0,30-0,70 µg/mL) (BUDAVARI, 1996). Também encontra-se disponível no mercado, o que permite seu uso na forma isolada, entretanto restrições de emprego em produtos farmacêuticos e cosméticos têm sido frequentemente relacionados à sua reduzida hidrossolubilidade.

A quercetina possui um grupo carbonil na posição 4, uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, e cinco grupos hidroxil nas posições 3, 5, 7, 3', 4' (ver Figura 3). Em especial os três grupos hidroxil nas posições 3, 3' e 4', tornam este composto um dos mais potentes antioxidantes entre os flavonoides (DALL'ACUA et al., 2012). Sendo assim, ela apresenta um comportamento anfifílico, devido à presença de uma porção hidrofóbica, formada pelos anéis fenólicos, e de uma porção polar, constituída pelos grupos hidroxil (CODORNIU-HERNANDEZ et al., 2003).

Em virtude de sua estrutura química, a QU demonstra uma pronunciada instabilidade química, sofre auto-oxidação em soluções orgânicas e aquosas apresentando pH superior a 8,0. Em pH inferior a 5,0 a QU encontra-se na forma neutra ou com carga elétrica positiva. As hidroxilas encontradas nos carbonos cinco e três são desprotonadas em pH abaixo dos encontrados fisiologicamente, indicando que somente as hidroxilas de outras posições podem ser desprotonadas em pH fisiológico (MOMIĆ et al., 2007).

Em um estudo realizado por Dall'Acua (2012), foi verificada a fotoestabilidade da QU em soluções alcoólicas. Foi induzida a degradação da QU por ambos UVA e UVB, obtendo-se um único produto resultante da oxidação e da adição de uma molécula de álcool para a ligação dupla 2,3. O mesmo mecanismo foi observado quando a QU foi dissolvida em soluções alcalinas, e um segundo produto foi caracterizado devido à oxidação e a adição de água. A comparação com análogos da QU confirmaram que, apesar da presença de cinco grupos hidroxil, aqueles nas posições 3, 3' e 4' são os principais envolvidos na atividade antioxidante do composto, bem como na sua fotolabilidade. Além disto, foi verificado que os grupos OH nas posições 5 e 7 não desempenham um papel crucial no mecanismo fotooxidativo.

A QU possui em sua estrutura elementos que contribuem para sua atividade antioxidante, os quais incluem a dupla ligação C2=C3, o grupamento cetona em C4, o grupo hidroxil em C3 e a estrutura orto-difenólica (grupo catecol) no anel B (RICE-EVANS et al., 1996).

2.3.2 Propriedades farmacocinéticas e farmacológicas

O consumo de alimentos ricos em polifenóis, incluindo os flavonoides, a sua biodisponibilidade e os fatores interferentes vêm sendo amplamente estudados. Acredita-se que a forma glicosilada dos flavonoides passe diretamente pelo intestino delgado, sendo hidrolisada pelas enterobactérias liberando a aglicona correspondente, no ceco e cólon. A forma aglicona pode ser absorvida mais facilmente pelas células epiteliais do intestino grosso, devido a sua lipofilicidade que facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular. Assim, estes compostos entram na circulação e são

submetidos a σ -metilação, glucoronidação e/ ou sulfatação no fígado. Uma parte substancial desse metabólito pode então ser excretado na bile e retornar ao lúmen intestinal, sendo novamente hidrolisado e reabsorvido pelas células intestinais, e excretado nas fezes (MUROTA & TERAQ, 2003).

Ao contrário de outros órgãos extra hepáticos, como intestino e rins, o estômago é muitas vezes ignorado como órgão metabolizador, embora algumas vezes seja reconhecido como local de absorção de diferentes compostos. Em estudo com ratos, a QU glicosilada não foi hidrolisada e absorvida no estômago, ao contrário da sua forma aglicona, que foi parcialmente absorvida por este tecido. Como a quercetina dos alimentos é mais abundante na forma glicosilada, a sua absorção estomacal é limitada. Entretanto, alguns processos como a fermentação de uvas para a produção do vinho, liberam a forma aglicona, podendo resultar em uma absorção mais eficiente da QU no estômago (BIANCHI et al., 2004).

Gugler e colaboradores (1975) administraram 100 mg de QU a humanos por via intravenosa e verificaram que 98% do composto ligou-se a proteínas plasmáticas e 7,4% foi excretado na urina na forma de metabólito conjugado. Por outro lado, quando 4 g foram administrados por via oral, a quercetina não foi detectada pela técnica de fluorimetria. Em um estudo realizado por Moon e colaboradores (2008), 500 mg de QU foi administrada 3 vezes em indivíduos saudáveis durante 7 dias e sua concentração foi determinada no plasma e na urina por HPLC-EM. Os resultados de QU na forma intacta e de seus conjugados foi de 15,4 ng/mL, após 3 horas e de 336 ng/mL, após 4 horas, respectivamente. A recuperação da forma intacta e conjugada na urina variou de 0,05-3,6% e de 0,08-2,6%, respectivamente, demonstrando a dificuldade do seu uso por via oral.

Este composto tem sido investigado por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antitumoral (CUI et al., 2008; EKSTROM et al., 2011; DATE et al., 2011; ASKARI et al., 2013; LIU et al., 2014). Além disso, alguns estudos avaliaram a toxicidade do composto e não foram evidenciados carcinogênese e genotoxicidade relacionada ao seu consumo (HARWOOD et al., 2007; UTESCH et al., 2008; RUIZ et al., 2009; LIU et al., 2014). As propriedades medicinais são principalmente atribuídas a sua capacidade antioxidante, modulação da expressão gênica e interação com as vias de

sinalização celulares, tais como, supressão da proliferação celular, indução da parada no ciclo celular e apoptose, inibição de várias quinases, promoção de diferenciação celular e inibição da glicoproteína P, a qual é responsável pela resistência a múltiplos fármacos das células tumorais (IKEGAWA et al., 2002; CIPAK et al., 2003; SOOBRAATTEE et al., 2005).

Em um grande número de estudos *in vitro* a QU foi caracterizada como um potente antioxidante com capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, oxigênio singlete e radicais de diferentes origens (RICE-EVANS et al., 1996; VAN ACKER et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1999). Acredita-se que a capacidade antioxidante dos flavonoides reside principalmente na sua capacidade para doar átomos de hidrogênio e, assim, eliminar os radicais livres gerados durante a peroxidação lipídica (ARORA et al, 1998).

Em um estudo realizado por Arora e colaboradores (1998) a QU foi o antioxidante mais eficaz, o que indica a importância de o grupo hidroxila na posição C-3 para sua elevada atividade antioxidante. A substituição do grupo hidroxila na posição C-3 da QU pela rutinose dissacarídeo na rutina levou a uma leve perda na atividade. Estas pequenas diferenças na atividade antioxidante baseadas em diferenças de substituição na posição C-3 são, provavelmente, um resultado do aumento na planaridade da molécula. Van Acker e colaboradores (1996) determinaram que o ângulo de torção do anel B com o resto da molécula flavonoide era correlacionada com a capacidade de sequestro de RL dos flavonoides. Na QU, o radical 3-OH ancorado através de ligações de hidrogênio à posição do anel B no mesmo plano que os anéis A e C, resulta em um ângulo de torção do anel B com o resto da molécula de cerca de 0°C e, assim, obtendo-se um aumento de coplanaridade do anel B.

A quercetina também apresenta a capacidade de reduzir processos inflamatórios agudos, crônicos e subclínicos, uma vez que reduz a produção de mediadores envolvidos na ativação e/ou o recrutamento de células inflamatórias como, por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o leucotrieno B₄. Esta substância causa ainda a supressão da produção de TNF- α e óxido nítrico nos macrófagos e mastócitos, além de inibir a formação de importantes agentes pró-inflamatórios, reduzindo a ativação e o recrutamento de células inflamatórias (MIN et al., 2007; ROGÉRIO et al., 2007; BISCHOFF, 2008). Além disso, estudos realizados com a QU demonstraram que este

composto pode prevenir danos no fígado e suprimir a superexpressão da forma indutível da óxido nítrico sintase (iNOS), que é induzida por vários estímulos inflamatórios.

2.3.3 Toxicidade da quercetina

Devido à prevalência da QU na dieta e de suas potenciais aplicações farmacológicas, a segurança deste composto foi extensivamente avaliada em diversos ensaios de genotoxicidade, além de uma gama de estudos de toxicidade reprodutiva subcrônica, crônica e aguda. Na tentativa de conciliar as diferenças observadas entre os resultados *in vitro*, que demonstram atividade mutagênica relacionadas com a ausência de carcinogenicidade *in vivo*, diversas revisões dos dados disponíveis para a QU foram realizados (HARWOOD, M. et al., 2007).

O efeito genotóxico dos flavonoides, incluindo a QU, foi avaliado primeiramente pelo teste de AMES, descrito em 1983 por Maron & Ames e amplamente utilizado desde então. Neste teste, a QU demonstrou potencial mutagênico para bactérias (SCHIMMER et. al., 1988; VRIJSEN et. al., 1990). No entanto, os aspectos genotóxicos foram menos evidentes em células de mamíferos, decorrentes das diferenças existentes na relação estrutura-atividade da QU para efeitos mutagênicos em bactérias e mamíferos (CAO et, al., 1997; CANADA et. al., 1990; METODIEWA et. al., 1999).

Deste então, diversos estudos sobre a atividade carcinogênica da QU foram publicados, onde foram constatados dados muitas vezes contraditórios, porém a maioria dos resultados dos estudos *in vivo* indicaram que a QU não é carcinogênica. Em 1999, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC; EUA) concluiu que a QU não é classificada como carcinogênica em humanos (OKAMOTO, 2005). Aparentemente, a relação entre as atividades antioxidantes e pró-oxidantes deste composto está relacionada à dose administrada (MERTENS-TALCOTT; PERCIVAL, 2005).

Mais recentemente, Okamoto (2005) apresentou um panorama extenso dos dados de segurança disponíveis para a QU e os dados disponíveis sugerem que os mecanismos de proteção *in vivo* limitam adequadamente

qualquer potencial de efeitos adversos relacionados com a atividade pró-oxidante da QU.

Como já mencionado, a baixa solubilidade em água faz com que ela possua uma meia-vida biológica curta e baixa biodisponibilidade oral dificultada para a sua aplicação como um agente terapêutico (GUGLER et al.,1975; HOLLMAN et al.,1996; KHALED et al., 2003; LIU et al., 2014). Desta forma, os principais desafios para melhorar sua biodisponibilidade são o peso molecular relativamente elevado, com elevado ponto de fusão e a baixa solubilidade em água (POOL et al., 2013; LIU et al., 2014). Consequentemente, é necessário desenvolver sistemas de liberação eficazes para encapsular e proteger a QU, para liberá-la no local adequado após a ingestão. Uma ampla variedade de sistemas coloidais de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos para encapsular compostos hidrofóbicos, como a QU (FLANAGAN; SINGH, 2006; VELIKOV; PELAN, 2008; MATALANIS et al., 2011; OSTERTAG et al., 2012; POOL et al, 2013). A seguir, são descritos nanocarreadores de fármacos, uma vez que estes foram desenvolvidos e estudados neste trabalho.

2.4 Nanocarreadores de fármacos

O crescimento da tecnologia farmacêutica tem levado ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, que oferecem inúmeras vantagens de emprego quando comparados às formas farmacêuticas convencionais. Atualmente, a nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação. Ela refere-se às tecnologias em que a matéria é manipulada às escalas atômica e molecular, para criar novos materiais e processos com características funcionais diferentes dos materiais comuns. Uma vez que se trabalha com partículas muito pequenas, na escala de nanômetros (medida que equivale à bilionésima parte do metro), essas possuem características físicas e químicas diferentes daquelas dos materiais de origem (p ex. resistência, cor, condutibilidade). Além disso, é uma ciência multidisciplinar, onde cientistas de materiais, engenheiros, farmacêuticos, médicos, químicos e físicos trabalham juntos pela necessidade de partilhar o conhecimento sobre ferramentas e técnicas nessa nova fronteira científica (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008).

A área da nanotecnologia que estuda a ciências da vida é conhecida como nanobiotecnologia ou nanomedicina. As áreas de atuação são várias, mas as aplicações médicas com grande potencialidade são: (i) meios de diagnóstico em nanoescala, que possam ser implantados para diagnóstico precoce de doenças, (ii) os revestimentos de sistemas biológicos de base nanotecnológica, podendo melhorar a bioatividade e biocompatibilidade de implantes, (iii) engenharia de tecidos (iv) sistemas de liberação de fármacos, sendo que houve um grande investimento no desenvolvimento de nanocarreadores para o tratamento de doenças como câncer, doenças inflamatórias, infecciosas e cardiovasculares nos últimos anos (LECHUGA, 2010).

O uso de nanocarreadores de fármacos tem se tornado uma estratégia interessante no que diz respeito à alteração e melhoria das propriedades biofarmacêuticas de vários fármacos (PANDEY et al., 2003; PANDEY & KHULLER, 2006). Os nanocarreadores são sistemas coloidais matriciais ou reservatórios, cujo tamanho situa-se entre 10 e 1000 nm, em que o fármaco encontra-se encapsulado, adsorvido ou dissolvido na partícula, que pode ser

constituída de materiais biodegradáveis e biocompatíveis (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; PURI et al., 2009). Tais sistemas se caracterizam pela capacidade em carrear compostos ativos, protegendo-os da degradação após administração, fazendo com que maiores concentrações alcancem o sítio de ação, além de permitir o controle da liberação, a redução dos efeitos colaterais indesejáveis, além da capacidade de vetorização ativa ou passiva de fármacos a tecidos e células alvos (PURI et al., 2009).

A distribuição desses nanocarreadores vem sendo estudado e, em geral, sabe-se que as partículas podem atingir os tecidos de forma passiva ou ativa. A forma passiva tem tropismo pelas anormalidades anatômicas e patológicas da vasculatura. O efeito de permeação e retenção aumentados foi descrito por Maeda e colaboradores (1986) para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. A permeabilidade aumentada observada na vasculatura de tecidos acometidos por determinadas patologias, tais como cancer ou inflamação, é um resultado da angiogénese desregulada e/ou o aumento da expressão e ativação de fatores de permeabilidade vascular. O desequilíbrio na expressão e ativação de moléculas pró-angiogénicas e anti-angiogénicas resulta em uma camada endotelial descontínua, onde as fenestrações entre as células endoteliais podem variar de 300 nm a 4700 nm, em tamanho levando a formação deficiente da vasculatura e causando problemas de drenagem linfática. Como um resultado desta drenagem linfática insuficiente, as substâncias são retidas por mais tempo do que em tecidos normais (NEHOFF et al., 2014).

No caso da inflamação, o efeito EPR acontece modificando a permeabilidade vascular induzida por meio de contração das células inflamatórias que revestem os capilares. Esta resposta patológica é induzida pela expressão da histamina, bradiquinina, leucotrienos, e serotonina no tecido inflamado e resulta num aumento dos intervalos intraendoteliais. Estas fenestrações permitem a entrada de nanopartículas especificamente para o tecido inflamado (NEHOFF et al., 2014). Tem sido sugerido que a permeabilidade para moléculas de alto peso molecular e nanocarreadores aumente entre 6-40 vezes nos tecidos inflamados. Desta forma, com o aumento de permeabilidade, os nanocarreadores podem extravasar e se acumular no espaço intersticial. Diferente dos tumores, na inflamação, os vasos

linfáticos ainda estão funcionando e, portanto, não ocorre o fenômeno da retenção, mas o significativo aumento da permeabilidade nesses tecidos permite a aplicação de nanocarreadores com sucesso. É importante enfatizar que o tamanho e o perfil farmacocinético dos nanocarreadores são a chave para a liberação passiva desses sistemas de liberação, sendo que o tamanho entre 50kDa e 200nm aumentaria a vetorização considerando o efeito EPR e previniria a filtração glomerular (COLLNOT et al., 2012).

Além disso, após a administração, os sistemas de liberação convencionais são preferencialmente capturados pelo sistema retículo endotelial e apresentam uma alta e seletiva captura nas áreas inflamadas. Isto se deve ao fato que há um aumento na presença de células imunes, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas nessas áreas, além do rompimento do epitélio, resultando num aumento preferencial das partículas. Por outro lado, a modificação da superfície das partículas com polímeros como o polietilenoglicol (PEG), pode também aumentar a liberação de fármacos no sítio inflamado pelo prolongamento do tempo circulante (transporte passivo) das partículas (FARIA et al., 2009).

Enquanto concentrações locais no tecido lesado podem ser aumentadas usando a vetorização passiva, a vetorização dos sistemas de liberação de forma ativa, para um tipo de célula específica, usando um ligante na superfície, pode ajudar no aumento da eficácia terapêutica. Geralmente, essas estratégias não aumentam a concentração total de fármaco no tecido, mas mudam a distribuição do composto neste local (CRIELAARD et al., 2012).

Dentre os diversos tipos de nanocarreadores, destacam-se os lipídicos, pois apresentam a vantagem de serem altamente biocompatíveis e biodegradáveis, tornando-se sistemas extremamente seguros para administração de fármacos. Eles apresentam os fármacos em um estado altamente disperso, com elevada superfície de contato para absorção e podem ser constituídos de lipídios sólidos ou líquidos, ou por misturas destes, levando à formação de sistemas matriciais ou reservatórios, que exibem uma ampla faixa de tamanhos de partículas (MÄDER;MEHNERT, 2001). Existem vários tipos de nanocarreadores lipídicos, entre eles destacam-se os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) (HEURTAULT et al., 2003).

Os lipossomas foram os primeiros nanocarreadores de fármacos estudados e podem ser descritos como estruturas vesiculares compostas basicamente por fosfolípidos organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. Devido a sua estrutura podem incorporar tanto substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas. No entanto, os lipossomas apresentam desvantagens quanto a estabilidade nos fluidos corporais e durante o armazenamento. Posteriormente, foram desenvolvidos os nanocarreadores poliméricos, que são constituídos de polímeros naturais ou sintéticos. Uma das vantagens deste sistema é a variabilidade de polímeros biodegradáveis que podem ser utilizados como material de preparação das partículas, que podem aumentar a estabilidade do sistema e prolongar a liberação de fármacos. Entretanto, este sistema nanoestruturado também apresenta desvantagens como, por exemplo, presença de solvente orgânico residual usado no processo de produção destas partículas, citotoxicidade dos polímeros e dificuldade para o escalonamento do processo de produção (MARCATO; DURÁN, 2008).

Com intuito de diminuir a toxicidade e manter a liberação prolongada foram desenvolvidos nanocarreadores a partir de lipídios sólidos (nanopartículas lipídicas sólidas, NLS) ou com misturas de lipídios sólidos com líquidos (carreadores lipídicos nanoestruturados). Esses nanocarreadores tem sido muito estudados nos últimos anos em função da baixa toxicidade, da possibilidade de liberação controlada do fármaco e da facilidade de escalonamento. Mas também apresentam suas desvantagens, como baixa eficiência de encapsulação (especialmente no caso das NLS) e instabilidade durante o armazenamento, devido ao polimorfismo dos lipídios sólidos utilizados na preparação dos nanocarreadores.

Por fim, as nanoemulsões lipídicas são produzidas a partir de lipídios líquidos e foram introduzidas nos anos 50 em produtos de nutrição parenteral. As vantagens das nanoemulsões incluem segurança toxicológica e o fácil escalonamento da produção deste carreador por homogeneização à alta pressão. Porém, a possibilidade do uso de nanoemulsões como sistema de liberação sustentada é limitada devido ao seu reduzido diâmetro e ao seu estado líquido, o que promove, em muitos casos, uma rápida liberação do

ativo. A seguir será abordado mais detalhadamente este sistema, uma vez que foi o nanocarreador desenvolvido neste trabalho.

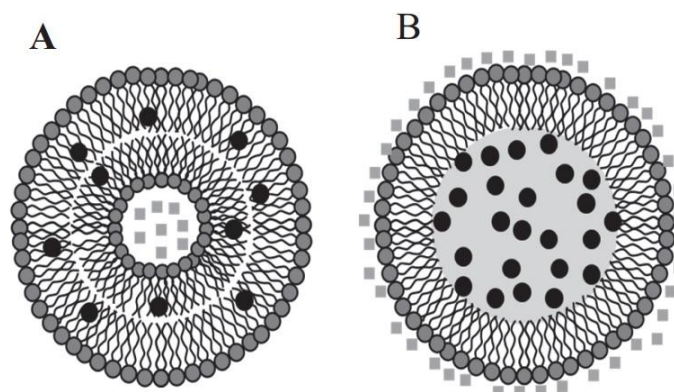


Figura 6: Representação esquemática de lipossomas e nanopartículas lipídicas. (A) lipossoma: encapsulando composto hidrofílico (representado por quadrados cinza) e lipofílico (representado por esferas pretas na porção lipídica dos fosfolípidios) e (B) nanopartícula lipídica (Adaptado de Oliveira, 2012).

2.4.1. Sistemas nanoemulsionados

Nanoemulsões (NEs) podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas de óleo, estabilizada por um sistema tensoativo adequado, podendo ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o). Elas apresentam diâmetro geralmente entre 10 e 500 nm, são uniformemente dispersas, formando sistemas cineticamente estáveis. Suas propriedades físico-químicas, influenciadas pela composição quali- e quantitativa e pelas condições de preparação, devem ser estritamente controladas, visando à estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012).

Apresentam-se como líquidos de baixa viscosidade, sendo que as moléculas de reduzida solubilidade aquosa encontram-se preferencialmente solubilizadas no óleo e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. As propriedades das nanoemulsões dependem não só das condições termodinâmicas, ou seja, da composição, temperatura e pressão, mas também do método de preparação e, particularmente da ordem de adição dos seus componentes (WANG, 2009). A alta estabilidade coloidal inerente as NEs pode

ser explicada pela sua estabilidade estérica (quando um surfactante não-iônico contendo PEG é utilizado) e/ou eletrostática (TADROS et al., 2004).

As diferentes técnicas de preparação de emulsões submicrométricas podem ser divididas basicamente em métodos de alta e baixa energia. Os métodos que utilizam emulsificação de alta energia podem ser baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores, ou pela utilização de ultrassom (ABISMAIL et al., 1999 BRUXEL et al., 2012). A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de deformar e quebrar as gotículas da fase interna em partículas nanométricas pela superação da pressão de Laplace de forma que, se a superfície de um líquido é curva, ele fica sujeito a uma pressão devida ao meio vizinho e a uma pressão adicional, associada à resultante das forças de tensão superficial que atuam nessa superfície curva (PORRAS et al., 2004). Em estudos laboratoriais, a produção ocorre normalmente em duas etapas: a primeira consiste na produção de uma emulsão grosseira para, em uma segunda etapa, reduzir o diâmetro de gotícula.

As NEs também podem ser obtidas alterando as propriedades físico-químicas do sistema e este método é conhecido como emulsificação de baixa energia. Estes métodos fazem uso da energia armazenada dentro dos agregados moleculares formados por moléculas de tensoativo presentes na emulsão (MILLER et al., 2001). Um dos métodos mais comuns empregado para produzir sistemas nanoemulsionados é denominado técnica de difusão do solvente. Nesta técnica, solventes orgânicos parcialmente miscíveis em água são utilizados para solubilizar os constituintes da fase e vertidos na fase aquosa, com posterior retirada do solvente, geralmente por evaporação sob pressão reduzida (BRUXEL et al., 2012). Nesta técnica ocorre uma turbulência na interface das gotículas da emulsão (efeito Marangoni), produzido pela rápida difusão do solvente na fase aquosa, resultando na formação espontânea de gotículas com tamanho submicrométrico (DORA et al., 2011). Ou seja, a origem do mecanismo de formação dos nanocarreadores pode ser explicada em termos de turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas desequilibradas, envolvendo processos de fluxo, difusão e de superfície. O processo pode então ser regulado pelo efeito de Marangoni no

qual o movimento de uma interface é causado por variações longitudinais de tensão interfacial. Esta turbulência pode ser promovida por vários fatores, dentre eles, a transferência de soluto da fase de viscosidade mais elevada, os gradientes de concentração perto da interface e da tensão interfacial sensível à concentração de soluto. Além disso, a presença de surfactantes pode intensificar o efeito, uma vez que atuam para suprimir o fluxo interfacial (FESSI, 1989).

Alguns aspectos físico-químicos das nanoemulsões são determinantes para sua estabilidade, quando comparadas às macroemulsões. O tamanho diminuto das gotas permite grande redução da força gravitacional sobre o sistema, na qual o movimento browniano seja superior a esta força gravitacional e, assim, capaz de evitar fenômenos como cremação ou sedimentação, de acordo com as densidades respectivas das fases dispersa e contínua (MARCEL et al., 2004; CAPEK, 2004; SOLANS et al., 2005; LIU et al., 2006).

Em geral, a estabilidade de uma nanoemulsão depende dos seguintes fatores: (i) tamanho da gota; (ii) diferença de densidade entre fase dispersa e contínua; (iii) solubilidade da fase dispersa, isto é, quanto mais insolúvel esta for no solvente, menor será a taxa de crescimento das gotas; e (iv) da repulsão estérica e/ou eletrostática entre as gotas (para qual o tensoativo tem um papel principal). Para se obter emulsões estáveis, moléculas de tensoativo devem se adsorver às interfaces entre as fases de água e de óleo. A tendência de moléculas dos tensoativos de acumularem-se em uma interface diminui a tensão interfacial do sistema. Esta diminuição ocorre porque as forças intermoleculares de atração entre uma molécula de água e um grupo não-polar sejam mais fracas do que as interações entre as moléculas de água (SJOBLOM, 2006).

Pode-se facilmente confundir o campo de nano e microemulsões (ME), uma vez que ambos são estruturas esféricas em formato de "gotículas" na nanoescala e as composições tipicamente contêm óleo, água e tensoativo. Na literatura existem algumas inconsistências relacionadas aos conceitos. Apesar de estes sistemas poderem apresentar características estruturais e visuais semelhantes em determinadas condições, diferenciam-se quanto à estabilidade termodinâmica e técnica de preparação. As ME são formadas

espontaneamente, uma vez que são sistemas termodinamicamente estáveis e as NE geralmente requerem uma fonte de energia para sua produção, já que são termodinamicamente instáveis (WANG et al., 2009).

No mundo dos nanomateriais, é muito provável que as NE irão desempenhar um papel cada vez mais importante no mercado, já que normalmente podem ser formuladas usando menos surfactante do que é necessário para as ME. Além disso, as NE são dispersões de gotículas em nanoescala deformáveis que podem ter propriedades de fluxo variadas e ópticas que variam de opaco para quase transparente (MASON et al., 2006). Apesar da instabilidade termodinâmica, as NE são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade de fármacos quando nanoencapsulados aumento de atividade farmacológica e biodisponibilidade e, em alguns casos, uma liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas.

Como exemplos de produtos nanoemulsionados disponíveis comercialmente podemos citar a microemulsão pré-concentrada de ciclosporina (Sandimmun-Neoral), a qual demonstrou diminuir a variabilidade farmacocinética do fármaco quando comparada com a formulação convencional, nanoemulsões de etomidato (Etomidat-Lipuro), diazepam (Diazemuls), flurbiprofeno (Ropion) e dexametasona (Limethason), que demonstraram diminuir os efeitos adversos, nanoemulsão de propofol (Diprivan), que melhorou a farmacocinética e reduziu efeitos colaterais, nanoemulsão de prostaglandina E1 (Liple), que melhorou a farmacocinética. Embora este número ainda seja limitado, é esperado um aumento no número de medicamentos com base nanotecnológica no mercado nos próximos anos, pois existem muitos em fase de desenvolvimento pré-clínico e clínico atualmente.

2.4.2. Nanocarreadores lipídicos contendo quercetina para administração por via oral

Apesar de apresentar um amplo espectro de atividades farmacológicas, a absorção da quercetina e sua biodisponibilidade são limitadas, devido à sua baixa solubilidade aquosa e extensa metabolização intestinal e hepática, quando administrado por via oral (LEUNER; DRESSMANN, 2002; SINGH et al, 2012).

Recentemente, foi estabelecida a utilidade de sistemas de liberação de QU à base de lipídios, para melhorar a biodisponibilidade oral e/ou a eficácia terapêutica deste composto (LI et al., 2009; DATE et al., 2011; GAO et al., 2012). Li e colaboradores (2009) avaliaram a absorção gastrointestinal de QU após encapsulação em NLS em modelo de perfusão *in situ* em ratos. Neste trabalho, as nanopartículas foram constituídas de monoestearato de glicerila, mas foram igualmente preparadas pela técnica de emulsificação e solidificação a baixa temperatura. Os estudos indicaram que a absorção da QU nanoencapsulada foi de apenas 6,2% após 2 horas no estômago. No intestino, o mecanismo de absorção foi a difusão passiva, ocorrendo principalmente no íleo e cólon. Um estudo farmacocinético foi realizado em ratos após a administração oral de 50 mg/kg na forma de QU-NLS ou suspensão. A biodisponibilidade relativa do QU-NLS a suspensão quercetina foi 571,4%. Estudos farmacocinéticos indicaram que a concentração máxima de QU foi de 5,90 e 12,22 µg/mL, após administração da QU livre e de QU-NLS, respectivamente, na dose de 50 mg/kg.

Nanocápsulas lipídicas contendo QU foram desenvolvidas por Barras e colaboradores (2009), com intuito de aumentar a sua solubilidade e/ou estabilidade. As nanocápsulas foram preparadas utilizando a técnica de inversão de fases, utilizando os seguintes componentes: triglicerídeos do ácido cáprico-caprílico (Labrafac), estearato de polietilenoglicol (Solutol), lecitina de soja, NaCl e água. As nanocápsulas contendo quercetina apresentaram tamanho de partícula de cerca de algumas dezenas de nanômetros, variando conforme a proporção de Labrafac e Solutol. A encapsulação da QU aumentou sua solubilidade aquosa em torno de 100 vezes e as dispersões coloidais se

mostraram estáveis por dez semanas, em termos de eficiência de encapsulação, sem a oxidação da QU.

Microemulsões (ME) contendo oleato de etila, Tween 80 e etanol desidratado como a fase de óleo e QU foram desenvolvidas por Gao e colaboradores (2009) com intuito de aumentar a solubilidade e absorção oral de QU. Os estudos de absorção em intestinos de ratos *in situ* evidenciaram a ocorrência de diferenças significativas nos parâmetros de absorção entre a forma microemulsionada e a forma micelar, contendo QU, além de mostrarem que a melhor permeabilidade ocorreu no cólon, seguida pelo íleo e duodeno.

Dora e colaboradores (2011) desenvolveram formulações contendo quercetina utilizando diferentes tipos de nanocarreadores lipídicos. Nanopartículas lipídicas sólidas, nanocarreadores lipídicos nanoestruturados, nanoemulsões, e microemulsões foram formados variando a quantidade de lipídio líquido (óleo de rícino) e lipídio sólido (triestearina) e a quantidade de surfactante empregado. A eficiência de encapsulação foi superior a 99% para todas as formulações. No entanto a ME foi capaz de encapsular uma maior quantidade de QU, sendo que a solubilidade aumentou 1.300 vezes quando comparada com a solubilidade da quercetina em água.

A atividade anti-inflamatória da microemulsão contendo QU desenvolvida por Dora e colaboradores (2011) foi avaliada em modelo experimental de asma alérgica em camundongos (ROGERIO et al, 2010). Neste estudo foi observado que o grupo tratado com microemulsão por via oral (10 mg/kg) apresentou uma melhor resposta anti-inflamatória do que o grupo tratado com a QU em suspensão. Quando o plasma dos animais foi avaliado, metabólitos ativos da QU foram encontrados. Estes dados sustentam fortemente as propriedades da QU-ME como sistema de liberação eficaz e capaz de melhorar a biodisponibilidade oral do presente flavonoide.

Date e colaboradores (2011) desenvolveram nanocarreadores catiônicos de fosfolipídios (LeciPlex) para melhorar a eficácia terapêutica da QU para administração por via oral. A atividade anti-inflamatória da LeciPlex contendo QU (QU-LeciPlex) foi determinada pelo teste do edema de pata em ratos e a atividade antitumoral foi determinada em modelo de melanoma em camundongos e comparada com a QU em suspensão. A QU- LeciPlex, quando administrada por via oral (50 mg/kg) exibiu atividade anti-inflamatória e

antitumoral significativamente maiores ($p < 0,01$) quando comparada com a da suspensão de QU em administração oral.

Liu e colaboradores (2014) estudaram a biodistribuição *in vivo* da QU quando incorporada em carreadores lipídicos catiônicos nanoestruturados (QU-CNLC) de monoestearato de glicerila (lipídio sólido) e triglicerídeos de cadeia média (lipídio líquido). Os nanocarreadores foram preparados pela técnica de emulsão à alta temperatura e solidificação subsequente a uma temperatura baixa. A administração de QU-CNLC foi testada por via oral em camundongos (25 mg/kg) em tempos pré-determinados. Na análise dos tecidos por HPLC foi observado que a QU pode ser acumulada no pulmão, no rim e no fígado após a administração oral de QR-CNLC em uma quantidade significativamente maior de quando comparada com a suspensão QU. Concluímos assim que os nanocarreadores lipídicos catiônicos nanoestruturados podem ser um sistema interessante para distribuição oral de componentes funcionais hidrofóbicos.

Com base nos dados da literatura, pode-se observar que os nanocarreadores lipídicos demonstram ser promissores para a encapsulação da quercetina, especialmente por serem capazes de aumentar sua biodisponibilidade quando administrada por via oral.

Diante do exposto, neste trabalho foi realizada a otimização de uma nanoemulsão contendo quercetina, previamente desenvolvida pelo grupo, com intuito de aumentar a quantidade de fármaco incorporado ao nanocarreador e foram avaliadas e correlacionadas as atividades anti-inflamatória e antioxidante do sistema desenvolvido, em um modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Além disso, foram analisados alguns aspectos toxicológicos, com intuito de verificar a segurança do nanocarreador desenvolvido.

3. Objetivos

Este trabalho tem o objetivo de obter uma nanoemulsão lipídica com elevado teor de quercetina, avaliar sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, bem como investigar sua segurança toxicológica *in vivo*.

3.1. Objetivos específicos

- Realizar um estudo de formulação, com intuito de aumentar a quantidade de quercetina encapsulada na nanoemulsão a fim de otimizar o teor de quercetina encapsulada,
- Caracterizar a nanoemulsão quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação e teor de fármaco,
- Realizar um ensaio de liberação *in vitro*,
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da nanoemulsão em modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos
- Avaliar o efeito antioxidante da administração da nanoemulsão de quercetina *in vivo*,
- Avaliar o efeito da administração da nanoemulsão de quercetina sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e toxicológicos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABISMAIL, B. et. Al. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.6, p.75-83, 1999.
- AFANAS'EV, I.B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.
- AKAIKE, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. **Rev Med Virol**, v.11, n.2, 87-101, 2001.
- AMIC, A. et al. Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: The significance of double PCET mechanisms. **Food Chem**, v.152, p. 578–585, 2014.
- ARMSTRONG, E.J.; KLICKSTEIN L.B. Princípios de inflamação e o sistema imune. In: ARMSTRONG, M.D.; TASHJIAN A.H.; GOLAN, M.D. **Princípios de Farmacologia**, 2ª ed. Guanabara Koogan, 2009.
- ARNHOLD, J. Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochem**, v. 69, p. 8-15, 2004.
- ARORA, A.;MURALEEDHARAN G. N.; GALE M. S. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Rad Biol & Med**, v. 24, n. 9, p. 1355–1363, 1998.
- ASKARI, G. The effects of quercetin supplementation on body composition, exercise performance and muscle damage indices in athletes. **Int J Prev Med**, v. 4, p. 21–26, 2013.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Bloo**. v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BARBOSA K.B.F. ET. al., Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.
- BARRAS, A. et al. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 2, p. 270–277, set., 2009.
- BARREIROS, L.B.S. DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BIANCHI, M.L.P. et. al. flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim Nutr**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radical livre e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v.12, n.2, p. 123-130, 1999.
- BIASI, D. et al. Increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells of elderly rats. **Exp Gerontol**, v. 39, p. 387-394, 2004.
- BISCHOFF, S. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

- BOOTS, A. W. et al. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p.325-337, 2008.
- BOVERIS, A., CADENAS, E. **Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species**. In: CLERCH, L; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Marcel Decker: New York, v. 105, p 1-25, 1997.
- BRUXEL, et. al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quim Nova**, v. 35, v. 9, p. 1827-1840, 2012.
- BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index**. 12th ed. White House Station: Merck, 1996.
- CALIXTO, J.B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta medica**, v.70, p. 93-103, 2004.
- CANADA, A. T.; GIANNELLA, E.; NGUYEN, T. D. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, n. 5, p. 441-449, 1990.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.107, p. 125-155, 2004.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.
- CHAKRABORTY, S. et al. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **Eur J Pharm and Biopharm**, v. 73, p. 1–15, 2009.
- CHAN, M.M. et al. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. **J Cell Physiol**, v. 194, p. 63–70, 2003.
- CIPAK, L. et al. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 27, n. 1, p. 65-72,2003.
- CODORNIU-HERNANDEZ, E. et. al. Theoretical study of flavonoids and proline interactions, aqueous and gas phase. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 623, n. 1-3, p. 63-73, 2003.
- COHEN, G The generation of hydroxyl radicals in biologic systems: Toxicological aspects. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, p. 669-675, 1978.
- COLLNOT, E.M.; ALI, H.; LEHR C.M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 235-246, 2012.
- COMALADA, M. et al. In vivo quercetin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kB pathway. **Eur J of Immunol**, v., 35, n. 2, p. 584-592, 2005.
- CORNARD, J.; MERLIN, J. C. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). **J Inorg Biochem**, v. 92, p. 19–27, 2002.

- CORSINI, E. et al. Increased carrageenan induced acute lung inflammation in old rats. **Immunol**, v. 115, p. 253-261, 2005.
- COUTINHO, M. A. S. et. al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev Virtual Quim**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- CRIELAARD, B.J. et. al. Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one. **Journal of controlled Release**, v. 161, p. 225-234, 2012.
- CUI, Y. et al. Dietary flavonoid intake and lung cancer – a population-based case–control study. **Cancer**, v.112, p. 2241–2248, 2008.
- DALL'ACQUA, S. The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. **Molecules**, v.17, p. 8898-8907, 2012.
- DATE, A. A. et al. Lecithin-based novel cationic nanocarriers (Leciplex) II: improving therapeutic efficacy of quercetin on oral administration. **Mol Pharm**, v. 8, p. 716–726, 2011.
- DONG, Y. et. al. Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. **Int J. Med Sci**, v. 1, p. 282-290, 2014.
- DORA C.L. et al. Formulation study of Quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Lat Am J Pharm**, v. 30, n. 2, p. 289-296, 2011.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. In: **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- EKSTROM, A.M. et al. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. **Ann Oncol**, v. 22, p. 438–443, 2011.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Rev Nutr**, v.18, n.10, p.872-878, 2002.
- FARIA, T.J.; SOUZA-SILVA E.; OLIVEIRA, D.T.; LEMOS-SENNA, E.; TONUSSI, C.R. Evaluation of the Pro-Inflammatory Potential of Nanostructured Drug Carriers in Knee-Joints of Rats: Effect on Nociception, Edema, and Cell Migration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 12, p. 4844-4851, 2009.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA L.S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FESSI, H. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J of Pharm**, v.55, p.R1-R4, 1989.
- FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 46, p. 221–237, 2006.

FLECHA, B. S. G. Estress oxidativo en patologia humana. Métodos de estudio de aplicación clínica. **ACTA Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.24, n.1, p.67-74, 1990.

FRANCO L.D.P. Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal. [Dissertação Mestrado]. Universidade Estadual Paulista;2007.

GAO, Y. et al. Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 2, p. 306–314, 2009.

GAO, L. et al. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. **Int J Pharm**, v.404, p. 231–237, 2012.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B.A.G. Oxidative stress induced of pathologies: the role of antioxidants. **Biomed & Pharmacoth**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GOODSELL, D. S. Rcsb Protein Data Bank, 2004.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H.J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 9, p. 229–234, 1975.

HALLIWEL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? **Amer J Clin Nutr**, v.72, p.1082-1087, 2001.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group, 2001. p. 1-7.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. **Free Radic Res Commun**, v. 9, p.1-32,1990.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M.. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch Biochem and Biophys**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food Chem Toxicol**, v. 45, p. 2179–2205, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, p.67–202, 2002.

HERTOG, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 4, p. 381-386, 1995.

- HEURTAULT, B. et al. Pshysico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.
- HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5 (supl), p. 206-212, 2006.
- HOAR T.P.; SCHULMAN J. H. "Transparent water in oil dispersions: the oleopathic hydromicelle". **Nature** 152: 102 – 103, 1943.
- HOLLMAN, P.C. et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. **Free Radic Biol Med**, v. 21, p. 703–707, 1996.
- IKEGAWA, T. et al. Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivates in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cells. **Cancer letters**, v. 177, n. 1. P.89-93,2002.
- JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.9&10, p. 1865-1879, 2006.
- KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J Nephrol**, v.16, n.2, p. 219-224, 2003.
- KHALED, K.A.; EL-SAYED, Y.M.; AL-HADIYA, B.M. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 29, n. 4, p. 397–403, 2003.
- KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **J. Pharmacol. Sci**, v. 96, p. 229-245, 2004.
- KLEINVELD, H. A.; SWAAKA, J.G.; HACK, C.E. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. **Scand. J of Rheumatol**, v. 18, p. 341-52, 1989.
- KNEKT, P.; LOFT, S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. **Amer J Clin Nutr**, v. 76, n.3, p.560, 2003.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54(1), p. S77–S98, 2002.
- LAMPE, J. W. Heath effects of vegetables and fruit: assessing mecanisms of action in human experimental studies. **Am J Clin Nutr**, v.70, n.3, p.475S-491S, 1999.
- LECHUGA, L.M. Nanobiotecnología: herramientas diagnósticas y terapéuticas. In: BUEREN, J.; MOTELLON, J.L. **Curso de biotecnologia aplicada**, 7ª Edición, Edikamed (Spain), p. 98-112 ,2010.
- LEUNER, C., DRESSMANN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 54, p. 107-12, 2002.
- LI, X. H. et al. Enhancement of gastrointestinalabsorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **J Control Release**, v. 133, p. 238–244, 2009.

- LIU, L. et al. Characterization and biodistribution in vivo of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 115, p. 125– 131, 2014.
- LIU, W. et. al. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, p.557-563, 2006.
- LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria** v. 83, n. 5 (supl.), p. 163-171, 2007.
- MAEDA, H. et al. Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties. *J. Med. Chem.*, v. 28, n. 4, p. 455-461, 1986.
- MARCATO, P.D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 8, p. 2216-2229, 2008.
- MARCEL, B.J. ET. al. The role of interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108 - 109, p.119-126, 2004.
- MASON, T.G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **J Phys Condens Matter**, v.18, p. R635–R666, 2006.
- MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Hydrogel microspheres for encapsulation of lipophilic components: Optimization of fabrication & performance. **Food Hydrocoll**, v. 25, p. 1865–1880, 2011.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, p. 771-776, 2010.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, p. 165-96, 2001.
- MERTENS-TALCOTT, S. U.,PERCIVAL, S. S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**, vol. 218, n. 2, p. 141-151, 2005.
- METODIEWA, D. et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biological & Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 107-116, jan., 1999.
- MILLER, D.J., HENNING, T., GRUNBEIN, W. Phase inversion of W/O emulsions by adding hydrophilic surfactant - a technique for making cosmetics products. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.183, p.681-688, 2001.
- MIN, Y.D. et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflammation Research**, v. 56, p. 210-215, 2007.
- MOMIĆ, T. et. al. Protolytic equilibria and photodegradation of quercetin in aqueous solution. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 72, n. 11, p. 1447-1460, 2007.

- MOON, J.H. et al. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. 461-467, 2000.
- MOON, Y. J. et al. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm Drug Dispos**, v. 29, n. 4, p. 205-217, 2008.
- MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Bioph**, New York, v. 417, p. 12-17, 2003.
- MURRAY, H.W. Effect of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 161, p. 992–994, 1990.
- NEHOFF et al. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2539-2555, 2014.
- NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 275-278, 2005.
- OLIVEIRA, L. C. et. al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, 2012.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J., Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Curr Opin Colloid Interface Sci**, v. 388, p. 95–102, 2012.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987
- PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-Arginine is the physiological precursor for formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 153, p. 1251-1256, 1988.
- PANDEY R.; KHULLER, G. K. Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. **Indian J Exp Biol**, v. 44, n. 5, p. 357-66, 2006.
- PANDEY, R., ZAHOR, A., SHARMA, S., KHULLER, G. K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 83, n. 6, p. 373-8, 2003.
- PESKIN, A.V., WINTERBOURN C.C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clinica Chimica Acta**, v. 93, p. 157–166, 2000.
- POLLA, B.S. et al. Differential induction of stress proteins and functional effects of heat shock in human phagocytes. **Inflammation**, v. 19, p. 363-378, 1995.
- POOL, H. et al. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food Funct**, v. 4, p. 162–174, 2013.

- PORRAS, M. et. al. Studies of formation of W/O nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, p. 115-118, 2004.
- PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu Rev Physiol**, v. 48, p.657-667, 1986.
- PURI *et al.* Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 26, p. 523–580, 2009.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H. DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 12, p. 1113-28, 1998.
- RATNAM D.V. et. al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189–207, 2006.
- RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chem**, v. 146, p. 472–478, 2014.
- RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RICCIARDOLO, F.L.M. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**, v. 84, p. 731-765, 2004.
- RODRIGUES, M.R. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 292, p. 869-873, 2002.
- ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercetrin in experimental murine allergic asthma. **Inflamm Res**, v.56, n. 10, p. 402–408, 2007.
- ROGERIO, A.P. et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammaoty model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 288-297, 2010.
- ROVER, J.R. L.; FENALTI, N.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Rev Química Nova**, v.24, n.1, p.112-118, 2000.
- RUIZ, M.J. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 3180–3186, 2009.
- SAGARA, Y et. al. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.24, p. 1375-1389, 1998.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-151, 2006.

- SCHIMMER, O. et al. The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. **Mutation Research**, v. 206, n. 2, p. 201-208, out., 1988.
- SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **Am J Clin Nutr** v.72, p.653S-669S, 2000.
- SGARBI, M. W. M.; SILVA JUNIOR, B. A.; HUNGRIA NETO, J. S. Importância da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. **Rev Bras Ortop**. v. 41, n. 1-2, p.1-6, 2006.
- SIES, H. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. **Adv Pharmacol**, v.38, p.707, 1997.
- SINGH, D. et al. Quercetin-phospholipid complex: an amorphous pharmaceutical system in herbal drug delivery. **Curr Drug Discov Technol**, v. 9, p. 17–24, 2012.
- SJOBLOM, J. **Emulsions and emulsions stability**, ed. Boca Raton, FL, USA, 2006.
- SOLANS, C. ET. al. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, p.102 - 110, 2005.
- SOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutat Res**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.
- SORATA, Y.; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Biochim Biophys Acta**, v. 799, n. 3, p. 313-317, 1984
- STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: Occurrence, biochemical activities, and bioavailability. **Antiox Food Suppl Human Health**, p.183-202, 1999.
- SUBRAMANIAN, B. et al. Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1533-1539, 2008.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.
- TAKEUCHI, K. et al. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cells calcium signaling, prostaglandin I₂ production and nitric oxide synthase expression. **Cardiovasc Res**, v. 62, p. 194-201, 2004.
- UTESCH, D. L. et al. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. **Mutat Res**, v. 654, p. 38–44, 2008.
- VAN ACKER, S. A. B. E. et al. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chem Res Toxicol**, v. 9, p.1305–1312, 1996.
- VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, v. 4, n.10, p. 1964–1980, 2008.
- VRIJSEN, R.; MICHOTTE, Y.; BOEYE, A. Metabolic activation of quercetin mutagenicity. **Mutation Research**, v. 232, n. 2, p. 243-248, out., 1990.
- WALLE, T. et al. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. **J Nutrition**, v.135, n. 1, p. 48-52, 2005.

- WANG, L. et al. Formation and stability of nanoemulsions with mixed ionic–nonionic surfactants. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, p. 9772–9778, 2009.
- WHITESIDES, G. M.; GRZYBOWSKI, B. Self-assembly at all scales. **Science**, v.295, p. 24-18, 2002.
- WISEMAN, S. A. et al. Comparison of the effects of dietary vitamin E on in vivo and in vitro parameters of lipid peroxidation in the rabbit. **Free Rad Biol Med**, v.19, n. 5, p. 617-626, 1995.
- WONG, M.M.; FISH, E. N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. **Semin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 5-14, 2003.
- WOTHERSPOON, F. et al. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. **Diabet Med**, v.7, p. 834-840, 2005.
- YAMAMOTO, N. et al. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, n. 2, p. 347-354, 1999.
- YOUSIF, M.H.M. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZdiabetic rats: role of EDNO and EDHF. **Pharmacol Res**, v. 51, p. 515-521, 2005.
- ZANNETI-RAMOS, B.G.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Rev Bras Farm**, v. 89, n.2, p. 95-101, 2008.

**Artigo 1. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery:
System characterization and molecular interactions studies**

**Artigo 2. Anti-inflammatory effects and toxicology analysis of oral delivery
quercetin nanosized emulsion in rats**



Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies

Gabriela Hädrich, Samantha Oliveira Monteiro, Marisa Raquel Rodrigues, Vânia Rodrigues de Lima, Jean-Luc Putaux, Juliana Bidone, Helder Ferreira Teixeira, Ana Luiza Muccillo-Baisch & Cristiana Lima Dora

To cite this article: Gabriela Hädrich, Samantha Oliveira Monteiro, Marisa Raquel Rodrigues, Vânia Rodrigues de Lima, Jean-Luc Putaux, Juliana Bidone, Helder Ferreira Teixeira, Ana Luiza Muccillo-Baisch & Cristiana Lima Dora (2015): Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies, Drug Development and Industrial Pharmacy, DOI: [10.3109/03639045.2015.1118491](https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1118491)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2015.1118491>



Accepted author version posted online: 16 Nov 2015.
Published online: 07 Dec 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 15



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies

Gabriela Hädrich^a, Samantha Oliveira Monteiro^a, Marisa Raquel Rodrigues^b, Vânia Rodrigues de Lima^b, Jean-Luc Putaux^{c,d}, Juliana Bidone^e, Helder Ferreira Teixeira^e, Ana Luiza Muccillo-Baisch^a and Cristiana Lima Dora^a

^aLaboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil; ^bGrupo de Investigação de Interações Moleculares em Membranas, Programa de Pós-Graduação em Química tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil; ^cCentre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; ^dCERMAV, CNRS, Grenoble, France; ^eLaboratório de Desenvolvimento Galênico, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

The flavonoid quercetin (QU) is a naturally occurring compound with several biological activities. However, the oral bioavailability of this compound is very low due to the high pre-systemic metabolism in the colon and liver and its low water solubility. In this context, the development of QU-loaded nanocarriers (NEs) is a promising approach to improve the drug oral bioavailability. This study investigates the variation of the concentration of 12-hydroxystearic acid–polyethylene glycol copolymer, lecithin and castor oil (CO) as to increase the amount of QU encapsulated while maintaining physicochemical characteristics described in previous studies. To better understand the ability to load and release the drug, we investigated the molecular interactions between QU and NE. Lipid-based NEs were prepared using CO as oily phase and PEG 660-stearate and lecithin as surfactants. Hot solvent diffusion and phase inversion temperature were methods employed to produce NEs. The QU-NEs were investigated for physicochemical characteristics and *in vitro* drug release. Molecular interactions between QU and the NEs were monitored through the complementary infrared (Fourier transform infrared) and NMR. The results revealed that it was possible to incorporate higher amounts of QU in a lipid-based NE with a reduced size (20 nm). The system developed allow a sustained release of QU probably due to the shell formed by the surfactants around the NE and the flavonoid ordering effect in the emulsion hydrophobic regions, which may reduce the system permeability.

ARTICLE HISTORY

Received 12 April 2015
Revised 11 October 2015
Accepted 5 November 2015
Published online
8 December 2015

KEYWORDS

Quercetin; lipid nanocarriers; cryo-TEM; molecular interactions; nanotechnology

Introduction

Quercetin (QU) (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), a lipophilic compound from the flavonoid family, is a dietary polyphenol widely found in vegetables, fruits, herb medicine and red wine^{1,2}. This compound has a broad range of physiological activities including antioxidant property and anti-inflammatory effect that is likely to be associated with its ability to scavenge free radicals and block inflammatory mediators, inducible enzymes and nuclear transcription factor activation^{3–5}. Other previous studies have presented that QU at higher doses (3 g/kg) does not exhibit any toxic and harmful effect in mice^{6,7}.

Despite its demonstrated safety and efficacy, the QU usage as a therapeutic agent remains restricted in clinic due to three major issues: poor water solubility, short biological half-life and low oral bioavailability^{8–11}. For instance, the QU found in the diet is not always capable of reaching its highest levels in the human circulation and its absorption depends on the type and position of the sugar moieties^{10,11}. The oral bioavailability of the QU in rats is <17%, whereas in humans, the bioavailability is ~1%⁹. The reasons for such poor QU oral bioavailability are low solubility in water (0.17–7.7 µg/ml), artificial gastric fluids (5.5 µg/ml) and artificial intestinal fluids (28.9 µg/ml) and extensive metabolism in the gastrointestinal tract¹².

A promising approach to improve the water solubility of lipophilic drugs such as QU consists in incorporating them into lipid-based nanocarriers (NEs) – a drug delivery system composed of liquid and solid lipids (or a mixture of both). The advantages of lipid-based over polymer-based NEs are better tolerability and scaling up in the industrial production. More importantly, these systems are capable of protecting the drug from degradation, improve drug bioavailability and control drug release^{13–15}. Formulation studies represent a crucial key to the development of a successful drug delivery formulation. Physico-chemical characterization of both carriers and drugs, as well as their mutual interaction at a molecular level is fundamental in drug discovery.

There is a plethora of research work addressing solubility and delivery of QU in general. However, the broadness and depth of work specifically addressing oral delivery of QU remain limited in the literature. For example, solid lipid NEs (SLN) with 155 nm in size were developed to enhance the gastrointestinal absorption of QU but their low loading capacity is a disadvantage¹⁶. Lipid nanocapsules (LNC) with 30 nm¹⁷ and microemulsions with 38 nm¹² have been produced to increase QU solubility. Such systems have employed large amount of surfactant and cosurfactant in the formulation thus introducing higher levels of toxicity. Similarly, self-assembled phospholipid-based cationic NEs with 400 nm¹⁸ and cationic

nanostructured lipid carriers with 126 nm¹⁹ have shown to improve the therapeutic efficacy of QU on oral administration. However, cationic tensoactives can also result in increased toxicity.

In previous studies^{13–15}, we have demonstrated that lipid-based NEs (i.e. solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsions) could be obtained using the hot solvent diffusion method, by only changing the composition of the formulations. While the formation of milky colloidal dispersions was observed at lower PEG 660-stearate concentrations, optically transparent aqueous dispersions with higher capacity to load QU were produced. This has been associated with the following: (i) critical concentration of PEG 660-stearate, (ii) the diffusion of the solvent towards the aqueous phase and (iii) an increase of the temperature above the phase inversion temperature (PIT) of PEG 660-stearate. The best system developed in these studies has a monodisperse population of 20 nm droplets, exhibiting excellent stability and with the ability to incorporate QU (0.5 mg/ml)¹⁵.

Pharmacology studies developed on a model of murine airway allergic inflammation have demonstrated that orally administered nanosized QU emulsions could reduce the asthma process. Such reduction, however, was not observed after the oral administration of a QU suspension at the same dose²⁰. The dosage administered orally is higher when compared with the parenteral route and the NE volume is a limiting factor. Oral delivery NEs should have a significant quantity of incorporated drug to allow the dose-response testing and they should be small in size to allow absorption. It is important to note that the type and concentration of surfactant should be adequate to ensure safety of NEs.

The objective of this study is to increase the amount of QU encapsulated varying the concentration of QU, PEG 660-stearate, lecithin and castor oil (CO) while keeping the physicochemical properties suitable for oral delivery as described in the related work. To better understand the ability to load and release the drug, we also investigated the molecular interactions between QU and NEs.

Methods

Materials

Quercetin, 12-hydroxystearic acid–polyethylene glycol copolymer (PEG 660-stearate/Solutol HS15[®]), CO and deuterated water/sodium 3-(trimethylsilyl)-[2,2,3,3-2H4]-1-propionate (TSP, 0.05%) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Hydrogenated soybean lecithin (Phospholipon 80[®]) was purchased from Lipoid (Steinhausen, Switzerland). High-performance/pressure liquid chromatography (HPLC) grade methanol was purchased from Pareac[®] (Barcelona, Spain) and HPLC grade water was prepared using a Milli-Q system from Millipore[®] (Billerica, MA). Ethanol, acetone, phosphoric acid and other chemicals used in the study were of analytical reagent grade.

Preparation of the QU-NE

The NE was prepared using the hot solvent diffusion method associated with the PIT¹³. Briefly, a mixture with QU, CO and lecithin in acetone:ethanol (60:40, v/v; 5 ml) at 60 °C was added to an aqueous phase (50 ml) containing the PEG-660 stearate surfactant previously heated at 80 °C, under magnetic stirring, at 700 rpm. The resulting colloidal suspensions were then cooled to room temperature. The organic solvent was evaporated under reduced pressure (23 mbar; ~15 min), and the final volume reduced to 20 ml, to ensure that the final formulation contained no organic solvent. Finally, the colloidal suspensions were filtered through an 8-µm filter. The tested formulations, prepared in triplicates, are

summarized in Table 1. For the preparation of QU-loaded NEs (QU-NE), the drug was added to the organic phase of the formulation. The effect of oil (CO), surfactant (PEG-660 stearate) and co-surfactant (soybean lecithin) amount on the size, zeta potential, morphology, drug content and release from the NEs was evaluated and correlated to molecular interactions studies.

Size and zeta potential measurements

The particle size and zeta potential of the NEs were obtained through light scattering and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series from Malvern Instruments (Worcestershire, UK). The particle size measurements were performed at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each size analysis lasted 300 s and it was performed with a detection angle of 90°. The hydrodynamic radius was determined using Stokes-Einstein's equation, $R = (\kappa_B T / 6\pi\eta D)$, where κ_B is Boltzmann's constant (J/K), T is the temperature (in K), D is the diffusion coefficient and η is the viscosity of the medium – water in this case ($\eta = 0.89$ cP at 25 °C).

For zeta potential measurements, the samples were diluted in ultrapure Milli-Q[®] water (Billerica, MA) and placed in the electro-phoretic cell where an alternating voltage of ±150 mV was applied. The zeta potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

Transmission electron microscopy

Drops of 0.001% (w/v) NEs were deposited on glow-discharged carbon-coated copper grids and they were stained with 2% uranyl acetate. Specimens for cryo-TEM were prepared by quench-freezing thin liquid films of 0.1% (w/v) dispersions into liquefied ethane (–182 °C) using a Leica EM-GP humidity-controlled workstation. They were mounted in a Gatan 626 cryoholder cooled with liquid nitrogen and transferred to the microscope. The specimens were observed at low temperature (177 °C), using a Philips CM200 “Cryo” microscope operating at 80 kV. A low-dose procedure was used to reduce radiation damage in the areas of interest before actual image recording on Kodak SO163 films²¹.

Determination of QU concentration in the NEs

The QU content and entrapment efficiency were determined by HPLC analysis. It was performed on a Shimadzu LC-20AD system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AD pump, SPD-20A UV detector, CMB-20A system controller, CTO-20AC column oven. The sample injection was done through a Rheodyne 7125 valve with a 20-µl loop. The detector was set at 369 nm and peak areas integrated automatically by computer using a LC solution[®] software program (Kyoto, Japan). The experiments were carried out using a

Table 1. Composition of the nanocarriers as prepared through the hot solvent diffusion technique associated with the phase inversion temperature method.

Nanocarrier	PEG 660-stearate (%; p/v)	CO (mg)	LEC (mg)	QU (mg)
QU-NE 1	1.2	100	10	10
QU-NE 2	1.2	100	10	15
QU-NE 3	1.2	100	10	20
QU-NE 4	1.2	100	10	25
QU-NE 5	1.2	120	10	25
QU-NE 6	1.2	100	20	30
QU-NE 7	1.2	120	20	30
QU-NE 8	1.5	150	20	30

CO, castor oil; LEC, lecithin; QU, quercetin.

reversed-phase Zorbax ODS Agilent Technologies® (Wilmington) C18 column (150 mm × 4.6 mm I.D., with a particle size of 5 μm), maintained at 40 ± 1 °C. The mobile phase consisted of a 1% phosphoric acid:methanol mixture (45:55 v/v; pH 2.7) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 ml min⁻¹.

ICH²² was used to validate the HPLC method using the following parameters: specificity, linearity, accuracy, precision and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The calibration graph for QU was linear over the range of 0.25–10 μg ml⁻¹ ($r^2=0.9997$). The regression equation of the media calibration graph ($n=3$) was $y=97\ 397x+542.58$. The variance analysis (ANOVA) confirmed the linearity of the method ($F_{cal} > F_{critical}$; $p=0.05$). The detection limit and quantification limits were 0.0670 and 0.2030 μg ml⁻¹, respectively, indicating that the method was sufficiently sensitive to be used to determine the QU content in the colloidal suspensions. The recovery values ranged from 97.0% to 103.0% satisfying the acceptance criteria for accuracy in this study. The intra-day and inter-day relative SD values were <3%, indicating an acceptable variability of the QU content determination ($p<0.05$).

For HPLC analysis, an aliquot of NE was completely dissolved in mobile phase. The QU content (total concentration) in the NE was calculated after determining the drug concentration in the methanolic solutions and was expressed in μg of QU/ml of NE. The QU recovery was calculated as being the percentage of the total drug concentration found in the NE in relation to the initially added amount. The entrapment efficiency (%) was estimated as the difference between the total concentration of QU and the supernatant concentration obtained by ultrafiltration/centrifugation procedure using Ultrafree-MC membranes 10 000 NMWL from Millipore® (Billerica, MA). All samples were analyzed in triplicates.

In vitro release studies

For the experiment, 2 ml of the NE was placed into a dialysis bag MWCO 10 000 from Sigma–Aldrich® (Missouri St. Louis, MO). The dialysis bags were placed into a beaker containing 250 ml of ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0) solution to maintain sink conditions. The release medium was maintained at 37 °C under magnetic stirring at 75 rpm. Samples of the release medium were taken after 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h. The release medium was immediately replaced with fresh medium. The samples were analyzed by HPLC under the same conditions as described earlier. To evaluate the effect of the dialysis membrane on the drug release rate, a solution of QU in ethanol was placed into a dialysis bag and the QU diffusion through the membrane was assayed using the same conditions. All the experiments were carried out in triplicates. The cumulative amounts of QU released (in %) were plotted against time (h). For kinetics evaluation of the release profiles, the data were fitting to the model-dependent of zero order, first order and Higuchi, as follows:

$$Q = Q_0 + Kt \quad (\text{Zero - Order Model})$$

$$\ln Q = \ln Q_0 - Kt \quad (\text{First - Order Model})$$

$$Q = Kt^{1/2} \quad (\text{Higuchi model})$$

where Q is the amount of drug released in time t , Q_0 is the initial concentration of drug and K is the model release constant.

In order to compare, the release profiles of QU from NEs (QU-NE 3 and QU-NE 8) were used the model-independent methods, i.e. *difference factor* (f_1) and *similarity factor* (f_2), as follows:

$$f_1 = \left[\left(\sum_{t=1}^n IP1_t - P2_t \right) / \left(\sum_{t=1}^n P1_t \right) \right] \times 100 \quad (\text{Difference Factor})$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + 1/n_{t=1} \sum_{t=1}^n (P1_t - P2_t)^2 \right]^{-0.5} \right\} \times 100 \quad (\text{Similarity Factor})$$

where n is the number of release sample times, and $P1_t$ and $P2_t$ are the percent released of QU at each time, t , from QU-NE 3 and QU-NE 8, respectively.

HATR–FTIR measurements

Horizontal attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (HATR–FTIR) measurements were performed using Shimadzu IR Prestige-21 equipment (Kyoto, Japan), at 23 °C. The NEs, pure or loaded with QU (1.0 or 1.5 mg/ml), were deposited on a ZnSe crystal support. Interferograms were averaged for 50 scans, collected in the frequency range from 400 to 4000 cm⁻¹, with a resolution of 2 cm⁻¹. The spectra were analyzed through Shimadzu IR solution software 1.5. Frequency values shifts as well variations in the bandwidth of the NEs vibrational bands were analyzed. Bandwidths were measured relative to a straight base line at 3/4 of peak height position^{23,24}.

NMR spectroscopy

Acyl methylenes ¹H spin-lattice relaxation times (T_1) of NEs pure and containing the QU were obtained using a NMR Anasazi Instrument 60 MHz (Indianapolis). Inversion recovery pulse sequences (180°– τ 90°) were performed at 20 °C, with time delay (τ) ranging from 0.2 to 102.4 s, using deuterated water as solvent. Chemical shifts were referenced to TSP signal at 0 ppm²⁵. The T_1 values and relative intensities were obtained by fitting the exponential data to the NUTS code.

Results

Preparation and characterization of the QU-NE

To incorporate a larger amount of QU in the system, a formulation optimization was carried out by varying the amount of oil, surfactant and co-surfactant (Table 1) and the effect was evaluated on the size, zeta potential, morphology and QU content and release from the NEs.

Size and zeta potential measurements

A summary of the physicochemical properties, QU content and recovery in the NEs is presented in Table 2. For QU-NE 1, 2, 3 and 8, a mean size of ~20 nm and a polydispersity index (PDI) of 0.2 were measured and the zeta potential was negative (up to –5 mV). Analysis of size and zeta potential for QU-NE 4, 5, 6 and 7 indicate that they are polydisperse systems with a destabilization after visual inspection (Figure 1). Hence, the formulations QU-NE 1, 2, 3 and 8 were chosen for the determination of QU content. Results are similar for unloaded NEs (data not shown).

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy images of QU-NE 3 and QU-NE 8 are shown in Figure 2. The images of negatively stained

Table 2. Physico-chemical characteristics of quercetin-loaded nanocarriers.

NE	Size (nm)	PDI	ζ-potential (mV)	QU content (μg/ml)	Recovery (%)
QU-NE 1	18.67 ± 0.80	0.12 ± 0.01	-2.12 ± 1.00	495.8 ± 25.5	99.3 ± 5.2
QU-NE 2	18.24 ± 0.20	0.16 ± 0.03	-5.14 ± 0.80	718.0 ± 15.7	95.8 ± 2.1
QU-NE 3	18.93 ± 0.20	0.18 ± 0.01	-4.81 ± 1.40	1000.9 ± 9.9	100.9 ± 3.2
QU-NE 4	81.27 ± 56.43	0.26 ± 0.07	-13.14 ± 10.4	-	-
QU-NE 5	6750.0 ± 2.53	1.00 ± 0.29	-14.15 ± 2.36	-	-
QU-NE 6	5160.0 ± 2.53	0.87 ± 0.22	-13.90 ± 1.62	-	-
QU-NE 7	6470.0 ± 3.47	0.74 ± 0.05	-17.10 ± 3.11	-	-
QU-NE 8	19.25 ± 0.20	0.20 ± 0.01	-5.34 ± 0.50	1492.0 ± 21.1	99.5 ± 0.1

PDI, polydispersity index.

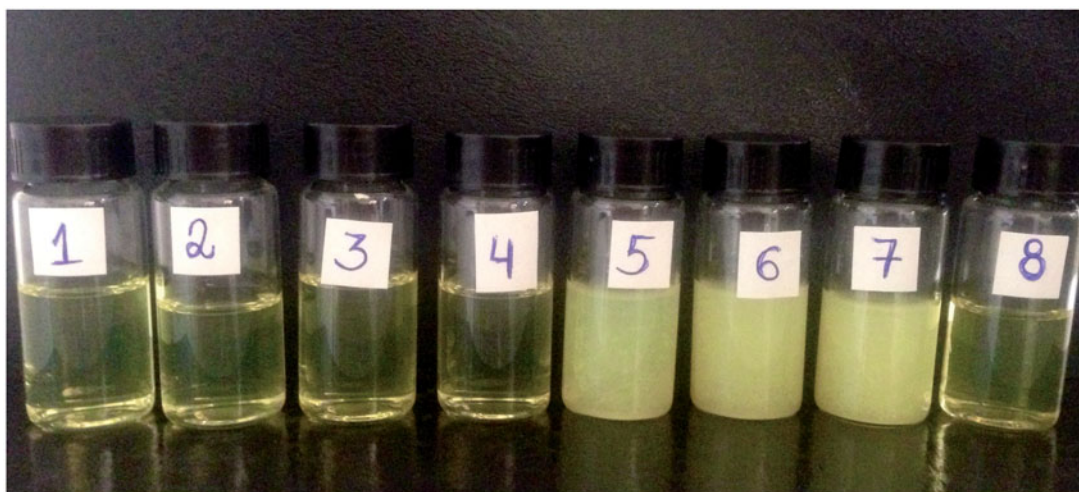


Figure 1. Visual inspection of nanosized emulsions.

preparations suggest that in both cases, the particles exhibit some faceting (Figure 2a and b). Qualitatively, the particles in QU-NE 8 seem to be slightly larger than those in QU-NE 3. Since the particles are soft/liquid, however, they are expected to spread and flatten to some extent during drying on the carbon film. The apparent shape, size and size distributions should be considered with caution. Cryo-TEM was performed in order to observe the systems in which the morphology would be preserved. Although the contrast is rather low due to the small size and low density of the objects embedded in vitreous ice, the particles still have a faceted aspect (Figure 2b and d). In addition, the contrast of some particles observed at higher magnification would be consistent with nanocapsule morphology, as it can be more clearly observed from the QU-NE 3 suspension (inset in Figure 2b). The average diameter measured from a population of about 300 particles is ~ 15 nm for both QU-NE 3 and QU-NE 8, in rather good agreement with DLS data (~ 19 nm). The precision cannot be better due to the lack of definition of the particle contour. The slightly larger value measured by DLS may come from the fact that the corona of PEG-660 stearate molecules may not be visualized in cryo-TEM images due to a very low density.

Determination of QU concentration in the NEs

The drug content, determined by HPLC, showed that it was possible to encapsulate 1.5 mg/ml of QU, in QU-NE 8. It is 3 times the amount of drug when compared with QU-NE 1, while maintaining the physicochemical characteristics. The entrapment efficiency was done for formulations QU-NE 3 and QU-NE 8, and it has been observed that the drug incorporation was $\sim 100\%$ in both cases (Table 2).

In vitro release studies

Figure 3 shows the *in vitro* release kinetics of QU from QU-NE 3 and QU-NE 8 in ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0) at 37 °C. Release experiments were carried out at pH 4.0 due to the low stability of QU in neutral and basic pH values. The experiments were carried out in sink conditions, since the maximum concentration of QU that were reached in the release medium corresponded to 10% of its saturation concentration (1.8 mg/ml). QU release profiles were characterized by biphasic kinetics, consisting of a faster release in the first 8 h, followed by a sustained release of the drug over 24 h. The release of the QU from nanoemulsions followed a first order kinetics (Table 3), in that the release velocity is directly related to the remaining concentration into carrier. The first order rate constant (K) indicated that QU exhibits controlled release when incorporated into nanoemulsions. However, the comparison factors showed that the release profile of QU-NE 3 was similar to the release profile of QU-NE 8, since f_1 was < 15 and $f_2 > 50$ ($f_1 = 8.61$ and $f_2 = 71.38$).

Molecular interactions studies

HATR-FTIR measurements

HATR-FTIR spectra of NEs, pure and loaded with QU, were recorded in order to detect the NEs vibrational modes which are affected by QU, as well as the changes induced by the flavonoid at the membrane (Figure 4). For unloaded NE, the following vibrational peak frequencies were detected and analyzed: (a) the phosphate antisymmetric stretching vibration (ν_{as} PO_2^-), at 1220.94 cm^{-1} ; (b) the carbonyl stretching mode (ν C=O), at 1691.57 cm^{-1} ; the ether

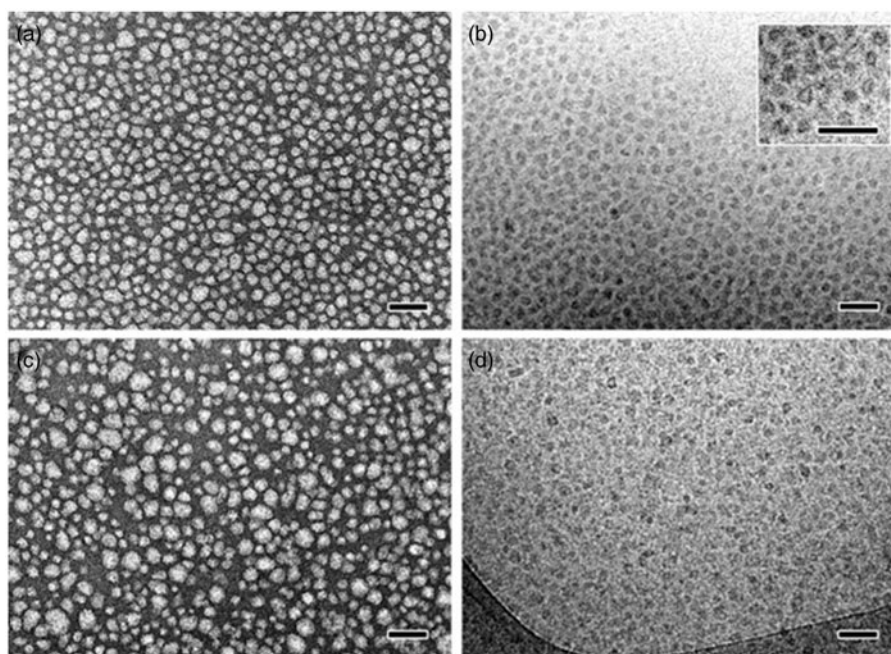


Figure 2. TEM images of nanocarriers QU-NE 3 (a and b) and QU-NE 8 (c and d): (a and c) negative staining and (b and d) cryo-TEM. The inset in (b) is a magnified view of the particles. All scale bars: 50 nm.

Table 3. Kinetics parameters obtained from QU release profiles.

	Free-QU	QU-NE 3	QU-NE 8
Correlation coefficient (r^2)			
Zero order	0.9268	0.7824	0.8491
First order	0.9934	0.9664	0.9998
Higuchi	0.9847	0.9568	0.9724
First order parameters			
Equation	$y = -0.3333x + 4.5614$	$y = -0.0867x + 4.4698$	$y = -0.1226x + 4.6082$
K (h^{-1})	0.34	0.09	0.12

stretching vibrations (ν C–O–C), at 1458.18 and 1095.57 cm^{-1} ; the symmetric and antisymmetric stretching vibrations of the acyl chains methylenes, at 2856.58 and 2927.94 cm^{-1} , respectively. In these spectra, no changes induced by QU were detected on NE frequencies. Some FTIR bands are sensitive to hydration conditions, such as the $\nu_{as}\text{ PO}_2^-$ and $\nu\text{ C=O}$ ones²⁶. Since no significant variation in the NE vibrational mode frequencies was observed after interaction with QU, it can be suggested that the flavonoid does not modify the number of hydrogen bonds among the phosphate and carbonyl groups contained in NEs and the hydrogen atoms of QU or water.

The variations on the NE HATR–FTIR vibrational peak bandwidths (at 3/4 of peak height) after interaction with QU are listed in Table 4. The bandwidth variations reflect possible conformational changes, as well as alterations on the motional degree of freedom induced by QU in the NEs. In general, the group bandwidth increases as the molecular motional freedom increases²⁷.

The analysis of the HATR–FTIR bandwidths showed that the polar region of QU-NE 3 was affected by QU, whereas this flavonoid interacted with all the regions (polar, interfacial and hydrophobic ones) of QU-NE 8 system. A disordering effect induced by QU at 1 mg/ml (QU-NE 3) was observed in the phosphate group (present on the lecithin component), at the NE polar region, since the flavonoid increased the $\nu_{as}\text{ PO}_2^-$ bandwidth in $\sim 12\%$. At 1.5 mg/ml (QU-NE 8), this increase corresponded to 20% (Figure 3). With respect to the $\nu\text{ C=O}$ band, it was possible to observe a bandwidth

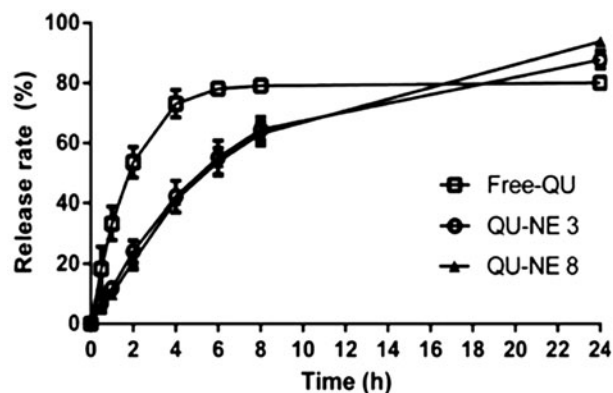


Figure 3. Cumulative percentage of QU released from nanocarriers.

increase of $\sim 21\%$, induced by QU only at the concentration of 1.5 mg/ml, indicating that the flavonoid also disordered the interfacial region of the system (probably on carbonyl regions of the CO and PEG-660 stearate). At the concentration of 1.0 mg/ml, no significant changes induced by the flavonoid were detected in the NEs $\nu\text{ C=O}$ band.

With respect to the QU effects on the NE hydrophobic region, the flavonoid, at concentrations of 1.5 mg/ml (in QU-NE 8), induced a decrease of 20% on the $\nu_s\text{ CH}_2$ band (Figure 4). These results suggest that, at 1.5 mg/ml, the flavonoid promotes an ordering effect at the NE acyl chain methylenes (located on lecithin, CO and PEG-660 stearate components). It is important to note that the significance of the bandwidth variations described earlier is in agreement with previous studies reported in the literature²⁷.

NMR spectroscopy

The effect of QU on the NE acyl chain methylenes was also observed by NMR T_1 measurements. At 1 mg/ml, the QU-induced variation on

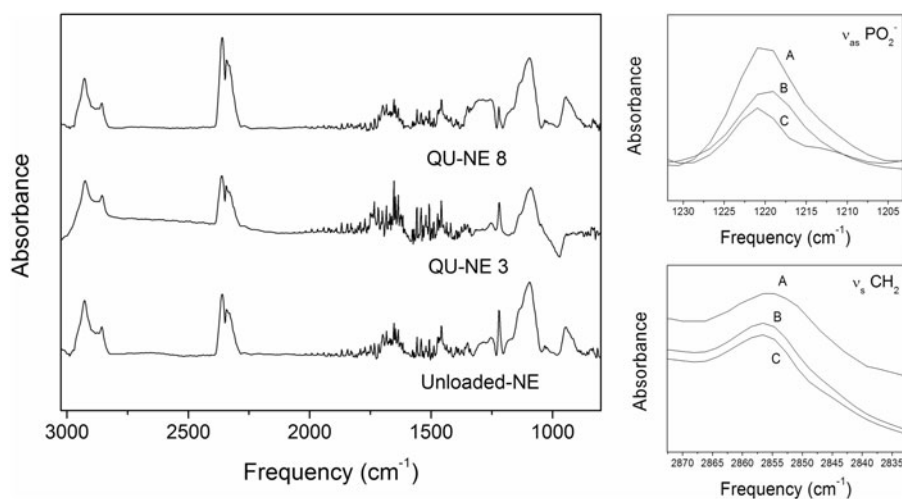


Figure 4. HATR-FTIR spectra of unloaded-NE and loaded with quercetin at 1.0 mg/ml (QU-NE 3) as well as at 1.5 mg/ml (QU-NE 8). Zooms of FTIR phosphate antisymmetric stretching vibration ($\nu_{as} PO_2^-$) and acyl chain methylenes symmetric stretching vibration ($\nu_s CH_2$) bands, related to unloaded-NE (A), nanocarriers containing quercetin 1 mg/ml, QU-NE 3 (B) and nanocarriers containing quercetin 1.5 mg/ml, QU-NE 8 (C) are also showed. Interferograms were obtained from the average of 50 scans, with a resolution of 2 cm^{-1} , in a frequency range of $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

Table 4. Influence of quercetin on the FTIR bandwidth of nanocarriers.

Vibrational mode assignment	Unloaded-NE Bandwidth (cm^{-1})	QU-NE 3 Bandwidth (cm^{-1})	Variation (cm^{-1})	QU-NE 8 Bandwidth (cm^{-1})	Variation (cm^{-1})
$\nu_s CH_2$	15.00	15.00	0.00	12.00	3.00
$\nu C=O$	70.83	70.80	0.03	90.00	20.83
$\nu_{as} PO_2^-$	8.33	9.49	1.16	10.00	1.67

nanocapsules $^1H T_1$ was not detectable (data not shown). However, the incorporation of 1.5 mg/ml QU reduced the recovery $^1H T_1$ (obtained from the curves showed on Figure 5) of NEs acyl chains methylenes (at 1.56 ppm) from 3.84 (related to unloaded nanoemulsion) to 3.77 s, which corresponds to QU-loaded systems (Figure 5). For NE systems, the $^1H T_1$ variation of 0.07 s suggests a discrete ordering effect induced by QU²⁸. This is in agreement with FTIR results.

Discussion

The main results in the present study are the demonstration that it was possible to incorporate higher amounts of QU in a lipid-based NE with a reduced size and morphology of a nanocapsule that can be administrated through the oral route. The molecular interaction studies allowed the understanding of system structure and drug release rate.

Several types of NEs with QU have been developed in the literature, but only a few studies specifically address lipid NEs for orally delivery. Solid lipid NEs (SLN) composed of glyceryl monostearate, soya lecithin, Tween-80 and PEG 400 have shown to enhance the gastrointestinal absorption of QU¹⁶. These NEs with a size of 155 nm are capable of improving bioavailability of QU as compared with QU suspension in rats after oral administration. Although SLN is a promising delivery system to enhance the oral absorption of poorly water-soluble drugs, the limited loading capacity is a disadvantage with a drug loading average of 13%¹⁶. Barras et al.¹⁷ produced LNCs to increase the solubility of QU. The best system described in this study was composed of caprylic/capric triglyceride (20%), soybean lecithin (3%) Solutol[®] HS15 (32.4%) and QU (3%). The nanocapsules had size of 44 nm and were able to incorporate $\sim 1.5\text{ mg/ml}$ of QU. Microemulsion systems have also been developed to increase the solubility and oral absorption of

QU¹². In this study, the optimized microemulsion formulation consisted of ethyl oleate (7%, w/w), Tween-80 (48%, w/w) and dehydrated ethanol (45%, w/w). Under this condition, the mean droplet diameter of microemulsion was 38.9 nm and solubility of QU was 4.138 mg/ml. In both cases described earlier, the solubility of QU increased significantly due to the great amount of surfactant and cosurfactant used in the formulation and this can be related to higher toxicity. Self-assembled phospholipid-based cationic NEs with 400 nm¹⁸ and cationic nanostructured lipid carriers with 126 nm¹⁹ were developed for improving the therapeutic efficacy of QU on oral administration. Despite cationic NEs have gained increased attention in drug delivery for their interactions with negatively charged intestinal mucosa, it is well known that cationic tensoactives can result in toxicity, ulceration and damage to gastrointestinal mucosa dependent on their structure and concentration.

Our NEs have shown some advantages after the optimizations of formulation performed in this study. It has been possible to incorporate a large amount of QU (1.5 mg/ml) in NEs that are smaller (20 nm) and use less surfactant and cosurfactant (Table 1). The system physicochemical properties led to improved QU bioavailability^{20,29} with interesting therapeutic effects *in vivo*, such as anti-inflammatory and antioxidant.

Formulations were prepared through the combination of the two low-energy methods, hot solvent diffusion and PIT, as previously described¹⁴. The mean particle size and PDI were $\sim 20\text{ nm}$ and 0.2, respectively.

A size of $\sim 20\text{ nm}$ is generally reported in the literature for microemulsions³⁰. The common types of colloidal dispersions that can be created from oil, surfactant and co-surfactant are microemulsions and nanoemulsions. The most fundamental way for distinguishing nanoemulsions and microemulsions is in terms of their thermodynamic stabilities and fabrication methods.

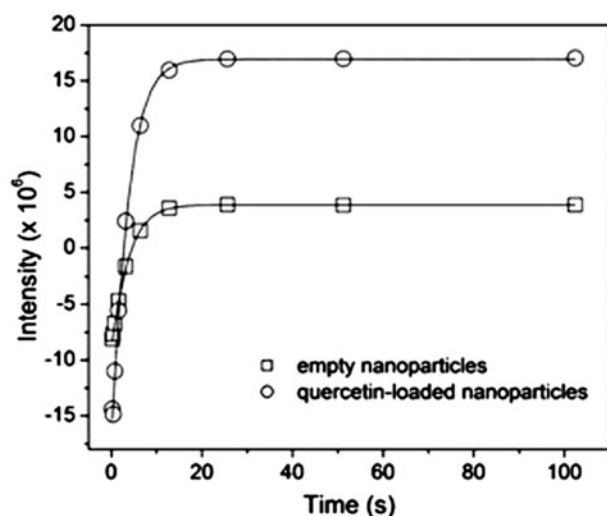


Figure 5. Recovery of methylene protons FID (free induction decay) signals after several inversion pulses for unloaded NE (open squares) and loaded with quercetin 1.5 mg/ml (QU-NE 8, open circles). From these curves, the proton spin-lattice relaxation time ($^1\text{H } T_1$) value for each sample was calculated. The $^1\text{H } T_1$ data were reached at 60 MHz, 23 °C, using a τ range of 0.2–102.4 s.

Microemulsions can be formed spontaneously by simply bringing oil, water and surfactant together at a particular temperature without supplying any external energy as they are thermodynamically stable systems. In contrast, nanoemulsions require the input of external energy to convert the separate components into a colloidal dispersion because they are thermodynamically unstable systems³¹. In our case, it was necessary to input external energy, but probably the association of both methods, solvent diffusion and PIT, contributes to the development of the nanoemulsion system with a size characteristic of the microemulsions.

We observed that the compounds variation allowed higher QU incorporation in the NE. Our best results were for the QU-NE 3 and QU-NE 8 in which it was possible to encapsulate ~ 1 and 1.5 mg/ml QU, respectively, while maintaining good physicochemical properties. We associate this effect with the largest amount of CO and PEG-660 stearate in the formulation. In comparison with the previous studies, the system developed in this work allowed incorporate a larger amount of QU that is essential for further experiments *in vivo*. The preparation of optimal formulations belonging to the nanometer range, with monodisperse size characteristics, that were stable upon dilution was strongly dependent on the proportions of compounds and reports in the literature also have shown that increasing the surfactant concentration increased the entrapment efficiency for lipid nanoparticles³².

Zeta potential is a measurement of the magnitude of the electrostatic or charge repulsion or attraction between particles, and is one of the fundamental parameters known to affect stability. It is currently accepted that zeta potentials $>|30|$ mV are required for full electrostatic stabilization. However, this rule does not strictly apply to systems, which contain steric stabilizers³³. In our case, the low zeta potential values (-4 mV) did not represent a low stability of the system. Previous studies^{13–15} indicate that the negative charge of the nanosized emulsions was provided by the presence of charged phospholipids as phosphatidylserine, phosphatidylinositol and phosphatidic acid in the lecithin powder and the zeta potential was reduced with the increase of the PEG-stearate concentration. The reduction observed in zeta potential values reaching values near to zero can be explained by the location of polyethylenoglycol chains of PEG 660-stearate at the droplet surface. This occurs probably due to the complete hiding of the negative charges by the polyethylene

glycol chains of the PEG-660 stearate. The reduction of surface charge of the nanoparticles and the steric stabilization of the colloidal dispersions provided by the presence of PEG chains have been reported in several studies concerning the preparation of stealth nanoparticles³⁴.

The release studies using a non-biorelevant media can be considered as a first approach to gain information on the drug release from a pharmaceutical dosage form³⁵. The purpose of the release study in this work was to evaluate if the QU could be satisfactorily released from formulations, considering that a drug only may be absorbed through the gastrointestinal tract and act on tissue if it is firstly released from formulations. In this case, the chosen medium for release study should consider mainly the drug solubility than its correlation with biological medium. In this sense, preliminary studies showed that QU has high solubility and stability in ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0), making it suitable to the proposed release studies, however, the use of hydroalcoholic solution for release tests should be considered a preliminary choice. In this media, the release of QU occurred at the similar rate for QU-NE 3 and QU-NE 8 as demonstrated by *f1* and *f2*, but more slowly from the release profile obtained for free drug. The velocity of release (K) from nanoemulsions was ~ 3 times smaller, indicating that the NEs were able to control the release of the drug. The mixture of the lecithin and PEG-660 stearate surfactants probably self-assembled into mono or multilayers, forming a shell around the NEs.

TEM and cryo-TEM images suggest that the particles exhibit some faceted aspect and the contrast of some particles observed at higher magnification would be consistent with a nanocapsule morphology. It is in agreement with a previous study of our group that SAXS results indicate an internal structure of a nanosized emulsion with a core-shell spherical structure¹⁵. LNCs were firstly described by Heurtault et al.³¹, in this study, they prepared a lipid NE made with caprylic-capric acid triglycerides, soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine and PEG 660-stearate. This formulation allowed to form a LNC because the mechanical ability to PEG-660 estearate be slightly cohesive, while keeping the initial structure, is interesting because such a system could support its own break (low Ee) without generating a coalescence phenomenon due to the surfactant departure (low Ene). The hydrophilic interactions between the ethylene oxide units of PEG-660 stearate at the interface should explain this result. Consequently, such elasticity properties, which are characteristic of this structure, should favor the regular breaking of droplets into nanostructures using a physical shock. Their structure was found to consist of an oily liquid triglyceride core surrounded by a tensoactive cohesive interface (i.e. a nanocapsule system). This group developed and patented LNCs and they are characterized by a hybrid structure between polymer nanocapsules and liposomes³¹. This system is very similar to the one described here also because also allowed extended release profile.

In addition, since the NE hydrophobic region contains several fatty acids with 18 carbons in their alkyl chains, it is possible that the hydrophobic region of the NEs plays an important role in the slower QU release behavior, when compared with the free drug. In fact, the FTIR and NMR analyzes indicated that QU interacts with different regions of the NE components, such as the polar (the phosphate group of lecithin), interfacial (the carbonyl groups located in lecithin, CO and PEG-660 stearate) and hydrophobic (the methylene groups located in lecithin, CO and PEG-660 stearate) ones. The consequence of this interaction is a probable anchoring of QU causing a disordering effect on the polar and interfacial regions and ordering of the hydrophobic region, probably due to an increase of the intermolecular contacts in this part of the NE. The effect of an active substance on the order of a system is related to the permeability of

the latter^{36,37}. Thus, in the surfactant nanocapsule shell, QU would be released from the polar and interfacial regions of the components lecithin and PEG-660 stearate, but the ordered NE-hydrophobic region (including the lecithin, PEG-660 stearate and also the CO hydrophobic regions), with a reduced permeability, could retain more QU and allow the sustained release of the flavonoid, as observed in the *in vitro* release studies. Studies of QU molecular interaction with the NE were essential to a better understanding of the system structure and their release rate. Additional structural studies of the particles, however, are still needed for a complete comprehension of these phenomena.

Conclusion

The results presented in this article revealed that it was possible to incorporate higher amounts of QU in a lipid-based NE with a reduced size and morphology of a nanocapsule. The dissolution data showed good fitted to a kinetic of first order release of QU probably due to the shell formed by the surfactants around the NE and the flavonoid ordering effect in the emulsion hydrophobic regions, which may reduce the system permeability.

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflicting interests. The authors are grateful to CNPq for the financial support to the project Casadinho/PROCAD under proposal 552457/2011-6. G.H. and J.B. received grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat J, et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1304–10.
- Jakhar R, Paul S, Park YR, et al. 35,7,3',4'-Pentamethoxyflavone, a quercetin derivative protects DNA from oxidative challenges: potential mechanism of action. *J Photochem Photobiol B Biol* 2014;131:96–103.
- Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, et al. Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. *Trop J Pharm Res* 2014;13:1561–6.
- Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res* 2003;48:601–6.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008;585:325–37.
- Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 2007;45:2179–205.
- Ruiz MJ, Fernandez M, Pico Y, et al. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem* 2009;57:3180–6.
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;9:229–34.
- Khaled KA, El-Sayed YM, Al-Hadiya BM. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. *Drug Dev Ind Pharm* 2003;29:397–403.
- Hollman PC, Gaag M, Mengelers MJ, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 1996;21:703–7.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc* 2010;69:273–8.
- Gao Y, Wang Y, Ma Y, et al. Formulation optimization and *in situ* absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;71:306–14.
- Dora CL, Silva LFC, Tagliari MP, et al. Formulation study of quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. *Lat Am J Pharm* 2011;30:289–96.
- Dora CL, Putaux JL, Pignot-Paintrand I, et al. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. *J Braz Chem Soc* 2012;23:1972–81.
- Dora CL, Silva LFC, Putaux JL, et al. Poly(ethylene glycol) hydroxystearate-based nanosized emulsion: effect of surfactant concentration on their formation and ability to solubilize quercetin. *J Biomed Nanotechnol* 2012;8:1–9.
- Li H, Zhao X, Ma Y, et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control Release* 2009;133:238–44.
- Barras A, Mezzetti A, Richard A, et al. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2009;379:270–7.
- Date AA, Nagarsenker MS, Patere S, et al. Lecithin-based novel cationic nanocarriers (Leciplex) II: improving therapeutic efficacy of quercetin on oral administration. *Mol Pharm* 2011;8:716–26.
- Liu L, Tanga Y, Gao C, et al. Characterization and biodistribution *in vivo* of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;115:125–31.
- Rogério AP, Dora CL, Andrade EL, et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res* 2010;61:288–97.
- Durrieu V, Giandini A, Balcacem MN, et al. Preparation of aqueous anionic poly-(urethane-urea) dispersions: influence of the nature and proportion of the urethane groups on the dispersions and polymer properties. *J Appl Polym Sci* 2004;94:700–10.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH-Q2 (R1), 2005 November, Geneva, Switzerland.
- Manrique-Moreno M, Howe J, Suwalsky M, et al. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. *Lett Drug Des Discov* 2010;7:50–6.
- Tunc I. The effect of the presence of Ag nanoparticles on the photocatalytic degradation of oxalic acid adsorbed on TiO₂ nanoparticles monitored by ATR-FTIR. *Mater Chem Phys* 2014;144:444–50.
- De Lima VR, Caro MSB, Munford ML, et al. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. *J Pineal Res* 2010;49:169–75.
- Kan-zhi L, Jackson M, Sowa MG, et al. Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1996;1315:73–7.
- Arsov Z, Quaroni L. Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 2007;150:35–48.

28. Peres I, Rocha S, Pereira MC, et al. NMR structural analysis of epigallocatechin gallate loaded polysaccharide nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2010;82:861–6.
29. Schwingel TE, Klein CP, Nicoletti NF, et al. Effects of the compounds resveratrol, rutin, quercetin, and quercetin nanoemulsion on oxaliplatin-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;387:837–48.
30. McClements DL. Nanoemulsions *versus* microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012;8:1719–29.
31. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, et al. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002;19:875–80.
32. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 2009;379:201–9.
33. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003;24:4283–300.
34. Zhang X, Pan W, Gan L, et al. Preparation of a dispersible PEGylate nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray-drying. *Chem Pharm Bull* 2008;56:1645–50.
35. Morais JM, Burgess DJ. In vitro release testing methods for vitamin E nanoemulsions. *Int J Pharm* 2014;475:393–400.
36. Ali MH, Moghaddan B, Kirby DJ, et al. The role of lipid geometry in designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs. *Int J Pharm* 2013;453:225–32.
37. Chen C, Tripp CP. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:2266–72.

Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats

Gabriela Hädrich, Gustavo Richter Vaz, Michelle Maidana, Jadel Muller Kratz, Gecioni Loch-Neckel, Daniely Cornélio Favarin, et al.

Pharmaceutical Research
An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists

ISSN 0724-8741

Pharm Res
DOI 10.1007/s11095-015-1844-6

Volume 32 | Number 12 | December 2015

PHARMACEUTICAL RESEARCH

aaps An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists

ONLINE FIRST

	CLASS 1	CLASS 2
High Permeable	MW ≤ 400 CLASS 1A METABOLISM	MW > 400 CLASS 1B HEPATIC UPTAKE
Low Permeable	MW ≤ 400 CLASS 3A RENAL CLEARANCE	MW > 400 CLASS 3B HEPATIC UPTAKE (OR) RENAL
	Acids / Zwitterions	Bases / Neutrals

CLASS 4
RENAL CLEARANCE

Springer

11095 | ISSN 0724-8741
32(12) 3785-4012 (2015)

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Anti-inflammatory Effect and Toxicology Analysis of Oral Delivery Quercetin Nanosized Emulsion in Rats

Gabriela Hädrich^{1,2} · Gustavo Richter Vaz¹ · Michelle Maidana¹ · Jadel Muller Kratz³ · Gecioni Loch-Neckel⁴ · Daniely Cornélio Favarin⁵ · Alexandre de Paula Rogério⁵ · Flávio Manoel Rodrigues da Silva Jr^{1,2} · Ana Luiza Muccillo-Baisch^{1,2} · Cristiana Lima Dora¹

Received: 3 August 2015 / Accepted: 9 December 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

ABSTRACT

Purpose This study evaluates the advantage of the quercetin encapsulation in nanosized emulsion (QU-NE) administered orally in rats in order to demonstrate its anti-oedematous and antioxidant effects as well as its toxicity.

Methods The nanocarriers were prepared using the hot solvent diffusion with the phase inversion temperature methods. The nanocarriers physicochemical properties were then investigated. The anti-edematous activity was tested using paw edema in rats. In addition, NF- κ B expression in subcutaneous tissue of the paws was accessed by immunohistochemistry while the lipid peroxidation was analyzed in the liver by malondialdehyde reaction with thiobarbituric acid. Hematological, renal and hepatic toxicity as well as the genetic damage were also evaluated.

Results The results demonstrated that QU-NE exhibited pronounced anti-oedematous property comparable to drug

diclofenac. This effect was associated with NF- κ B pathway inhibition. The lipid peroxidation was also only reduced in rats treated with QU-NE. Besides this, no genetic damage, hematological, renal or hepatic toxicities were observed after administration of QU-NE.

Conclusions These results suggest that quercetin nanosized emulsion exhibits anti-oedematous and antioxidant properties and does not demonstrate toxic effects. This indicates that it has a potential application in the treatment of inflammatory diseases.

KEY WORDS anti-oedematous activity · antioxidant · inflammation · lipid nanocarriers · quercetin · toxicity

ABBREVIATIONS

ALT	Alanine-aminotransferase
AST	Aspartate-aminotransferase
CMC	Carboxymethylcellulose
CO	Castor oil
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	Sodium 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonate
HPLC	High pressure liquid chromatography
LY	Metoprolol tartrate and lucifer yellow
MDA	Malondialdehyde
MES	Methanesulfonic acid
MN	Micronucleus
NCEs	Normochromatic erythrocytes
NE	Unloaded nanosized emulsion
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
P _{APP}	Intestinal permeability coefficients
PCEs	Polychromatic erythrocytes
PDI	Polydispersed index
PEG 660-stearate	12-hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer
PIT	Phase inversion technique

✉ Cristiana Lima Dora
cristianadora@gmail.com; cristianadora@furg.br

¹ Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av Itália, Km 8, Rio Grande, RS 96210-900, Brazil

² Laboratório de Ensaios Farmacológicos e Toxicológicos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS 96210-900, Brazil

³ Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

⁴ Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, Bloco K, sala 107, Florianópolis, SC 88040-900 Brazil

⁵ Laboratório de Imunofarmacologia experimental, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG 38025-350, Brazil

QU	Quercetin
QU-NE	Quercetin nanosized emulsion
QU-SUSP	Free quercetin
ROS	Reactive oxygen species
TEER	Transsepithelial electrical resistance

INTRODUCTION

Inflammation is a normal biological process in response to a tissue injury, microbial pathogen infection and chemical irritation. At the damaged site, inflammation starts with the migration of immune cells from blood vessels due to the release of mediators. The uncontrolled or exacerbated inflammation could cause increase of cells recruitment and pro-inflammatory mediators as well as oxidative burst (reactive oxygen species for example). This could lead to tissue damages as observed in several inflammatory diseases (1–4).

The most used drugs for the treatment of inflammatory diseases such as asthma, arthritis, glomerulonephritis and other are the steroidal (corticosteroids) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Although such drugs have pronounced pharmacological activity, they present severe adverse effects that preclude their long-term use (5). The search for new molecules and drugs carriers could contribute to the development of new anti-inflammatory drugs more effective and with less adverse effects (5,6).

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone – QU), a representative compound of the flavonoid family, is one of the most common dietary polyphenols. QU is widely spread in the plant kingdom, found in vegetables, fruits, medicinal herbs and red wine. Several studies have shown the multiple biological activities of QU. Among them, it is the pronounced anti-inflammatory property, an effect that is associated with the QU ability to block inflammatory mediators, inducible enzymes and nuclear transcription factor activation (7–9). QU could also reduce inflammation through the scavenge of free radicals that activate transcription factors to generate pro-inflammatory cytokines, which are often found in clinical patients suffering from chronic inflammatory diseases (10,11). However, the poor aqueous solubility, short biological half-life, and low oral bioavailability hamper the application of QU as a therapeutic agent (12–14).

Incorporating QU into lipid-based nanocarriers is an approach to deal with drugs poor water solubility, protect them from degradation, improve compound bioavailability, and control the drug release process. Lipid nanocarriers are typically composed of biocompatible lipid core and hydrophilic surfactant at the outer shell, which can entrap the lipophilic drugs in the inner lipid core and enhance their solubility in gastro-intestinal fluids, thereby promoting the intestinal absorption, enhanced bioavailability of the drug or sustained duration of action (15,16).

Previous studies of our research group have shown the feasibility of incorporating QU into lipid systems (17–19). Pharmacology studies carried out in a murine airway allergic inflammation model demonstrated that the orally administered nanosized emulsion with QU could reduce the asthma process. Such a reduction was not observed after the oral administration of a quercetin suspension at the same dose (20). Also, QU-NE demonstrates a protective role against neuro- and hepatotoxicity induced by oxaliplatin (21). Following up on these results, here we investigate the advantage of the quercetin encapsulation in nanosized emulsion in order to prove the anti-oedematous and antioxidant effects of QU lipid nanocarriers administered orally in rats as well as its toxicity.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Quercetin (QU), 12-hydroxystearic acid–polyethylene glycol copolymer (PEG 660-stearate/Solutol HS15®), castor oil (CO), λ -carrageenan, tiobarbituric acid were purchased from Sigma–Aldrich (Missouri, USA). Diclofenac was purchased from Novartis® (São Paulo, Brazil). Carboxymethylcellulose (CMC) was purchased from Natural Pharma (São Paulo, Brazil). Hydrogenated soybean lecithin (Phospholipon 80®) was purchased from Lipoid (Steinhausen, Switzerland). Alanine-aminotransferase (ALT), aspartate-aminotransferase (AST), urea and creatinine were purchased from Labtest (São Paulo, Brazil). High-pressure liquid chromatography (HPLC) grade methanol was purchased from Pareac® (Barcelona, Spain) and HPLC grade water was prepared using a Milli-Q system from Millipore (Billerica, USA). Ethanol, acetone, phosphoric acid, and other chemicals used were analytical reagent grade. Hank's balanced salt solution (HBSS), sodium 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonate (HEPES), methanesulfonic acid (MES), trypsin, metoprolol tartrate and lucifer yellow (LY) were purchased from Sigma–Aldrich (Missouri, USA).

Preparation and Characterization of the Quercetin-Loaded Nanosized Emulsion and Quercetin Suspension

The nanosized emulsion (NE) was prepared using the hot solvent diffusion method with the phase inversion technique (PIT) (19). Briefly, a solution containing QU, castor oil (CO) and lecithin in acetone:ethanol (60:40, *v/v*) at 60°C was added to an aqueous phase containing surfactant PEG 660-stearate at 80°C, under magnetic stirring (700 rpm). The resulting colloidal suspensions were then cooled to room temperature, the organic solvent evaporated under reduced pressure, and the final volume adjusted to 20 mL. Finally, the colloidal

suspensions were filtered through an 8 μm filter paper. QU was added to the organic phase of the formulation to prepare the nanosized emulsion (QU-NE). As for the biological experiments, free quercetin (QU-SUSP) was administered in a suspension form which has been prepared through the addition of equivalent QU amount to aqueous carboxymethylcellulose dispersion (0.5%; p/v).

Size and Zeta Potential Measurements

Particle size and zeta potential have been determined using light scattering and laser-doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Particle size measurements were performed at 25°C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each particle size analysis lasted for 300 s and it was performed with an angle detection of 90°. Stokes-Einstein's equation was used to determine the hydrodynamic radius. With respect to zeta potential measurements, the samples were placed in the electrophoretic cell with a potential of ± 150 mV. The zeta potential values are calculated using Smoluchowski's equation as mean electrophoretic mobility values.

Determination of Quercetin Concentration and Entrapment Efficiency in the Lipid Nanocarriers

The analysis was carried out using a UFLC Shimadzu LC-20 AD system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT pump, SPD-20A UV detector, CMB-20A system controller, CTO-20 AC column oven, and the sample injection was performed through a Rheodyne 7125 valve with a 20 μL loop. The detector was set at 369 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a LC solution® software program (Kyoto, Japan). The experiments were performed using a reversed-phase Zorbax ODS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) C18 column (150 mm \times 4.6 mm I.D., with a particle size of 5 μm), maintained at $40 \pm 1^\circ\text{C}$. The mobile phase consisted of a 1% phosphoric acid:methanol mixture (45:55 v/v ; pH 2.7) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL min^{-1} .

The QU content (total concentration) in the colloidal suspensions was calculated after determining the drug concentration in the mobile phase (in μg of QU/mL of suspension). The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of quercetin in the supernatant obtained by ultrafiltration/centrifugation procedure using Ultrafree-MC membranes 10,000 NMWL from Millipore (Billerica, USA). All samples were analyzed in triplicates batches.

In Vitro Release Studies

For the experiment, 2 mL of the nanocarrier was placed into a dialysis bag MWCO 10,000 from Sigma-Aldrich® (Missouri, USA). The dialysis bags were placed into a becker containing 250 mL of ethanol:distilled water (35:75, v/v ; pH 4.0) solution to maintain sink conditions. The release medium was maintained at 37°C under magnetic stirring at 75 rpm. Samples of the release medium were taken after 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h. The release medium was immediately replaced with fresh medium. The samples were analyzed through HPLC under the same conditions as described above. To evaluate the effect of the dialysis membrane on the drug release rate, a solution of quercetin in ethanol was placed into a dialysis bag and the quercetin diffusion through the membrane was assayed using the same conditions. All experiments were carried out in triplicates. The cumulative amounts of QU released (in %) were plotted against time (h).

In Vitro Intestinal Permeability

Caco-2 cells (ATCC:HTB-37) were maintained as previously described (22). For transport experiments, 1.0×10^5 cells (passages 121–123) were seeded on polycarbonate filter inserts (0.6 cm^2 , pore size 0.4 μm ; Millipore, Billerica, MA, USA) and allowed to grow and differentiate for 21–22 days. The transepithelial electrical resistance (TEER) and the permeability of the paracellular marker Lucifer yellow (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as monolayers integrity markers. Only monolayers with TEER values above 200 Ωcm^2 (before and after the experiments) were considered.

The intestinal epithelial permeability was determined from transport rates across Caco-2 cell monolayers (apical to basolateral). QU stock solution (5 mg/mL , DMSO) and all formulations were diluted to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (equivalent amounts of QU) in HBSS pH 6.5. Before the experiments, cell monolayers were gently rinsed and equilibrated for 30 min at 37°C with the same blank buffer. The transport experiments were run for 90 min at 37°C under constant stirring (150 rpm). Receiver sides filled with HBSS pH 7.4 were sampled at appropriate times, and the amount of QU permeated was determined by HPLC analysis as described in “Determination of quercetin concentration and entrapment efficiency in the lipid nanocarriers” section. The apparent permeability coefficients (P_{app} , cm/s) were calculated from the equation 2:

$$P_{\text{app}} = \Delta Q / \Delta t \times 1 / AC_0$$

where $\Delta Q/\Delta t$ is the steady-state flux (mol/s); C_0 is the initial concentration in the donor chamber at each time interval (mol/mL); and A is the surface area of the filter (cm^2) (23). Data are reported as the mean \pm SD of three independent experiments.

In Vivo Anti-oedematous Activity

Animals

Male Wistar rats (8 weeks old and weighing around 250–300 g) obtained from the Animal Facility of the Federal University of Rio Grande were used in this study. Animals were maintained in conventional cages, with normal temperature conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity (60–80%) and light/dark cycle of 12 h, with food and water *ad libitum*. This experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of the Rio Grande (FURG) (23116.006240/2012-68) in accordance with national and international Guidelines.

Experimental Design

Animals were divided into five groups ($n=15$). The treatment saline solution (0.9%), quercetin suspension in CMC (QU-SP), unloaded-NE and QU-NE were given once a day, orally per 5 days before the test, by gavage with a volume (20 mg kg^{-1}) calculated according to the animal's weight. The experimental design was based on *in vitro* release test, once a day, since we have a sustained quercetin release over 24 h. Previous study showed that quercetin release profile followed a first order kinetics, indicating that QU exhibits controlled release when incorporated into the nanoemulsion (19). The doses of QU and QU-NE have been chosen based on previous data (20,24). The dose and treatment with Diclofenac (10 mg kg^{-1} - given once, intraperitoneally 90 min before the edema induction) follow the research literature on the use of this drug as a positive control for the carrageenan-induced hind paw edema test (25,26).

Carrageenan-induced Hind Paw Edema

The carrageenan-induced hind paw edema in rats was used to establish the anti-oedematous activity of the QU-NE, and it was conducted as described in (27), by injection of 100 μl of 1% (w.v⁻¹) λ -carrageenan, type IV, diluted in saline in the left hind paw pad. As control, 100 μl saline solutions were injected into that of the right hind paw. Paw edema was then determined using a water plethysmometer (PanLab, Barcelona, Spain) at times 0, 1, 2, and 3 h. In preliminary experiments we evaluated the effect of paw edema over a time period. The results have shown that carrageenan-induced hind paw edema is an acute model with peak of inflammation within 2–3 h. A slight decline in the paw edema was observed at the fourth hour. For this reason, T3 hours was chosen since we intended to evaluate the response of inflammation mediators during the inflammation peak (data not shown). After the 3rd hour animals were euthanized and the liver, bone marrow, hind paw tissue and blood were collected and properly stored until

processing. The percentage inhibition of edema was calculated by the following equation (28):

$$\% \text{inhibition of edema} = \frac{[(V_t - V_0)_{\text{Control}} - (V_t - V_0)_{\text{Treated}}]}{(V_t - V_0)_{\text{Control}}} \times 100$$

Where V_t is the volume at different intervals after carrageenan injection and V_0 is the paw size initial volume recorded just before carrageenan injection.

Immunohistochemistry

The subcutaneous tissue of the paws was collected when euthanasia was done after the third hour of the edema measurement and fixed at 10% formol for 24 h, then kept in 70% ethanol until use. Immunohistochemical detection of p65 NF- κ B was carried out using polyclonal rabbit anti-phospho-p65 NF- κ B (#sc-109, 1:100) from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Tissues embedded in paraffin were cut into thick sections (5- μm). Slides were deparaffinized through a series of xylene baths and rehydrated through graded alcohol solutions. High temperature antigen retrieval was performed by immersion of the slides in a water bath at 95–98°C in 10 mmol/L trisodium citrate buffer pH 6.0, for 45 min. After overnight incubation at 4°C with primary antibodies, the slides were washed with PBS and incubated with the secondary antibody Envision plus (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), ready-to-use, for 1 h at room temperature. The sections were washed in PBS, and the visualization was completed by use of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako) in chromogen solution and light counterstaining with Harris's haematoxylin solution. Images were obtained with a microscope (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY) and Digital Sight Camera (DS-Fi1; Nikon). Control and experimental tissues were placed on the same slide and processed under the same conditions. Nonimmune rabbit serum was used as a negative control.

Antioxidant Activity

Lipid peroxidation was measured through determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (29). Liver homogenates were added to a reaction mixture made with 20% acetic acid, thiobarbituric acid (0.8%), Milli Q water and sodium dodecyl sulfate (SDS, 8.1%). Samples were heated at 95°C during 30 min and after cooling by 10 min, Milli Q water and n-butanol was added. After centrifugation (3000 g during 10 min at 15°C), the organic phase was placed in a microplate reader and the fluorescence registered after excitation at 515 nm and emission of 553 nm. The concentration of TBARS (nmol/mg of wet tissue) was calculated employing tetramethoxypropane (TMP) as standard.

Toxicological Analysis

Biochemical and Hematological Analysis

To carry out analyzes of biochemical and hematological parameters, blood samples were collected and stored individually with heparin for hematological evaluation, or without heparin for biochemical analysis. Hematological evaluations were performed by manual measurement of lymphocytes, monocytes and segmented neutrophils levels. For the biochemical analyzes, blood samples were centrifuged at 3000 rpm at room temperature for 15 min, and the serum obtained was stored at -20°C for analysis. ALT and AST, as indirect indicators of liver damage, have been established according to the manufacturer instructions (Labtest, Brasil). Results were expressed as U/L. As indirect indicators of kidneys damage, urea and creatinine were measured according to the manufacturer's instructions (Labtest, Brasil).

Micronucleus Assay

The micronucleus test was performed according to OECD (2001) (30). Two slides of each animal were prepared and the ratio of polychromatic erythrocytes (PCEs) and normochromatic (NCEs) was recorded, the number of micronuclei per 1000 PCEs was counted.

Statistical Analysis

The data were reported as mean \pm S.E.M. We used ANOVA to compare statistical significance among different treatments in each individual experiment. When significant differences were identified, individual comparisons were subsequently made with Tukey *post-hoc*'s. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Preparation and Characterization of the QU-NE

In the present study, a combination of the two low-energy methods, hot solvent diffusion and PIT, was employed to produce lipid nanocarriers containing QU. A summary of the physicochemical properties, QU content, and entrapment efficiency is presented in Table I. It has been observed mean size and polydispersed index (PDI) of approximately 20 nm and 0, 2, respectively. The zeta potential was about -4 mV. Unloaded nanocarriers were analyzed and the results were similar. Quercetin content, determined by HPLC, showed that it was possible to encapsulate 1.5 mg/ml of quercetin in the nanosized emulsion. The entrapment efficiency was evaluated and the QU incorporation into the nanocarriers was

around 98%. Figure 1 shows the *in vitro* release kinetics of quercetin from QU-NE 8 in ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0) at 37°C . The experiments were carried out in sink conditions, since the maximum concentration of QU that were reached in the release medium corresponded to 10% of its saturation concentration (1.8 mg/mL). Quercetin release profiles were characterized by biphasic kinetics, consisting of a quicker release in the first 8 h, followed by a sustained release of the drug over 24 h.

In Vitro Intestinal Permeability

The intestinal permeability coefficients (P_{app}) of QU in aqueous solution (from DMSO stock solutions), free QU or QU-NE (all samples corresponding to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were measured by Caco-2 cell assay. Permeability was obtained from unidirectional experiments in the absorptive direction (apical to basolateral). A P_{app} value of $8.43 \pm 2.60 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ was obtained for the free aqueous solution of quercetin. Metoprolol, a low/high permeability boundary marker, showed a P_{app} value of $55.77 \pm 22.99 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$. Lucifer yellow, a paracellular marker, showed a P_{app} value of $0.60 \pm 0.18 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$. When incorporated into CMC suspensions, QU presented a permeability profile similar to dissolved QU ($P_{\text{app}} = 7.88 \pm 1.04 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$). The P_{app} value obtained for the nanocarrier system was significant lower than both free QU systems, with a $P_{\text{app}} = 1.25 \pm 0.52 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$.

In Vivo Anti-oedematous Activity

Intraplantar injection of carrageenan induced significantly greater rat paw volume. Rat treated with QU-NE or diclofenac presented significantly less pronounced oedematous responses to carrageenan, beginning at 1 h after carrageenan administration and continuing throughout the experimental period (p value < 0.0001) (Fig. 2). Increase paw edema was observed in rats stimulated by carrageenan. Table II presents the delta of the paw edema and the percentage of inhibition of all treatments for all times tested calculated using equation 1. It is important to note the inhibition of QU-NE was 78.6, 78.8 and 90.6% in the first, second and third hour, respectively. At the third hour, the QU-NE treatment inhibited more effectively than treatment with diclofenac. We draw the attention that free QU administered with the same treatment protocol (20 mg kg^{-1} , 5 days orally) have not shown any anti-inflammatory effect in this model. No significant alteration on oedema was observed in the animals treated with vehicle, and injected with carrageenan, when compared to animals injected with carrageenan without treatment.

Table I Physico-chemical Characteristics of Nanosized Emulsion

NE	Size (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	QU content (mg.mL ⁻¹)	Recovery (%)
NE	19.32 ± 0.41	0.14 ± 0.011	-5.12 ± 0.60	–	–
QU-NE	19.25 ± 0.20	0.20 ± 0.004	-5.34 ± 0.50	1.5 ± 0.02	99.5 ± 0.10

PDI Polydispersity index. The results were expressed by mean ± S.E.M. of 3 replicates

Effect of QU-NE on the NF- κ B Activation in Rat Hind Paw Edema

Figure 3 shows the results of the immunohistochemical assay. The paw tissue injected with saline (control group) showed no fosforilation of p65 NF- κ B (Fig. 3a). However, in the paw tissue of rats injected with carrageenan treated or not with vehicle it was detected the phosphorylated p65 subunit of NF- κ B (Fig. 3b, and c). On the other hand, QU-NE given orally to mice, reduced the p65 NF- κ B activation (Fig. 3e), and less reduction was observed in animals treated with QU-SUSP (Fig. 3d). Diclofenac similar to QU-NE also reduced the p65 NF- κ B activation (Fig. 3f).

Antioxidant Activity

The anti-oxidant activity of the level of MDA was assessed as an index of lipid peroxidation in liver tissue. As can be seen in Fig. 4, the MDA level was increased in the animals injected with carrageenan treated or not with vehicle. QU-NE decreased significantly ($p < 0.001$) the lipid peroxidation when compared to group injected with carrageenan. The remarkable decrease in lipid peroxides in liver tissue when QU-NE was administrated indicates a reduction in the formation of reactive oxygen species (ROS), which plays a major role in cell injury indicating a better antioxidant activity of QU when loaded in nanocarriers. Free QU and diclofenac were unable to reduce the lipid peroxidation.

Toxicological Analysis

The results of haematological analysis, transaminases (AST and ALT), urea and creatinine levels are shown in Table III. No alteration in segmented neutrophils, lymphocytes and

monocytes were observed during the administration of blank nanocarriers and QU-NE. The enzymes in the peripheral blood from the rats have not shown any statistically significant difference from the saline group. This demonstrates a normal function of the liver and kidneys after the test.

The micronucleus (MN) was used to evaluate genetic damage data for rat bone marrow cells. The treatment with QU-NE and with unloaded-NE did not show statistically significant increases in the mean number of MN frequency of micronucleus per 1000 cells for the groups threated ($3.3 \pm PNE$) when compared with control (3.5 ± 0.8).

DISCUSSION

The main results in the present study are the demonstration that QU-NE exhibits pronounced anti-oedematous property when evaluated in carrageenan hind paw edema model in rats due to reduce the activation of NF- κ B pathway. In addition QU-NE reduced the lipid peroxidation and does not demonstrate toxic effects.

Over the past few decades, drug delivery systems have provided tremendous strength in improving the reliability and safety of existing drugs. Quercetin, a representative compound of the flavonoid family, is one of the most common dietary polyphenols. Researches over the past decade have shown the compound to possess the preventive and therapeutic value against a wide variety of diseases (31,32). Despite its promising pharmacological activity, quercetin's low oral bioavailability remains a major hurdle. This makes quercetin a molecule of interest to drug delivery scientists (33).

To improve the oral efficacy, many edible delivery systems have been developed to enhance the bioavailability of quercetin through various mechanisms, including the complexation with cyclodextrins and liposomes (34,35). A major drawback of such technologies is the stability issue during sterilization and storage. On the other hand, nanoemulsion is one of the most oral delivery methods studied to protect against degradation, enhance solubility, and facilitate higher biological uptake of drugs. Specifically, oil-in-water nanoemulsions consist of oil droplets dispersed in an aqueous continuous phase, with the oil droplets being surrounded by a thin interfacial layer of emulsifier molecules. The lipophilic compounds, which have a low aqueous solubility, can be easily incorporated into emulsion-based delivery systems (36,37). Hence, the development of a safe, stable and efficient delivery method for

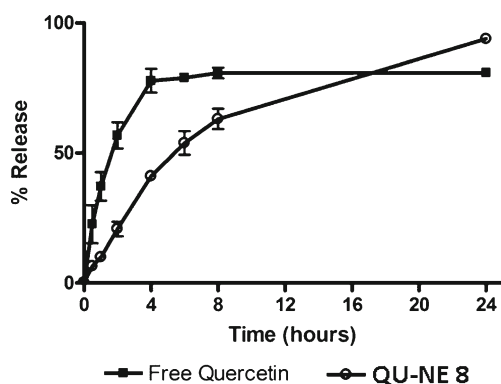
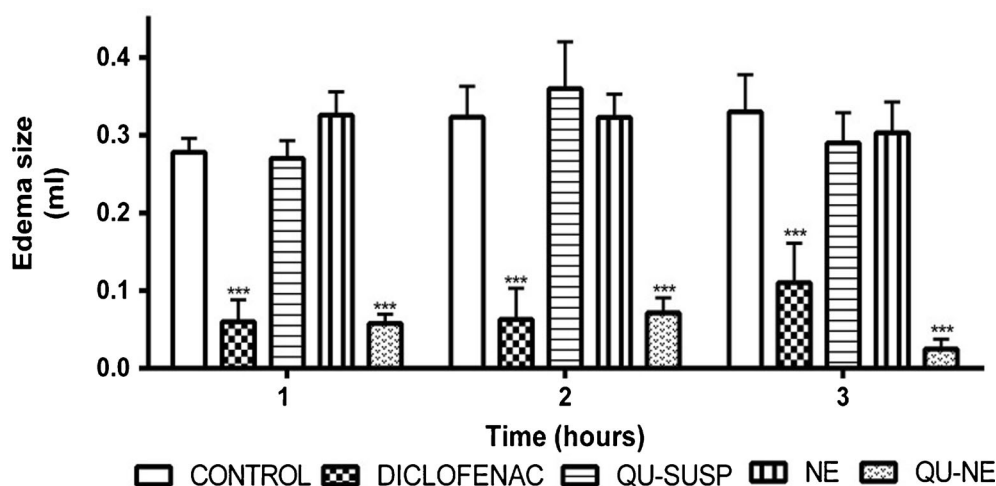


Fig. 1 Cumulative percentage of QU released from nanocarriers.

Fig. 2 Activity anti-edematous of diclofenac, free quercetin (QU-SUSP), unloaded nanosized emulsion (NE), and quercetin nanosized emulsion (QU-NE), on carrageenan-induced mouse paw oedema. Rats were evaluated for paw edema at 1, 2, and 3 h post-carrageenan injection. Results were expressed as the edema size (ml). Each point represents the mean \pm SEM of six rats. ***Statistically significant compared with control group at $p < 0.001$.



quercetin encapsulation could present an interesting approach to investigate its potential therapeutic property.

Considering the potential of nanoemulsions as oral drug delivery system, we have evaluated the advantage of the quercetin encapsulation in nanosized emulsion administered orally in rats in order to prove its anti-oedematous and antioxidant effects as well as its toxicity.

Carrageenan induced hind paw edema is the standard experimental model of acute inflammation. Carrageenan is the phlogistic agent of choice for testing anti-inflammatory drugs as it is not known to be antigenic and is devoid of apparent systemic effects. Moreover, the experimental model exhibits a high degree of reproducibility. Inflammation induced by carrageenan is acute, nonimmune, well researched and highly reproducible. It is characterized by releasing of several pro-inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and oxygen-derived free radicals and consequently by increasing of vascular permeability, and cell migration mainly neutrophils (38,39).

Our results show that QU-NE exhibits pronounced oral anti-oedematous property. However, free quercetin (QU-SUSP) administered with the same treatment protocol did

not have the effect. The anti-inflammatory activity of free quercetin was previously studied in carrageenan-induced rat paw edema (40). It was administrated orally (equivalent dose with 20 mg kg⁻¹ of quercetin) 30 min before the test and a slightly decrease (10%) in edema was observed. The anti-inflammatory activity of a quercetin-loaded nanostructured lipid carrier gel was evaluated by Chen-Yu *et al.* (2012) (41) in an acute inflammation model using the ear edema caused by xylene. The formulation was administrated topically at the site of inflammation (0.2 mg QU/ear). The results showed that the quercetin-loaded nanostructured lipid carrier gel inhibited 69.4% of the inflammation when compared to control and free QU decreases only 12%. Our results for QU-SUSP were similar, indicating the low bioavailability of this flavonoid when administered in free form.

These findings corroborate the idea that quercetin into a nanocarrier could have a higher anti-inflammatory effect, thus, representing an effective delivery system. In a previous study (20) we analyzed the oral absorption of quercetin nanosized emulsion in rats by HPLC-MS. In this study at 2 h and 3 h after the treatment it was detected quercetin metabolite in plasma of rats treated only with the nanocarrier

Table II Effect of Quercetin Nanosized Emulsion, Free Quercetin and Diclofenac on the Carrageenan-induced Paw Edema Size

Treatment	1 h		2 h		3 h	
	Δ Paw edema \pm SEM (ml)	% inhibition	Δ Paw edema \pm SEM (ml)	% inhibition	Δ Paw edema \pm SEM (ml)	% inhibition
Saline	0.28 \pm 0.02 ^b	6.3 \pm 3.6	0.32 \pm 0.04 ^b	10.9 \pm 4.5	0.33 \pm 0.05 ^b	12.9 \pm 10.0
Diclofenac	0.06 \pm 0.03 ^{a,c}	77.8 \pm 1.1	0.06 \pm 0.04 ^{a,c}	80.4 \pm 12.3	0.11 \pm 0.05 ^{a,c}	65.1 \pm 14.6
QU-SUSP	0.27 \pm 0.02 ^b	7.0 \pm 5.7	0.36 \pm 0.06 ^b	13.4 \pm 8.5	0.29 \pm 0.04 ^b	19.6 \pm 4.7
NE	0.33 \pm 0.03 ^b	4.1 \pm 4.1	0.32 \pm 0.03 ^b	9.9 \pm 4.3	0.30 \pm 0.04 ^b	15.6 \pm 8.1
QU-NE	0.06 \pm 0.01 ^{a,c}	79.1 \pm 4.3	0.07 \pm 0.02 ^{a,c}	77.8 \pm 5.9	0.02 \pm 0.02 ^{a,c}	92.5 \pm 3.8

Values of the delta of the paw edema are expressed in mean \pm SEM ($n = 6$). Different letters in the same column are significantly different. ^a $p < 0.001$ significantly different from saline. ^b $p < 0.001$ significantly different from diclofenac. ^c $p < 0,05$ significantly different from free-quercetin (QU-SUSP)

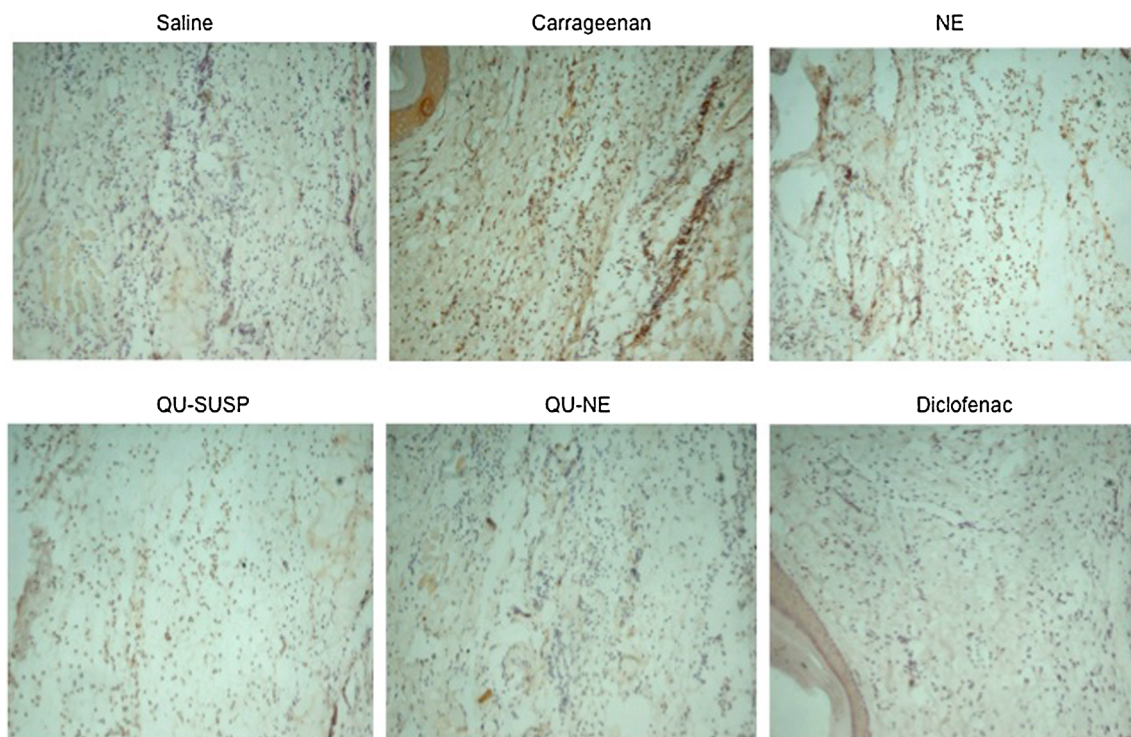


Fig. 3 Quercetin nanosized emulsion reduced the NF- κ B expression in the paw stimulated with carrageenan. Rats were treated with saline or carrageenan (1% per paw) and then the paws were isolated at the 3 h. Rats were treated orally with unloaded nanosized emulsion (NE), free quercetin (QU-SUSP), quercetin nanosized emulsions (QU-NE) (20 mg kg^{-1} , p.o.) and diclofenac (10 mg kg^{-1} , i.p.), 90 min before carrageenan injection and then immunohistochemistry was performed for NF- κ B. Representative images of phospo-p65 NF- κ B immunohistochemistry staining of saline (a), carrageenan (b), NE (c) QU-SUSP (d), QU-NE (e) and Diclofenac (f) were stained with periodic acid-Schiff (original magnifications, $\times 200$).

but not after the treatment with free quercetin. This result suggests that the delivery system developed improves the oral bioavailability of quercetin. The oral bioavailability of several flavonoids such as berberine (42), puerarin (43) and curcumin (44) also showed significant improvement when compared to non-emulsion based oral formulations.

When emulsions are used as oral delivery systems, the pharmacokinetic behaviors, body distribution, gastric empty time, and many other physiological parameters may be modified to improve the oral bioavailability of target bioactives. There are three primary mechanisms by which lipids and lipophilic excipients affect drug absorption, bioavailability and disposition after oral administration. These are: (i) change of composition and character of the intestinal milieu, (ii) the

recruitment of intestinal lymphatic drug transport, and (iii) the interaction with enterocyte-based transport processes (16). In this context, we tested the nanocarriers *in vitro* intestinal permeability in the Caco-2 cell model. As a result, free quercetin permeated better and faster when compared to the QU encapsulated into lipid nanocarrier in this assay. Here we note a limitation of this methodology since it was tested for 90 min. QU-NE release studies indicate an *in vitro* drug release of 24hs.

It is well documented that the NF- κ B pathway can be activated in the inflamed tissue. Yoon et al. (2011) (45) investigated the effect of QU in primary cultured orbital fibroblasts from Graves' Orbitopathy and the results showed that this flavonoid significantly attenuated the IL- 1β or TNF- α concentration *via* reduction of activation of NF- κ B pathway. Wan

Fig. 4 Effect of diclofenac, free quercetin (QU-SUSP), unloaded nanosized emulsion (NE), and quercetin nanosized emulsion (QU-NE) on the lipid peroxidation. Each point represents the mean \pm SEM of six rats. **Statistically significant compared with control group at $p < 0.01$.

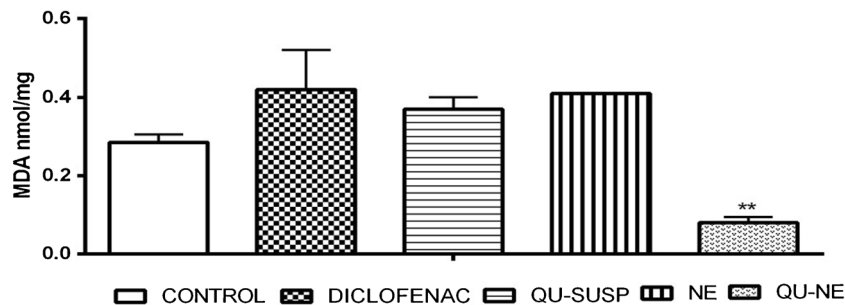


Table III Biochemical and Hematological Analysis

	AST (U/dl)	ALT (U/dl)	UREA (md/dL)	Creatinine (md/dL)	Neutrophils (%)	Lymphocytes (%)	Monocytes (%)
Saline	136.8 ± 21.7	47.2 ± 6.4	50.3 ± 1.8	0.37 ± 0.01	18.6 ± 1.9	78.4 ± 1.6	3.05 ± 0.5
Diclofenac	133 ± 42.6	122.3 ± 16.7	151.3 ± 35.6	0.63 ± 0.11	40.3 ± 1.9	58 ± 2.1	1.6 ± 0.7
QU-SUSP	128 ± 19.1	49.5 ± 3.1	53.1 ± 1.0	0.37 ± 0.02	25.9 ± 4.1	71.5 ± 3.9	2.5 ± 0.43
NE	115.2 ± 21.5	45.5 ± 3.4	52.3 ± 1.8	0.40 ± 0.03	20.1 ± 2.1	78 ± 2.1	1.8 ± 0.5
QU-NE	122.3 ± 13.8	38.3 ± 4.7	44.5 ± 3.6	0.40 ± 0.03	17.3 ± 2	80.3 ± 1.9	2.3 ± 0.5

Values are expressed as the mean ± SEM

et al. (2014) (46) reported that liposomal quercetin can effectively inhibit acute hepatitis and hepatic fibrosis induced by Con A in rats and also showed that the inhibitory effect of quercetin was associated with its ability to modulate the NF- κ B signal. Rogerio *et al.*, 2010 (20) demonstrated in an airways allergic inflammation models in mice induced by ovalbumin that reduction of IL-4, IL-5 concentrations, P-selectin expression and the eosinophil recruitment in the airways in animals treated with QU-NE, but not QU-SUSP, it was consequence of reduction of NF- κ B activation. Our study corroborates this result since we have demonstrated an inhibition of NF- κ B only when QU-NE was administrated in our model.

Flavonoids may inhibit NF- κ B by acting as antioxidants, since NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor (8,47). The antioxidant and anti-inflammatory activity of flavonoids were closely related since reactive oxygen species were produced during the inflammation process by phagocytic cells. Reactive oxygen species may be involved in the cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated conversion of arachidonic acid into pro-inflammatory intermediates (48). Quercetin blocked both the COX-2 and lipoxygenase pathways at relatively high concentrations, while at lower concentrations it blocked mainly the lipoxygenase pathway (49). In order to evaluate the antioxidant activity of QU-NE it was done the peroxidation lipid test. QU-NE, but not free QU, demonstrated antioxidant effects in our model. These findings corroborate a study of Ghosh *et al.* (2009) (50). As drinking water contaminated by arsenic is a well-known cause of chronic poisoning through causing oxidative stress, quercetin nanocapsule, was successfully demonstrated to improve efficacy against arsenic-induced oxidative damage in liver and brain tissues than unformulated free quercetin. These results showed that the change in pharmacokinetics, modulated by the drug encapsulation in nanocarriers, could lead to a change in pharmacodynamics, but not to a change in a pharmacological property.

The improvement in antioxidant and anti-inflammatory property was also demonstrated for other flavonoids encapsulated in nanoformulations. The effect of nanoemulsion system on the anti-inflammatory activity of curcumin was evaluated

using the mouse ear inflammation model. While curcumin suspension showed no inhibition effect, orally dosed curcumin emulsion (618.6 nm) or nanoemulsion (79.5 nm) exhibited significant reduction in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced mouse ear edema by 43 and 85%, respectively (51). The anti-oxidation ability of α -tocopherol nanocarrier was increased in all liver, kidney and brain (52). Oral administration of resveratrol and puerarin nanoformulations was proven to effectively reduce inflammation, colon inflammation and colon cancer proliferation in rodents (53–55).

NSAIDs are widely used to help relieve musculoskeletal pain and inflammation, but can cause serious upper gastrointestinal side effects including dyspepsia, peptic ulceration, and hemorrhage (56). Thus, further research is need to develop new drugs or dosage forms with less adverse effects. In addition to anti-inflammatory activity, QU may also have gastric ulcer protective effect through the reduction of the lipid peroxidation and an increase of the activity of antioxidant enzymes (57). The possibility to use quercetin as an anti-inflammatory agent with protective effect against ulcer makes this compound even more interesting when compared to NSAIDs.

QU-NE has not demonstrated toxic effects (no alteration on hematological or biochemical parameters and genetic damages) in our analyses. Earlier studies have suggested that QU at higher doses (3 g/kg) does not exhibit toxic and harmful effect in mice (58,59). As for humans, doses of 1.2 g per day are safe and well tolerated (60). Thus, QU-NE seems to be within of the tolerable limits.

CONCLUSION

The results presented herein showed that QU-NE reduced significantly the paw edema. This is probably due to the reduction of activation NF- κ B pathway. Quercetin may inhibit NF- κ B acting as antioxidant by reducing the lipid peroxidation. Furthermore QU-NE did not show toxic effects. This indicates that QU-NE has a potential application in the treatment of inflammatory diseases.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

The authors are grateful to CNPq for the financial support to the project Casadinho/PROCAD under proposal 552457/2011-6, Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais and Rede de Pesquisa em Doenças Infecciosas Humanas e Animais do Estado de Minas Gerais. G. Hádrih received grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicting interests.

REFERENCES

- Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, *et al.* Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 2009;101(1):S1–45.
- Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010;1(1):15–31.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(12):S140–6.
- Pan M-H, Lai C-S, Dushenkov S, Ho C-T. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *J Agric Food Chem.* 2009;57(11):4467–77.
- Longui CA. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. *J Pediatr.* 2007;83(5):163–71.
- Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J Pediatr.* 2006;82(5):206–12.
- Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat A, Rambert J, Fawaz F, Thiolat D, *et al.* Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(10):1304–10.
- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995;33(2):1061–80.
- Jakhar R, Paul S, Park YR, Han J, Kang SC. 3,5,7,3',4'-Pentamethoxyflavone, a quercetin derivative protects DNA from oxidative challenges: Potential mechanism of action. *J Photochem Photobiol B, Biol.* 2014;131:96–103.
- Ferrari C. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. *Biol Brat.* 2000;55(6):10.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3):273–8.
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol.* 1975;9(2–3):229–34.
- Guo Y, Bruno RS. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J Nutr Biochem.* 2015;26:201–10.
- Khaled KA, El-Sayed YM, Al-Hadiya BM. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. *Drug Dev Ind Pharm.* 2003;29(4):397–403.
- Zhang Z, Gao F, Jiang S, Chen L, Liu L, Yu H, *et al.* Bile salts enhance the intestinal absorption of lipophilic drug loaded lipid nanocarriers: mechanism and effect in rats. *Int J Pharm.* 2013;452(1–2):374–81.
- Porter CJ, Wassan KM, Constantinides P. Lipid-based systems for the enhanced delivery of poorly water soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(6):615–60.
- Dora CL, Silva LFC, Tagliari MP, Silva MAS, Lemos-Senna E. Formulation study of quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. *Lat Am J Pharm.* 2011;30(23):289–96.
- Dora CL, Silva LF, Putaux JL, Nishiyama Y, Pignot-Paintrand I, Borsali R, *et al.* Poly(ethylene glycol) hydroxystearate-based nanosized emulsions: effect of surfactant concentration on their formation and ability to solubilize quercetin. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;8:202–10.
- Hádrih G, Monteiro SO, Rodrigues MR, de Lima VR, Putaux JL, Bidone J, *et al.* Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;16:1–36.
- Rogério AP, Dora CL, Andrade EL, Chaves JS, Silva LF, Lemos-Senna E, *et al.* Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res.* 2010;61:288–97.
- Schwingel TE, Klein CP, Nicoletti NF, Dora CL, Hádrih G, Bica CG, *et al.* Effects of the compounds resveratrol, rutin, quercetin, and quercetin nanoemulsion on oxaliplatin-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2014;387:837–48.
- Kratz JM, Teixeira MR, Koester LS, Simões CMO. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:531–7.
- Tavelin S, Gråsjö J, Taipalensuu J, Ocklind G, Artursson P. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods Mol Biol.* 2002;72:188–233.
- Rogério AP, Kanashiro A, Fontanari C, da Silva EV, Lucisano-Valim YM, Soares EG, *et al.* Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercetin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm Res.* 2007;56:402–8.
- Jeng-Shyan D, Chuan-Sung C, Shyh-Shyun H, Pei-Hsin S, Tsung-Hui L, Guan-Jhong H. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *J Ethnopharmacol.* 2011;137:1161–71.
- Gupta AK, Parasar D, Sagar A, Choudhary V, Chopra BS, Garg R, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and carrageenan induced paw edema in mice. *PLoS ONE.* 2015;14:1–16.
- Winter CA, Risely EA, Nuss GW. Carrageenan induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;111:544.
- Anandhi S *et al.* *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food Chem Toxicol.* 2010;48(1):187–92.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol.* 2003;63(4):447–63.
- OECD. Test N°. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2001.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008;585:325–37.
- Maalik A, Khan FA, Mumtaz A, Mehmood A, Azhar S, Atif M, *et al.* Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. *Trop J Pharm Res.* 2014;13:1561–6.
- Liu Y, Feng N. Nanocarriers for the delivery of active ingredients and fractions extracted from natural products used in traditional Chinese medicine (TCM). *Adv Colloid Interf Sci.* 2015;221:60–76.

34. Pralhad T, Rajendrakumar K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;34:333–9.
35. Yuan ZP, Chen LJ, Fan LY, Tang MH, Yang GL, Yang HS, *et al.* Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3193–9.
36. Ting Y, Jiang Y, Ho C-T, Huang Q. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *J Funct Foods.* 2014;7:112–28.
37. Lu W, Kelly AL, Miao S. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Sci Technol.* 2016;47:1–9.
38. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 1971;104(1):15–29.
39. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods - comparative-evaluation of mice and rats. *J Pharmacobiodyn.* 1981;4(8):565–75.
40. Gusdinari T, Kartasmita RE, Adnyana IK. Anti-inflammatory and antioxidant activity of Quercetin-3, 3', 4'-Triacetate. *J Pharmacol Toxicol.* 2011;6(2):182–8.
41. Chen-yu G, Chun-fen Y, Qi-lu L, Qi T, Yan-wei X, Wei-na L, *et al.* Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. *Int J Pharm.* 2012;430(1–2):292–8.
42. Gui SY, Wu L, Peng DY, Liu QY, Yin BP, Shen JZ. Preparation and evaluation of a microemulsion for oral delivery of berberine. *Die Pharm – Int J Pharm Sci.* 2008;63:516–9.
43. Yu A, Wang H, Wang J, Cao F, Gao Y, Cui J, *et al.* Formulation optimization and bioavailability after oral and nasal administration in rabbits of puerarin-loaded microemulsion. *J Pharm Sci.* 2011;100:933–41.
44. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin–phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm.* 2007;330:155–63.
45. Yoon S, Lee HJ, Choi SH, Chang E-J, Lee SY, Lee EJ. Quercetin inhibits IL-1b-Induced inflammation, hyaluronan production and adipogenesis in orbital fibroblasts from graves' orbitopathy. *PLoS ONE.* 2011;6(10):1–10.
46. Wan AY, Tang MH, Chen XC, Chen LJ, Wei YQ, Wang YS. Inhibitory effect of liposomal quercetin on acute hepatitis and hepatic fibrosis induced by concanavalin A. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(8):655–61.
47. Gardi C, Bauerova K, Stringa B, Kuncirova V, Slovak L, Ponist S, *et al.* Quercetin reduced inflammation and increased antioxidante defense in rat adjuvant arthritis. *Arch Biochem Biochem.* 2015;583:150–7.
48. Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharm Res.* 2003;48(6):601–6.
49. Martinez-flores SG, Sanchez-camps S, Gonzalez-gallego. Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in interlekin 1-β activated rat hepatocytes. *J Nutr.* 2005;135:1359–65.
50. Ghosh A, Mandal AK, Sarkar S, Panda S, Das N. Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. *Life Sci.* 2009;84:75–80.
51. Wang X, Jiang Y, Wang YW, Huang MT, Ho CT, Huang Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chem.* 2008;108:419–24.
52. Hatanaka J, Chikamori H, Sato H, Uchida S, Debari K, Onoue S, *et al.* Physicochemical and pharmacological characterization of α-tocopherol-loaded nano-emulsion system. *Int J Pharm.* 2010;396:188–93.
53. Penalva R, Esparza I, Larraneta E, González-Navarro CJ, Gamazo C, Irache JM. Zein-based nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol and its anti-inflammatory effects in a mouse model of endotocix shock. *J Agric Food Chem.* 2015;63(23):5603–11.
54. Larrosa M, Tomé-Carneiro J, Yáñez-Gascón MJ, Alcántara D, Selma D, Beltrán D, *et al.* Preventive oral treatment with resveratrol pro-prodrugs drastically reduce colon inflammation in rodents. *J Med Chem.* 2010;53:7365–76.
55. Wang Y, Ma Y, Zheng Y, Song J, Yang X, Bi C, *et al.* In vitro and in vivo anticancer activity of a novel puerarin nanosuspension against colon cancer, with high efficacy and low toxicity. *Int J Pharm.* 2013;441:728–35.
56. Fujimori S, Gudis K, Sakamoto C. A review of anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury: focus on prevention of small intestinal injury. *Pharmaceuticals.* 2010;3:1187–201.
57. Hong YJ, Mitchell AE. Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(11):1525–32.
58. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:2179–205.
59. Ruiz MJ, Fernandez M, Pico Y, Manes J, Asensi M, Carda C, *et al.* Dietary administration of high doses of Pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2009;57:3180–6.
60. Okamoto T. Safety of quercetin for clinical application. *Int J Mol Med.* 2005;16:275–8.