



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais



Luciana Custódio

Estudo do encapsulamento e da liberação de quercetina em sistemas lipídicos: efeitos de carga e rigidez

2022

Uberaba - MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais



Luciana Custodio

Estudo do encapsulamento e da liberação de quercetina em sistemas lipídicos: efeitos de carga e rigidez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Materiais Aplicados em Biociências.

Orientadora: Prof. Dra. Natália Bueno Leite Slade

Coorientador: Dr. Jéferson Aparecido Moreto

Uberaba

2022

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Custodio, Luciana

Estudo do encapsulamento e da liberação de quercetina em sistemas lipídicos: efeitos de carga e rigidez / Luciana Custodio. –2022.

77 f.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019. Área de concentração: Materiais Aplicados em Biociências.

Orientadora: Prof. Dra. Natália Bueno Leite Slade

Coorientador: Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto

LUCIANA CUSTÓDIO

Estudo do encapsulamento e da liberação de quercetina em sistemas lipídicos: efeitos de carga e rigidez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Materiais Aplicados em Biociências.

Uberaba, de junho de 2022

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Natália Bueno Leite Slade

Dedico este trabalho aos meus filhos Sabrina
Custódio Batista e Samuel Custódio Vieira.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram pra que esse trabalho fosse possível.

Agradeço aos meus pais, Donizeti Custódio e Conceição Aparecida Trevizan Custódio, que sempre me deram apoio, que nunca deixaram de acreditar no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditava. Meus pais nunca falaram não pra os meus sonhos, porque eles sempre sonharam comigo e contribuíram de todas as formas possíveis para que eu pudesse alcançar meus objetivos. O amor e carinho de vocês só me fez continuar e chegar onde estou.

Aos meus irmãos Leandro Custódio e Claudio Custódio que sempre deixaram claro todo carinho e admiração que sentem por mim, mas quem se orgulha e sente muito carinho de ter pessoas tão especiais por perto sou eu. Obrigada a todos os momentos de descontração, risadas e por todos os conselhos. Obrigada pelas conversas diárias pelo whatsapp no grupo família. Eu não os escolhi como irmãos, mas escolhi torna-los como meus amigos e isso será pra sempre.

Meu muito obrigada, de todo meu coração, a minha orientadora Prof.^a Dra. Natália Bueno Leite Slade que confiou no meu potencial como estudante e me deu um tópico de pesquisa maravilhoso, que me fez querer descobrir mais sobre esse universo da física e tecnologia dos bioativos e encapsulamento. Agraço por responder todas as minhas dúvidas, revisar meus textos, meus gráficos, enfim, por me ensinar a pesquisar e me fazer sentir uma pesquisadora/cientista. Também agradeço aos : Prof. Dr. José Fernando Condeles, Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior, Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça por fazerem parte da minha banca de qualificação e aos conselhos e sugestões dadas na pesquisa. Também agradeço ao co-orientador Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto.

Um agradecimento muito especial pra o Pós Doc. Leandro Antunes Mendess que acompanhou minha trajetória durante o mestrado. Um professor que além dos ensinamentos foi amigo, psicólogo e eu agradeço por ter sido tudo isso pra mim e continuar sendo. Obrigada pela disponibilidade nessa pesquisa, fico muito contente com isso.

Quero agradecer também ao nosso grupo de pesquisa que durante os vários encontros, mesmo de forma online, podemos compartilhar histórias e muito ensinamento.

Enfim um agradecimento aos meus filhos. A minha filha Sabrina Custódio Vieira que tem me ensinado muito a cada dia e que está sempre disposta a me escutar. A dedicação dela aos estudos de forma geral (escola, línguas, música, artes, animes) me ensina como é possível estudar e gostar de tantas áreas do conhecimento ao mesmo tempo e me faz lembrar todos os dias como é bom apreender algo novo. E também ao meu filho Samuel Custódio Vieira pela paciência e compreensão por aceitar dividir o meu tempo entre ele e a pesquisa, e com o passar dos dias entende e vem gostando cada vez mais de estudar.

Eu não sou o que eu era antes.

(Luciana Custodio)

RESUMO

A quercetina é um bioativo que apresenta uma ampla gama de aplicações, porém o seu uso para fins farmacológicos apresenta dificuldades relacionadas à sua baixa biodisponibilidade e solubilidade em meio aquoso, alta propensão à degradação pela luz, calor e oxigênio, bem como sua reduzida atividade biológica no trato gastrointestinal. Uma estratégia poderosa para potencializar sua atividade biológica é encapsulá-la em sistemas nano e microparticulados. As MLVs (vesículas multilameres) representam uma alternativa de baixo custo adequada para encapsular moléculas bioativas hidrofóbicas sendo usado com sucesso em várias áreas. Devido a versatilidade no preparo das MLVs e considerando a variedade de lipídios e esteróis encontrados na natureza, estudamos o efeito de diferentes composições lipídicas na preparação de MLVs para o encapsulamento e a liberação controlada da quercetina. Para tanto, foram considerados os efeitos de carga e rigidez no tamanho médio da formulação, na distribuição de tamanhos, nas propriedades de carga, além da eficiência de encapsulamento e liberação deste polifenol. Nossos resultados demonstraram que a rigidez imposta pelo colesterol aumentou a homogeneidade da distribuição de tamanho e a eficiência de encapsulamento permitindo uma taxa significativa de liberação de quercetina no sistema composto de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina / colesterol (80:20). A carga modulou o tamanho médio e a distribuição de tamanho, bem como resultou em alta eficiência de encapsulamento e liberação na formulação composta por (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina / 1-palmitoil-2-oleoil- sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (80:20). Os resultados apresentados neste trabalho são um ponto de partida no uso da composição lipídica como um agente modulador de parâmetros importantes no desenvolvimento de nano e microssistemas.

Palavras-chave: Quercetina, MLVs, Encapsulamento e Liberação Controlada de Quercetina.

ABSTRACT

Quercetin is a bioactive that has a wide range of applications, but its use for pharmacological purposes presents difficulties related to its low bioavailability and solubility in aqueous media, high propensity to degradation by light, heat and oxygen, as well as its reduced biological activity. in the gastrointestinal tract. A powerful strategy to enhance its biological activity is to encapsulate it in nanoparticulate and microparticulate systems. MLVs (multilamellar vesicles) represent a suitable low cost alternative to encapsulate hydrophobic bioactive molecules being successfully used in several areas. Due to the versatility in the preparation of MLVs and considering the variety of lipids and sterols found in nature, we investigated the effect of different lipid compositions in the manufacture of MLVs for encapsulation and controlled release of quercetin. In order to do so, the effects of load and stiffness on the average size of the formulation, size distribution, load properties and the encapsulation efficiency and release of this polyphenol were considered. Our results demonstrated that the rigidity imposed by Colesterol increased both the homogeneity of the size distribution and the encapsulation efficiency enabling a significant rate of quercetin release at the system with 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoColine/Colesterol (80:20). The charge modulated both the average size and size distribution as well as resulted in high encapsulation and release efficiencies in the formulation composed of (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoColine/1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (80:20). To the best of our knowledge, this is the first study concerning charge and rigidity effects on the encapsulation of quercetin in multilamellar vesicles, with great potential for technological application. Furthermore, the news presented in this work is a starting point on the use of lipid composition as a modulating agent of important parameters in the development of nano and micro systems.

Keywords: Quercetin, MLVs, Encapsulation and Controlled Release of Quercetin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação esquemática dos polifenóis.....	18
Figura 2 - Estrutura química da quercetina (3,5,7,3'-4' – pentahidroxiflavona)	18
Figura 3 - Aspectos morfológicos de diferentes tipos de nanopartículas	21
Figura 4 - Formação de vários tipos de lipossomas	24
Figura 5 - Estrutura molecular dos fosfolipídios (POPC e POPG)	31
Figura 6 - Preparação dos Lipossomas	33
Figura 7 - Tubo de ensaio com uma fina película de lipídio seco e quercetina.	34
Figura 8 - Tubos de ensaio contendo solução de MLVs+Que em Tampão Hepes.	34
Figura 9 - Espectrofotômetro UV/VIS modelo Shimadzu UV 2600 (Shimadzu Corp. Japão)	35
Figura 10 - Espectrofotômetro - leitor usado para medir a absorbância.	36
Figura 11 - Diagrama de Jablonskii	37
Figura 12 - a) Representação esquemática da configuração óptica de um sistema DLS. Por convenção, o ângulo de espalhamento θ é o ângulo entre o feixe incidente que sai da amostra e o detector. b) O detector analisa a intensidade pelo tempo. c) O coeficiente de.....	39
Figura 13 - Cubeta capilar descartável modelo DTS1070	41
Figura 14 - Potencial Zeta	42
Figura 15 - a) Centrífuga b) Sobrenadante e pellet obtido após centrifugação.	43
Figura 16 - a) Membrana de diálise contendo MLVs com quercetina e tampão. b) Membrana de diálise dentro do erlenmeyer com 30 ml de tampão	44
Figura 17 - a) Membrana de diálise contendo MLVs com quercetina e tampão dentro do erlenmeyer com 30 ml de tampão em um agitador magnético; b) Erlenmeyer mantido sob o abrigo da luz	45
Figura 18 - Curva de calibração obtida para o padrão de quercetina usando metanol como solvente, $\lambda = 372$ nm, a 25 ° C. (Os pontos representam a média de um triplicado e a linha contínua é obtida a partir do ajuste linear)	48
Figura 19 - Titulações espectrofotométricas de quercetina (21,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sob concentrações crescentes de lipídios (0 - 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$). a) Mudanças espectrais de quercetina representativas em função da adição de solução lipídica para POPC/Col/POPG (60:20:20) b) Segundas derivadas do conjunto de espectros mostrado em a) para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima. c) Determinação dos valores de K_P na presença de POPC/Col/POPG	

(60:20:20) LUVs em pH 7,4. A linha contínua foi obtida usando o ajuste não linear mostrado na equação 1 .Os experimentos foram realizados a 25 °C	49
Figura 20 - Representação esquemática da homogeneidade das composições lipídicas.....	53
Figura 21 - a) Potencial zeta médio das composições lipídicas testadas contendo quercetina encapsulada.....	55
Figura 22 - Eficiência média de encapsulação (% EE) das composições lipídicas testadas contendo quercetina encapsulada.	57
Figura 23 - Ensaios de liberação controlada obtidos em λ_{max} de 378 nm para a quercetina nas diferentes composições lipídicas testadas.....	58
Figura 24 - Modelos de Korsmeyer-Peppas aplicados à liberação cinética da quercetina.....	61
Figura 25 - Modelos de Ordem Zero aplicados à liberação cinética da quercetina	62
Figura 26 - Modelos de Primeira Ordem aplicados à liberação cinética de quercetinas.....	63
Figura 27 - Modelos de Ordem Zero aplicados à liberação cinética da quercetina	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de quercetina presente em alimentos	19
Tabela 2 - Diferentes tipos de Nanoencapsulante.....	22
Tabela 3 - Exemplos de sistemas vesiculares baseados em lipídios.....	22
Tabela 4 - Benefícios do encapsulamento de drogas em lipossomas	26
Tabela 5 - Valores do coeficiente de partição para cada composição lipídica	51
Tabela 6 - Diâmetro médio das diferentes composições de lipídios contendo quercetina encapsulada. (Média e SE, n = 9, valores de p <0,05 foram considerados significativos)	52
Tabela 7 - Valores de Pdl das diferentes composições de lipídios contendo quercetina encapsulada. (Média e SE, n = 9, valores de p <0,05 foram considerados significativos)	54
Tabela 8 - Parâmetros obtidos por meio de ajustes lineares para cada modelo matemático Onde, R ² é o coeficiente de correlação de cada modelo matemático; n é o expoente difusional ou expoente de liberação do fármaco; K _{kp} é a constante de taxa de liberação de K _o é a constante de taxa de ordem zero; C ₀ é a concentração inicial do fármaco no tempo t=0; K ₁ é a equação da taxa de primeira ordem expressa no tempo ⁻¹ ou por hora.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

Col - Colesterol

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

POPC - 1-palmitoil- 2- oleoil-*sn*- glicero-3- fosfocolina

POPG - 1-palmitoil- 2- oleoil-*sn*- glicero-3- fosfatidilglicerol

Que – Quercetina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 QUERCETINA	17
1.2 NANO ENCAPSULAMENTO	20
1.3 LIPOSSOMAS	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAIS	31
4.2 SOLUÇÃO DE QUERCETINA	32
4.3 SOLUÇÕES TAMPÃO	32
4.4.1 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DA QUERCETINA EM TAMPÃO COM POLISORBATO 80 (TWEEN 80)	32
4.5 LIPOSSOMAS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_p)	32
4.6 PREPARO DAS FORMULAÇÕES (MLVs + QUE)	33
4.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA EM METANOL	35
4.8 TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_p)	38
4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPÍDICAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA	39
4.10 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA EM MLVS.	43
4.11 ENSAIO DE PERFIL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA IN VITRO	44
4.12 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO POR MODELAGEM MATEMÁTICA	45
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA EM METANOL	47
5.2 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_p)	48
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPÍDICAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA	51

5.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA EM MLVS.	57
5.5 ENSAIO DE PERFIL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA IN VITRO.....	58
4.8 APLICAÇÃO DE DADOS DE LIBERAÇÃO DE QUERCETINA NOS MODELOS MATEMÁTICOS	59
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS	67

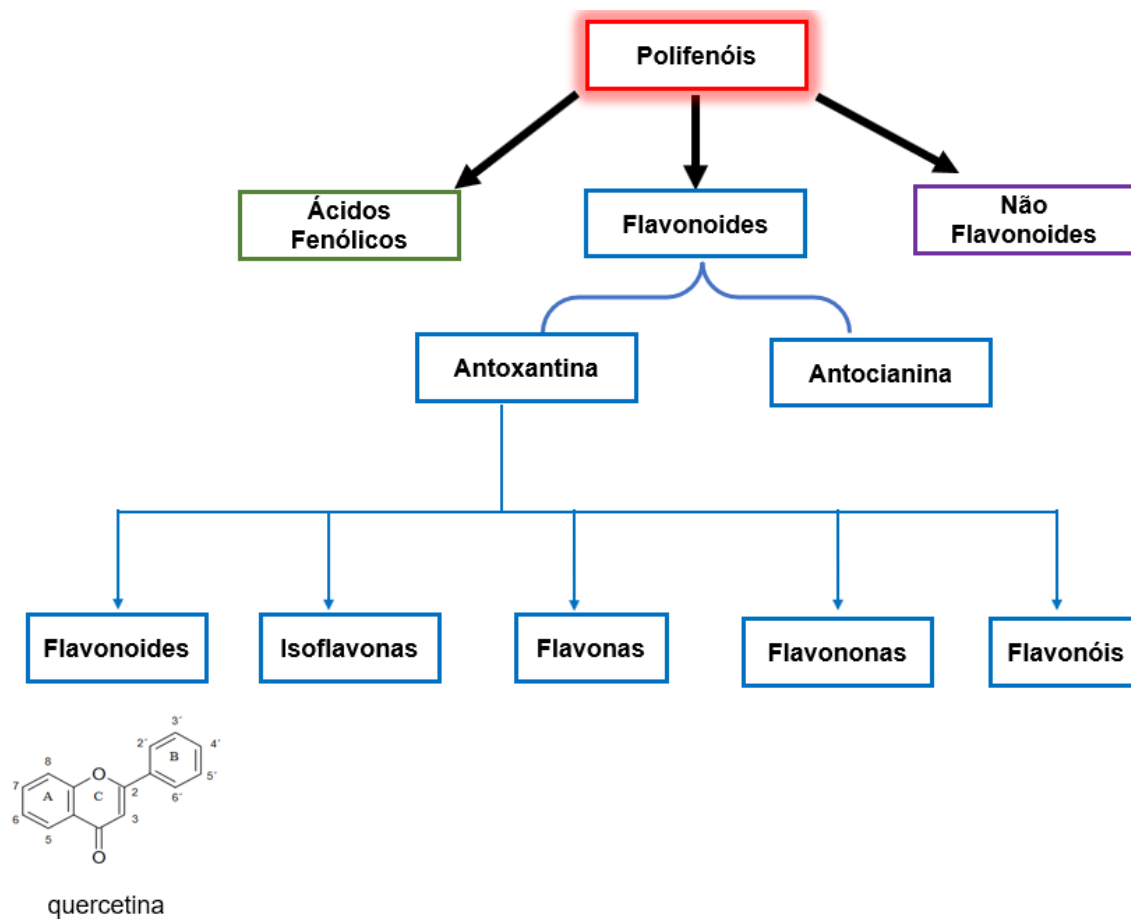
1 INTRODUÇÃO

Nessa seção teceremos os conceitos fundamentais que compõem esse estudo. Primeiramente, será apresentado o bioativo quercetina (Que) - suas atividades biológicas e limitações. Em seguida, serão introduzidos os conceitos do nanoencapsulamento (NE), mostrando as vantagens e desvantagens dos diversos tipos de nanoencapsulantes, com foco nos sistemas baseados em lipídios. Dentro dos sistemas lipídicos, apresentamos as vesículas multilamelares (MLVs) e como o presente trabalho pode contribuir para aperfeiçoá-las.

1.1 QUERCETINA

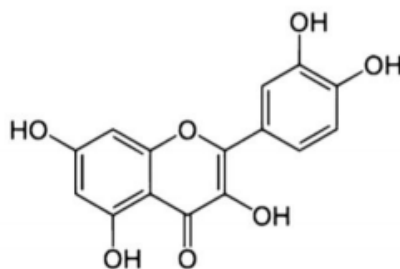
Os polifenóis podem ser quimicamente distinguidos em três classes principais: ácidos fenólicos, flavonoides e não flavonoides (FIGURA 1). Os flavonoides compõem um grupo de 5000 compostos, que são amplamente estudados (FALLER e FIALHO, 2009). Eles apresentam 2 (duas) unidades de benzeno e um anel de pireno contendo oxigênio que conecta os dois anéis de benzeno. Dentre estes compostos, está a quercetina (Que), o flavonoide mais abundante na dieta humana cuja estrutura química é exibida na figura 2. O seu nome atribuído pela IUPAC é 2-(3,4-dihidroxifenil) -3,5,7-trihidroxi-4H-cromeno 4-ona. Apresenta-se na forma de um pó alaranjado, com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e massa molecular de $320,24 \text{ g mol}^{-1}$. É uma molécula que apresenta um comportamento anfifílico pois possui uma porção hidrofóbica, formada por anéis fenólicos, e uma porção polar composta de um grupo hidroxil. Possui solubilidade de aproximadamente $0,001 \text{ mg/mL}$ (25°C), é degradada em pH básico fraco 8, enquanto em pH 5, quase 75% da quercetina permanece em solução. Ao atingir o intestino delgado, devido a sua porção hidrofóbica, pode ser absorvida pelas células epiteliais atravessando as membranas celulares (bicamadas fosfolipídicas) por uma via de difusão simples. Em torno de 53% a 60 % da quercetina ingerida é absorvida pelo organismo. (PINHEIRO et al., 2021).

Figura 1 - Classificação esquemática dos polifenóis



Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 2 - Estrutura química da quercetina (3,5,7,3'-4' – pentahidroxiflavona)



Fonte: BEHLING et al., 2004

A quercetina foi identificada em 1936 por Szent-Gyorgyi (FORMICA e REGELSON, 1995), estando presente em legumes, frutas, chás, vinho, chocolates, folhas verdes e Ginkgo biloba L., Ruta graveolens L. arruda (AMIN e BANO, 2018; KUSACZUK et al., 2022) e muitas espécies de plantas (ALIZAEH e ALIEBRAHIMZADEH, 2022). O teor da Quercetina nos alimentos é apresentado na tabela 1 e foi descrito pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos através de medidas de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (USDA, 2018). Esses dados compreendem tanto quantidades naturais quanto aquelas atribuídas pelo melhoramento genético dos alimentos (SOUZA et al., 2013). Também é encontrada comercialmente na forma de suplementos dietéticos especialmente na forma de cápsulas ou comprimidos e em muitas formulações cosméticas (PINHEIRO et al., 2021).

Tabela 1 - Teor de quercetina presente em alimentos

Fonte de Alimento	Quantidade de Quercetina (mg/100g)
Maçã com casca	3,80
Cebolas cruas	20,30
Espinafre cru	3,97
Vinho tinto	062
Alcaparras em conserva	172,55
Alcaparras cruas	233,84
Acerola	4,74

Fonte: USDA, 2018

Estudos mostram que a Quercetina possui múltiplas atividades biológicas: atividade anti-hipertensiva, antiarrítmica, propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, anti-hepatotóxica, ação antitumoral, antioxidante (eliminação de radicais livres), anti-inflamatória, neuroprotetoras (PINHEIRO et al., 2021), antidiabética, antimicrobiana, antiviral, melhora nas doenças degenerativas, cardiovasculares (AMIN e BANO, 2018), anti-alzheimer, antifúngico, antiobesidade, antidiabético e atividades antiparkinsonianas (ALIZADEH e ALIEBRAHIMZADEH, 2022). Tem potencial terapêutico para mitigar vários tipos de toxicidade, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e hepatotoxicidade (WASEEM et al., 2022). Também tem sido potencialmente usada para a prevenção e tratamento de SARS-CoV-2, pois inibe a replicação do rinovírus in vitro e in vivo (TALARICO et al.,

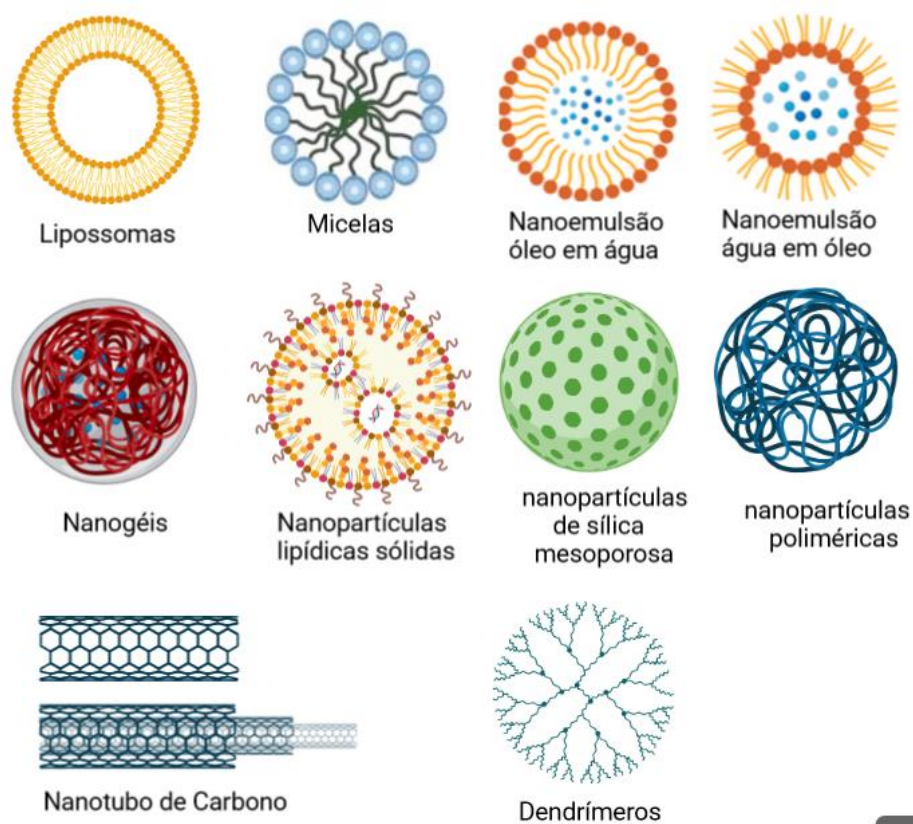
2021). Apesar de tantas atividades biológicas, a sua eficácia terapêutica é comprometida devido as suas baixas: solubilidade e hidrofiliicidade; alta propensão à degradação pela luz, calor e oxigênio; bem como sua reduzida atividade biológica no trato gastrointestinal (KALBASSI et al., 2021). Neste contexto, a possibilidade de encapsular a quercetina em nano e microestruturas tem se mostrado uma alternativa para superar essas dificuldades e melhorar o seu desempenho da quercetina como fármaco.

A literatura apresenta diversos estudos que utilizam a estratégia do encapsulamento da Que (KALBASSI et al., 2021; OGUZ et al., 2021; KHURSHEED et al., 2021; MORANTE-ZARCERO et al., 2021; SHAJI e IYER, 2012; PRIPREM et al., 2008; LIU et al., 2013; YUAN et al., 2006; LONG et al., 2013; GONIOTAKI et al., 2004; CADDEO et al., 2019; KUMARI et al., 2010; KHOEE e RAH,ATOLAHZADEH, 2012; EL-GOGARY et al., 2017; BISHAYEE et al., 2015; SUKSIRIWORAPONG et al., 2016; SUNOQROT AND ABUJAMOUS, 2019; DE OLIVEIRA et al., 2018). Destes, é possível notar a variedade de materiais que podem ser utilizadas como agente encapsulante e incluem desde polímeros sintéticos e naturais a misturas lipídicas. De modo geral, o encapsulamento da Que possibilita um direcionamento eficiente ao alvo de ação, o desvio das barreiras estomacais e, conseqüentemente, o aumento de seu índice terapêutico e a minimização seus possíveis efeitos colaterais. Neste sentido, a estratégia de encapsular a quercetina tem promovido melhorias em suas propriedades físico-químicas, que contribuem diretamente para aplicações com fins terapêuticos.

1.2 NANO ENCAPSULAMENTO

O nano encapsulamento aperfeiçoa a biodisponibilidade, a farmacocinética e a biodistribuição de fármacos e bioativos protegendo-os de diversas enzimas degradativas e viabilizando o aprimoramento funcional do produto final (FALSAFI et al., 2022). Sendo economicamente viável e funcionalmente eficaz a nanotecnologia dos encapsulantes tem resultado na elaboração de diversos estudos que apresentam uma variedade de materiais, metodologias e sistemas encapsulantes/encapsulado. A Figura 03 apresenta os aspectos morfológicos de diferentes tipos de nanopartículas onde é possível verificar as principais características e a tabela 2 exibe uma parcela de estudos apresentando o tipo da estrutura utilizada, o material do agente encapsulante, a via de administração, as vantagens e desvantagens associadas aos sistemas.

Figura 3 - Aspectos morfológicos de diferentes tipos de nanopartículas



Fonte: Elaborado pelo Autor com BioRender.com

Tabela 2 - Diferentes tipos de Nanoencapsulante

Tipo	Material	Tipo de Aplicação	Vantagem	Desvantagem	Referências
Cristais Líquidos			Baixo custo e preparação simples	Método para produção em larga escala precisa ser explorado	BERBEL et al.; RAJABALAYA et al.
Dendrímeros	Poliamidoamina, polipropileno dendrímeros de imina, quirál, peptídeo e poliéster	Dendrímeros	biocompatíveis para entrega de drogas em nanoescala e facilitam o transporte através de membranas biológicas		DE LIMA E MORTARI, 2022
metal-orgânicas			Exibe uma área de superfície excepcionalmente alta, com poros grandes	Devido ao tamanho não podem ser usados em vasos sanguíneos	BERBEL et al., 2017
Materiais Mesoporosos	Componentes inorgânicos (sílica) ou componentes orgânicos e inorgânicos		Versatilidade dos		BERBEL et al., 2017 COSTA et al., 2021
Micelas	fosfolipídios e polímero	Administração parenteral	Arquitetura nanoscópica exclusiva, tamanho pequeno, estabilidade e capacidade de adaptação para compatibilidade com drogas diferentes	Fase oleosa contínua ruim para a administração direcionada de medicamentos	BERBEL et al., 2017; NAQVI e FLORA, 2020
Nanoemulsões, emulsões duplas e emulsões Pickering	óleos comestíveis, agentes tensoativos (surfactantes) e água		Aprisionam bioativos diversos (hidrófilos e hidrófobos)		NAQVI e FLORA, 2020; FALSAFI et al., 2022, LINA e MORTARI, 2022

Nanogéis	Redes poliméricas hidrofílicas reticulada	Injetados no espaço intratecal	Tamanho ajustável de nanômetros a micrômetros,		GRIMAUDO et al., 2019
Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)	Lipídios sólidos	Intravascular	Alta eficiência de encapsulamento, estabilidade, incorporação de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas	Difícil caracterização devido ao pequeno tamanho	BERBEL et al., 2017; DELGADO, 2013
Nanopartícula de Sílica mesoporosa	Sílica		Alta área superficial, estrutura estável e morfologia modificável		BERBEL et al., 2017
Nanopartícula polimérica	Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis	Intravenosa	Capacidade de encapsular diferentes tipos de substâncias / Proteção da substância ativa	Citotoxicidade de alguns polímeros	VIEIRA e GAMARRA, 2016; MOREIRA, 2015
Nanotubos	carbono		Estabilidade química, facilidade de modificação, alta solubilidade em água, fluorescência ajustável com alto rendimento quântico, boa biocompatibilidade e baixa toxicidade		LINA e MORTARI, 2022; BAYDA et al., 2021
Sistemas baseados em lipídios	Lipídios		Baixa citotoxicidade / Biocompatibilidade / Encapsulação de da substância ativa hidrofílicas e hidrofóbicas/ Não imunogénicos	Estabilidade	APOLINÁRIO, 2017.

Dentre os sistemas de liberação de fármacos, os lipossomas, descobertos há mais de 50 anos, são os mais versáteis, em termos de composição, forma, tamanho, morfologia, e constituem nanocarreadores amplamente estudados, pois, permitem encapsular drogas com solubilidade diversificada, drogas hidrofílicas e lipofílicas colaborando com a estabilidade, especificidade do local e biodisponibilidade do bioativo (ELOY et al., 2014; DARAEE et al., 2014). Estes sistemas são classificados de acordo com a composição da membrana lipídica, podendo incluir desde polímeros naturais ou sintéticos a surfactantes. A Tabela 3 exibe alguns exemplares desses sistemas e detalha as respectivas composições.

Tabela 3 - Exemplos de sistemas vesiculares baseados em lipídios

Nanocarregadores	Composição
Arqueossomos	Glicolipídios de lactosil arqueol sulfatado (SLA), lipídio polar de bactérias Archaea
Aspassomas	Palmitato de ascorbila, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC)
Bilossomas	Tensoativos não iônicos (Tween e Span) e sais biliares
Carboidossomos	Lipídios à base de carboidratos (metil-2,3-di-o-lauroil-b-D-ribose-5 fosfocolina), ácido dilauoil fosfatídico, bis-(2,3-lauroil)-1-metoxi- 5-(fosfo)-ribose
Quitossomas	Fosfolipídios e quitosana
Criptossomas	Fosfolipídio e PEG
Enzimossomas	Fosfolipídios conjugados com enzimas
Eritrossomos	Bicamada lipídica revestida no citoesqueleto de eritrócitos humanos, gema de ovo fosfatidilcolina extraída
Escheriossomas	Fosfolipídios de Escherichia coli
Genossomos	Fosfolipídios conjugados com genes, lipoplexos, lipídios glicosilfosfatidilinositol
Gliceossomos	Fosfolipídio e glicerol, dipalmitoilglicerofosfatidilcolina, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3- fosfatidicolina (DMPC)
Leptossomas	Fosfolipídios de Leptospira biflexa e Leptospira não patogênica biflexa sorovar potac

Esfingossomas	Esfingolipídios, ovo-esfingomielina
Subtilossomos	Fosfolipídios isolados de <i>Bacillus subtilis</i>
Ufassomas	Ácidos graxos saturados e insaturados
Vesossomos (vesículas em vesículas)	Fosfolipídios e colesterol
Virossomos	Fosfolipídios e proteínas do envelope viral
Marinossoma	Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), fosfolipídios de origem marinha
Hialurossomos	Fosfolipídios e hialuronano
Invasomes	Fosfolipídios, terpenos e etanol
Cubossomos	Bicamada lipídica bicontínua (por exemplo, monooleato de glicerila) e interpenetrante nanocanais aquosos independentes
Etossomas	Fosfolipídios e etanol
Lipossomas	Fosfolipídios e colesterol
Niossomas	Surfactantes não iônicos, colesterol e moléculas, como álcoois graxos
Novasomes	Monoésteres de ácidos graxos de polioxietileno, colesterol e ácidos graxos livres
Farmacossomas	Compostos anfifílicos de drogas esterificadas com um lipídio
Fotossomas	Lipídios sensíveis à luz

Fonte: Adaptado de GAUTAM et al., 2022

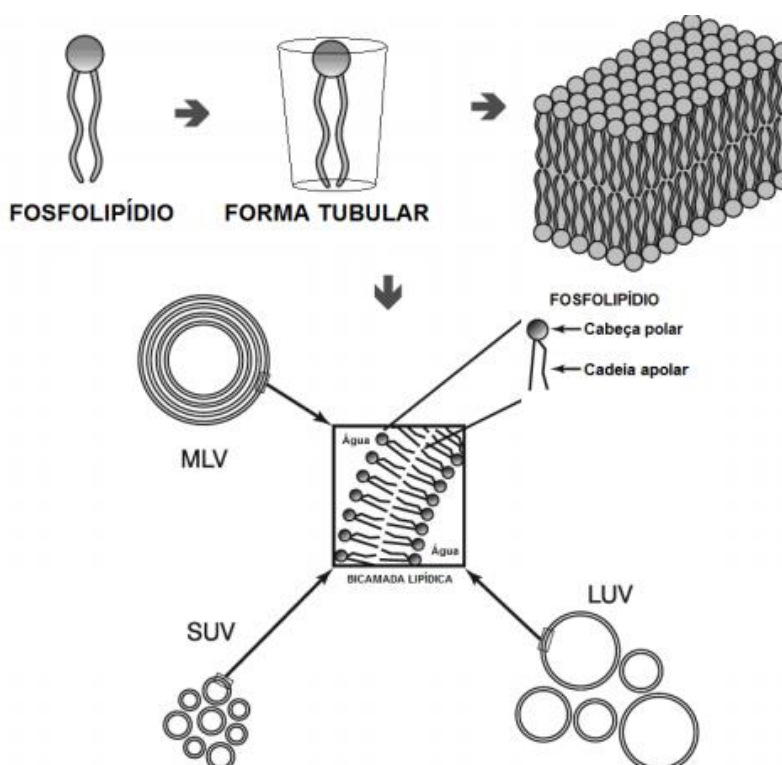
O uso de lipossomas como nano carregadores é especialmente atraente, pois apresentam baixa toxicidade e significativa similaridade com várias estruturas celulares. Como consequência, tanto a sua internalização nas células quanto o transporte de drogas através das membranas são facilitados (BERBEL et al., 2017).

1.3 LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez em 1965 por Alec Bangham e colaboradores. São formados por fosfolipídios que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas tipo concha esférica. Em meio aquoso minimizam o contato das cadeias apolares com as moléculas de água através da formação de agregados (FIGURA 4). Essa agregação depende tanto das características das espécies envolvidas quanto das condições do meio onde as mesmas estão dissolvidas.

Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas que exibem uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica, apresentam variações na carga elétrica líquida nas cabeças, na quantidade de insaturação das caudas e na geometria molecular (dadas as proporções volumétricas entre cabeça e caudas) (VAN et al., 2008 e EPAND, 1998). São compostos básicos presentes nas nossas membranas celulares e podem então imitar membranas biológicas. (LEBÈGUE et al., 2018).

Figura 4 - Formação de vários tipos de lipossomas



Podem ser classificados em três categorias, dependendo do tamanho e número de bicamadas: pequenas unilamelares (do inglês *Large Unilamellar vesicles* - LUV), grandes unilamelares (do inglês *Giant Unilamellar vesicles* - GUV) e multilamelares (do inglês *Multilamellar vesicles* - MLVs). Também podem ser classificados de acordo com a sua carga superficial: não carregado (zwitteriônico), catiônico ou aniônico. A formação destas estruturas é dita reversíveis, pois a coesão dos lipídios ocorre por interações não covalentes, como forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio (NAQVI e FLORA, 2020). As vesículas unilamelares possuem uma única esfera de bicamada de lipídio (sintético ou naturais) que concentra a solução aquosa em um núcleo aquoso. As vesículas multilamelares apresentam estruturas similares à de uma cebola, composta de esferas concêntricas separadas por camadas de água. A separação da bicamada em MLVs é determinada por um equilíbrio entre as forças atrativas de van der Waals e a repulsão devido às forças eletrostáticas e de hidratação (HOPE et al., 1986; XING e ZHAO, 2018).

Os lipossomas carregados de drogas são a nanomedicina mais bem-sucedida até hoje, com vários sistemas aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para uma variedade de doenças (BANDARA et al 2019; APOLINÁRIO, 2017). Em 2002 foi chamado de “Bala Mágica” ou do inglês “*Magic Bullet*” (SANTOS, 2002). “Lipossoma” do grego: “lipo” constituição lipídica e “soma” repete a sua estrutura (REZAEI-SADABADY et al., 2016; FRÉZARD et al., 2005). Em 1995, foi aprovado pela FDA a primeira formulação lipossomal, Doxil®. Atualmente, estima-se que pelo menos 14 novos sistemas de lipossomos foram aprovados pela FDA e cerca de 21 encontram-se em ensaios clínicos (PAST, 2015 apud APOLINÁRIO, 2017). Até dezembro de 2016, 12.975 nano carregadores desta categoria foram patenteados em todo mundo, de acordo como EPO (*European Patents Office*) e 276 pelo INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). O interesse dos lipossomas está relacionado à sua capacidade de conter moléculas hidrofílicas em seus fase aquosa e moléculas lipofílicas em suas bicamadas lipídicas, além disso apresentam uma boa afinidade celular e biodegradabilidade. São usados com sucesso na fabricação de vacinas, a citar a vacina da Pfizer desenvolvida para o novo coronavírus – Covid-19, na entrega de componentes vitaminas (vitamina C, E, óleo de peixe), no direcionamento e no aumento de agentes antibacterianos e, ainda, em aplicações de cosméticos (SCHWENDENER, 2014; JASH et al., 2021; OMOLO et al., 2021; HUH et al., 2010). O encapsulamento em MLVs representa uma alternativa de baixo custo, porém, existem dificuldades em lidar com este sistema no controle da taxa de encapsulamento, na estabilidade da membrana e na sua degradação (APOLINÁRIO et al., 2017).

Na tabela 4 são apresentadas algumas drogas encapsuladas em lipossomos e os benefícios desencadeados por esses encapsulamentos.

Tabela 4 - Benefícios do encapsulamento de drogas em lipossomas

Benefícios	Exemplos de drogas encapsuladas
Melhor solubilidade de drogas lipofílicas e anfifílicas	Anfotericina B, porfirinas, minoxidil, alguns peptídeos e antraciclinas, respectivamente; drogas hidrofílicas, como o agente anticâncer doxorrubicina ou aciclovir
Direcionamento passivo para as células do sistema imunológico, especialmente células do sistema fagocítico mononuclear	Antimoniais, anfotericina B, porfirinas, vacinas, imunomoduladores
Sistema de liberação sustentada de lipossomas administrados sistemicamente ou localmente	Doxorrubicina, citosina arabinosídeo, cortisonas, proteínas biológicas ou peptídeos, como vasopressina
Mecanismo de prevenção do local	Doxorrubicina e Anfotericina B
Segmentação específica do site	Medicamentos anti-inflamatórios, anticâncer, anti infecciosos
Melhor transferência de moléculas hidrofílicas carregadas	Antibióticos, quelantes, plasmídeos e genes
Melhor penetração nos tecidos	Corticosteróides, anestésicos e insulina

Fonte: AKBARZADEH et al., 2013

Estes sistemas já foram utilizados para encapsular a quercetina, resultando em uma liberação prolongada do polifenol e significativa melhora de sua solubilidade e biodisponibilidade (PRIPREM et al., 2008). Um exemplo a citar sobre a eficácia do uso de Que encapsulada em sistemas de interesse está relacionado ao principal tratamento em terapia clínica oncológica, Yuan et al. (2006) encapsularam a quercetina em lipossomas de polietilenoglicol 4000 e analisaram a atividade antitumoral em camundongos imunocompetentes (Camundongos C57BL/6N portadores de câncer de pulmão LL/2 Lewis e em camundongos BALB/c portadores de nocardinoma de cólon CT26 e hepatoma H22) e concluíram que a quercetina lipossomal peguilada pode melhorar significativamente a solubilidade e biodisponibilidade da quercetina e pode ser uma aplicação potencial no tratamento de tumor. Outro exemplo de encapsulamento de Que é dado pelos autores Caddeo et al. (2019) que analisaram o efeito antioxidante de lipossoma com quercetina e sem quercetina e verificaram que a formulação lipossomal contendo quercetina teve uma atividade antioxidante de 90,6%. Já Liu et al. (2013) analisaram o efeito da quercetina livre e lipossomal (fostatilcolina + colesterol + surfactante) contra irradiação UVB in vitro demonstrando que o encapsulamento aumentou o efeito protetor em comparação a quercetina livre, e a presença dos surfactantes (Tween 80, Span20 e colato de

sódio) aumentou a eficiência de encapsulamento da quercetina. De forma geral, os pesquisadores encapsulam a quercetina e analisam sua eficiência contra doenças ou membranas modelo comparando entre as eficiências da sua forma livre e encapsulada.

Deste panorama, nota-se que há um desconhecimento quanto ao efeito de diferentes misturas lipídicas na formulação de sistemas de encapsulamento para liberação controlada. Considerando a diversidade de lipídios presentes em nossas estruturas celulares, existe uma variedade de composições lipídicas que podem ser utilizadas. Consequentemente, cada lipídio apresenta propriedades estruturais e físico-químicas que podem influenciar as propriedades estruturais, biofísicas, de encapsulamento e de liberação destes sistemas. Baseando-se apenas na constituição da membrana plasmática das células eucarióticas, podemos encontrar três classes diferentes de lipídios: glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróis. Os glicerofosfolipídios compreendendo a fosfatidilcolina, a fosfatidiletolamina, a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol, o ácido fosfatidilinositol e o ácido fosfatidilinositol. Os esfingolipídios incluem majoritariamente as ceramidas, a esfingomielina e os gangliósidos, e o colesterol sendo o único esterol nas membranas das células de mamíferos (LUCHINI E VITIELLO, 2021). Estes elementos podem apresentar diversas geometrias, variedade de carga elétrica líquida nas cabeças polares e no número de insaturações nas caudas hidrocarbonadas. Isso impacta diretamente nas propriedades biofísicas das bicamadas lipídicas como carga superficial, fluidez e propriedades morfológicas. De modo particular, o colesterol pode promover o enrijecimento das bicamadas lipídicas, diminuindo os volumes moleculares livres e aumentando a ordem das cadeias lipídicas (JOVANOVIĆ et al., 2018; HENRIKSEN et al., 2004; ARRIAGA et al., 2009; ALVARES et al., 2021). No entanto, pouco se sabe sobre qual é o papel da composição lipídica no processo de encapsulamento e liberação de compostos bioativos por sistemas lipídicos. Nesse sentido, esse trabalho propõe contribuir para o preenchimento dessa lacuna ao explorar a influência da variação da composição lipídica no encapsulamento da quercetina por lipossomas do tipo MLVs. Para tanto, distintas propriedades de carga e de rigidez foram incluídas nas formulações através da presença de lipídios zwitteriônicos e/ou aniônicos, e/ou o colesterol em distintas frações molares. O efeito dessas variações foi avaliado através do acompanhamento de parâmetros como o tamanho médio da formulação, a homogeneidade da distribuição de tamanho, as propriedades de carga elétrica superficial, bem como as eficiências de encapsulamento e liberação do polifenol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Revelar os efeitos de carga e de rigidez para o encapsulamento e a liberação de quercetina em MLVs de distintas composições lipídicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o coeficiente de partição (K_p) da quercetina por distintas composições lipídicas;
- b) Realizar o encapsulamento da quercetina em vesículas multilamelares (MLVs) de distintas composições lipídicas;
- c) Caracterizar as formulações lipídicas via medidas de potencial eletrocinético (potencial zeta) e espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- d) Avaliar a eficiência de encapsulamento da quercetina via espectroscopia no UV-Vis;
- e) Realizar a cinética de liberação do bioativo *in vitro*;
- f) Analisar a cinética de liberação da quercetina utilizando os modelos matemáticos;
- g) Comparar os efeitos das composições lipídicas nas eficiências de encapsulamento e liberação da quercetina.

3 JUSTIFICATIVA

A quercetina é um bioativo que apresenta uma ampla gama de atividades biológicas tais como: antioxidante, antiinflamatória, antiviral, quimioprevenção do câncer e proteção cardiovascular (GORBENKO et al., 2021; ZHOU et al., 2017; ZHAO et al., 2017; YUAN et al., 2006; LONG et al., 2013; WONG E CHIU et al., 2011). Apesar disso, seu uso para fins farmacológicos apresenta dificuldades relacionadas à sua baixa biodisponibilidade e solubilidade em meio aquoso, alta propensão à degradação pela luz, calor e oxigênio, bem como sua reduzida atividade biológica no trato gastrointestinal (KALBASSI et al., 2021). Buscando superar esses problemas e melhorar o desempenho da quercetina como medicamento, muitos esforços têm sido feitos para encapsulá-la em nano e microestruturas como via de entrega aos sistemas de interesse.

Os lipossomas (constituídos de lípidos) são especialmente atraentes para nano carreadores pois apresentam baixa toxicidade e mostram similaridade significativa com várias estruturas celulares, favorecendo sua internalização nas células e o transporte de drogas através das membranas (BERBEL et al., 2017). O encapsulamento em MLVs representa uma alternativa de baixo custo adequada para encapsular moléculas bioativas hidrofóbicas. É usado com sucesso em várias áreas, como na fabricação de vacinas, na entrega de componentes bioativos (vitamina C, E, óleo de peixe), no direcionamento e no aumento de agentes antibacterianos e, ainda, em aplicações de cosméticos (SCHWENDENER et al., 2014; Jash and RIZVI, 2021; OMOLO et al., 2021; HUH et al., 2010). No entanto, existem dificuldades em lidar com este sistema no que diz respeito ao controle da taxa de encapsulamento, a estabilidade da membrana e a sua degradação (SCHWENDENER et al., 2014; JASH and RIZVI, 2021; OMOLO et al., 2021; HUH et al., 2010; APOLINÁRIO et al., 2017).

Dada a versatilidade no preparo das MLVs é interessante considerar a variedade de lipídios e esteróis encontrados na natureza. Especialmente, ao ponderar o impacto da variação da composição lipídica nas propriedades biofísicas das bicamadas. Os lipídios aniônicos e catiônicos modulam a carga superficial das estruturas proporcionalmente a sua concentração. A variação do teor de colesterol pode promover o enrijecimento e ordenamento das bicamadas (VAN MEER G and FEIGENSON, 2008; EPAND, 1998; JOVANOVIĆ et al., 2018; HENRIKSEN et al., 2004; ARRIAGA et al., 2009; ALVARES et al., 2021). No entanto, a literatura é escassa quanto ao efeito de diferentes misturas lipídicas na formulação de sistemas de liberação controlada. Nesse sentido, este trabalho visa preencher essa lacuna ao analisar a influência da composição lipídica no encapsulamento da quercetina por MLVs, considerando

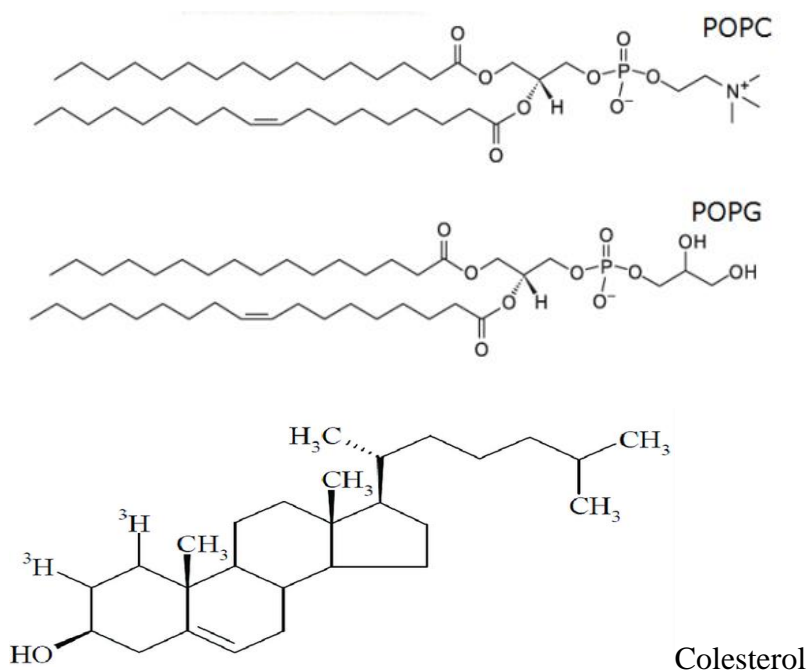
os efeitos de carga e rigidez no tamanho médio da formulação, na homogeneidade da distribuição de tamanho, propriedades de carga elétrica superficial, bem como essas alterações influenciam nas eficiências de encapsulamento e de liberação deste bioativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foram utilizados no presente trabalho o esterol colesterol e os seguintes fosfolipídios: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina - (POPC) com uma cabeça polar zwitteriônica (em pH 7,4) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol - (POPG) tendo um aniônico (a pH 7,4), ambos obtidos da Avanti Polar Lipids®, (FIGURA 5), o bioativo quercetina, os reagentes HEPES, NaF (Sigma – Aldrich) e o solvente orgânico clorofórmio obtidos de fornecedores de qualidade certificada e de grau analítico.

Figura 5 - Estrutura molecular dos fosfolipídios (POPC e POPG)



Para explorar os efeitos de carga e rigidez no encapsulamento da quercetina por MLVs, foram utilizadas as seguintes misturas lipídicas:

- POPC (100%);
- POPC/Col (80:20);
- POPC/POPG (80:20);
- POPC/Col/POPG (60:20:20).

4.2 SOLUÇÃO DE QUERCETINA

Para os ensaios de determinação do coeficiente de partição (k_p) com LUVs foi preparada a solução de quercetina diluindo 2 mg de Que em 1,5 mL de 0,6% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO), devido à baixa solubilidade da quercetina em solventes aquosos. Para o preparo das MLVs, foi preparada uma solução de quercetina a 1 mM (10^{-3} mol/L) em clorofórmio.

4.3 SOLUÇÕES TAMPÃO

A solução tampão utilizada ao longo de todo trabalho é composta de HEPES a 20 mmol L^{-1} e NaF a 150 mmol L^{-1} , pH 7,4. Para os ensaios de liberação controlada, o meio receptor foi preparado de tampão HEPES a 20 mmol L^{-1} e NaF a 150 mmol L^{-1} e adicionado 0,5 % (v/v) de Tween 80, pH 7,4.

4.4.1 ESTUDO DA SOLUBILIDADE DA QUERCETINA EM TAMPÃO COM POLISORBATO 80 (TWEEN 80)

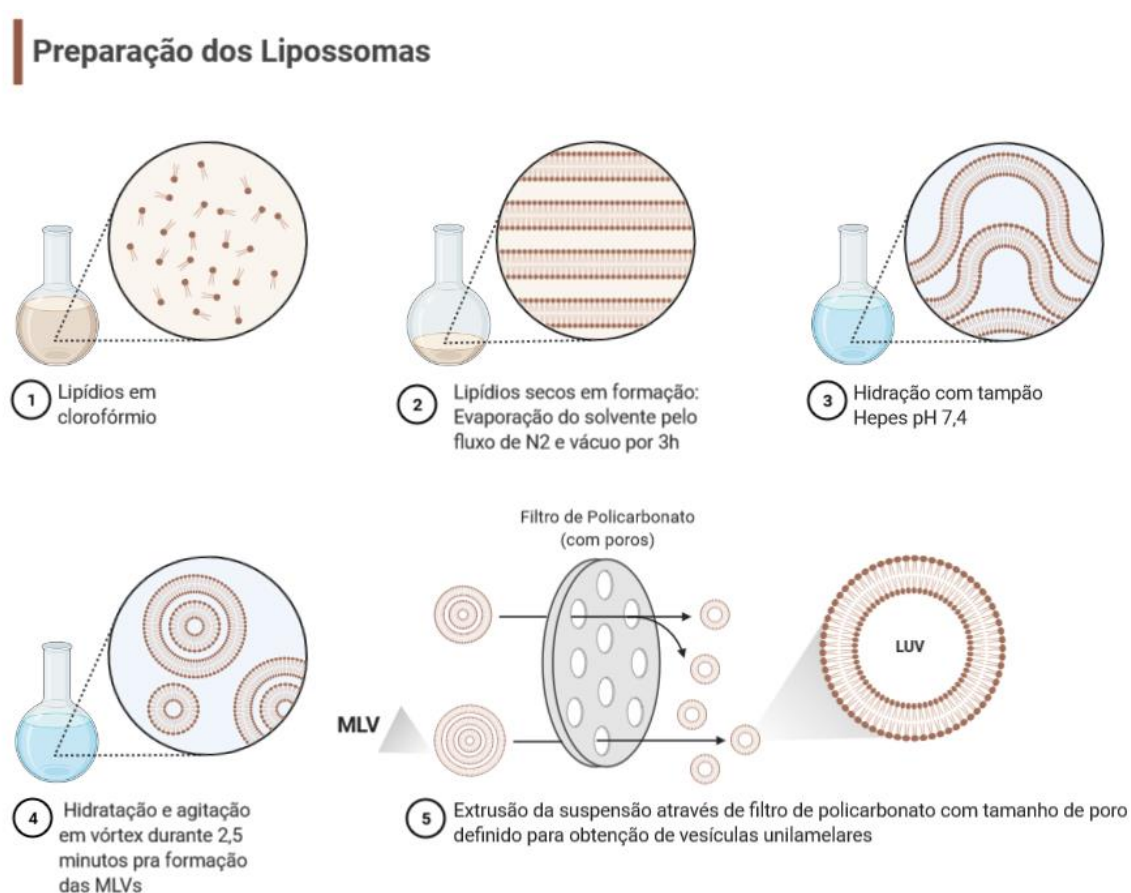
Para analisar o efeito do teor de Tween 80 no tampão HEPES sobre a solubilidade da Que. Nesse ensaio a Que a 15 mg foi adicionada a 10 ml das soluções: HEPES pH 7,4 contendo 0%, 0,5% e 1,0% de Tween 80. Após este preparo, o sistema foi submetido a agitação magnética por 24 horas ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após 24 horas a amostra foi filtrada com filtro de corte 0,45 μm e analisada por espectroscopia de UV-Vis modelo Shimadzu UV 2600 (Shimadzu Corp. Japão).

4.5 LIPOSSOMAS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_p)

Os lipossomas foram preparados através da formação de filmes lipídicos nas misturas desejadas. Um esquema representativo deste processo pode ser visto na Figura 6. Para tanto, realizou-se a diluição dos fosfolipídios e/ou colesterol em clorofórmio. Em seguida, a completa evaporação do solvente em atmosfera de N_2 seguida de 3h de vácuo foi realizada. Ao final, um filme lipídico foi formado e subsequentemente hidratado com solução tampão HEPES 20 mmol L^{-1} + NaF 150 mmol L^{-1} e agitado em vórtex formando MLVs que são submetidas ao processo de extrusão através de uma membrana de policarbonato (6 e 11 vezes em membranas de 400 e

100 nm de tamanho de poro, respectivamente) que induz a ruptura temporária das vesículas lipídicas e a remontagem em LUVs como esquematizado na figura 6. Durante a extrusão, a solução lipídica é tipicamente empurrada para frente e para trás através da membrana dezenas de vezes, de modo que o corte da membrana define o tamanho final das vesículas (LUCHINI E VITIELLO, 2021). Foram obtidas LUVs com um diâmetro médio de 110 a 140nm e índice de polidispersividade variando de 0,10 a 0,15 conforme confirmado por espalhamento de luz dinâmico com um ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.).

Figura 6 - Preparação dos Lipossomas



Fonte: Elaborado pelo Autor com BioRender.com

4.6 PREPARO DAS FORMULAÇÕES (MLVS + QUE)

As formulações lipídicas na presença de quercetina foram preparadas por meio da diluição dos fosfolipídios e/ou colesterol em clorofórmio. Este processo foi seguido da completa evaporação do solvente em atmosfera de N₂ seguida de 3h de vácuo. Então, a solução

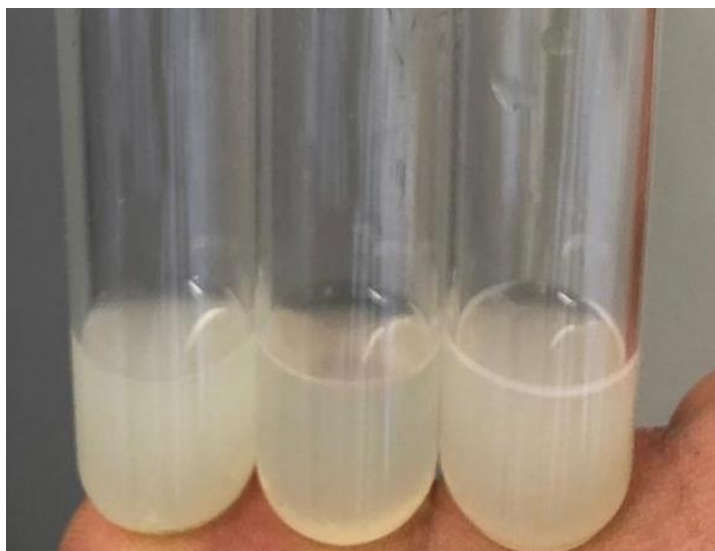
de quercetina a 1 mM foi adicionada à mistura lipídica na razão (3:100) (m/m). A suspensão resultante foi ressuspensa em clorofórmio, agitada em vórtex e submetida ao processo de remoção do solvente. Ao final desta etapa o filme lipídico contendo quercetina foi formado (FIGURA 7). Na sequência, o filme foi hidratado com solução tampão HEPES 20 mmol L⁻¹ + NaF 150 mmol L⁻¹ e agitado em vórtex por 2,5 minutos para emulsificar e obter as formulações de quercetina encapsulada em MLVs (FIGURA 8). Cada formulação foi preparada pelo menos três vezes.

Figura 7 - Tubo de ensaio com uma fina película de lipídio seco e quercetina.



Fonte: Do Autor, 2021

Figura 8 - Tubos de ensaio contendo solução de MLVs+Que em Tampão Hepes.



Fonte: Do Autor, 2021

4.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA EM METANOL

Uma curva de calibração de quercetina em metanol foi construída a fim de estabelecer uma referência para quantificar o polifenol ao longo do estudo e garantir as condições que melhor caracterizam o sistema de interesse. Para isso, distintas amostras de quercetina foram diluídas em metanol compreendendo a faixa de concentração de 0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada amostra foi submetida a uma varredura de 300 nm a 600 nm em espectrofotômetro UV/VIS modelo Shimadzu UV 2600 (Shimadzu Corp. Japão) (FIGURA 9). Os comprimentos de máxima absorção bem como as respectivas intensidades de absorbância foram registrados. Com isso foi possível construir um gráfico da variação da intensidade de absorbância em função concentração de quercetina.

Figura 9 - Espectrofotômetro UV/VIS modelo Shimadzu UV 2600 (Shimadzu Corp. Japão)



Fonte: Do Autor, 2021

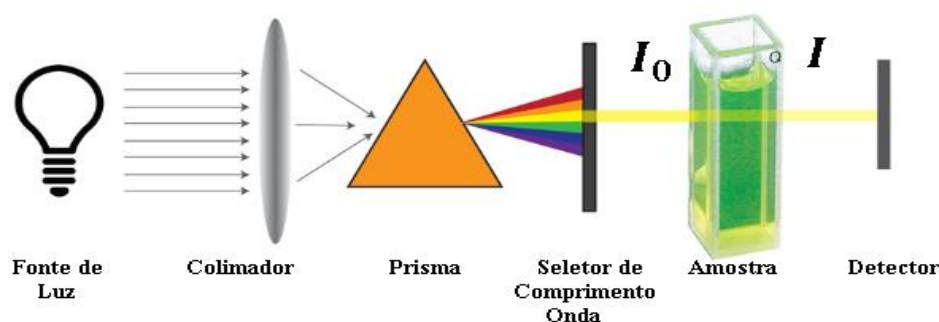
A técnica de absorbância, usada no espectrômetro, analisa a interação da luz com a matéria. Essa técnica refere-se à capacidade de uma substância absorver luz em um comprimento de onda específico, onde, num leitor projetado para medir a absorbância (FIGURA 10), uma fonte de luz ilumina a amostra (I_0 - intensidade da luz incidente) usando um comprimento de onda específico selecionado por um filtro óptico ou um monocromador, e um detector de luz localizado no outro lado da amostra mede quanto da luz inicial é transmitida através da amostra (I – intensidade de luz transmitida). O resultado se refere a absorbância (Equação 1). A absorção da luz correlaciona-se com a energia de um fóton que é absorvido pelos elétrons do átomo e quantifica quanto da luz incidente é absorvida pela amostra em vez

de ser refletida ou refratada (SILVA, 2011; EISBERG e RESNICK, 1979; ATKINS, 2011; OWEN, A. E. 1996).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

onde: I_0 = Intensidade da luz incidente e I = Intensidade da luz transmitida.

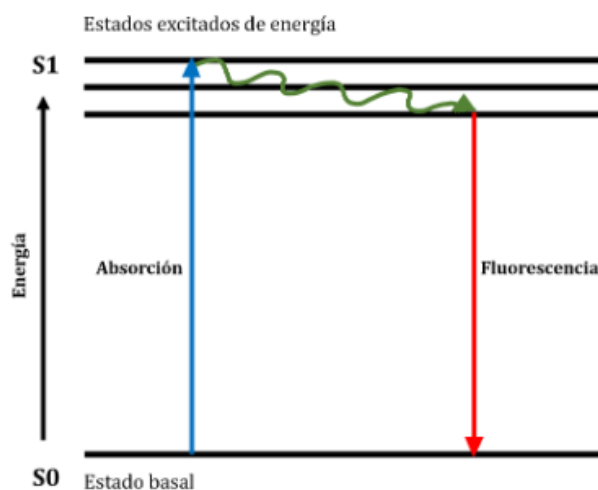
Figura 10 - Espectrofotômetro - leitor usado para medir a absorbância.



Fonte: Basha, 2020

Nesse processo para quantificar a energia do fóton é usado o diagrama de Jablonski (FIGURA 11) que é um diagrama de níveis de energia. Através desse diagrama é possível elucidar o mecanismo de excitação de um elétron quando uma substância é sujeita a interação com a luz. Os elétrons das moléculas, que estão inicialmente em seu estado fundamental (S_0), passam para um estado excitado (S_1) de maior energia quando são irradiados com fótons de luz. Permanecem no estado excitado por um certo tempo, no qual as moléculas interagem com o ambiente podendo sofrer mudanças conformacionais. Como consequência disso, a energia é dissipada criando um estado de menor energia (S_1') e um fóton de luz de menor energia (maior comprimento de onda) é emitido, gerando o efeito de fluorescência captado pelo espectrofluorímetro. Este é um dos métodos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas: mede-se a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda.

O conceito de níveis de energia é descrito na mecânica quântica no qual um elétron poderá mudar para um nível de maior energia, um estado excitado, se e somente se, absorver uma quantidade específica de energia, equivalente a separação de energia destes níveis. Esta quantidade específica de energia é obtida de uma fonte de radiação e são denominados fótons. Contudo, quando o elétron está em um estado de maior energia, ele pode emitir o excesso de energia e voltar para um estado de menor energia, até que atinja o estado de menor energia, o estado fundamental gerando o efeito de fluorescência (EISBERG e RESNICK, 1979; ATKINS, 2011).

Figura 11 - Diagrama de Jablonskii

Fonte: Basha, 2020

Para relacionar a intensidade de luz que incide na amostra e a intensidade que emerge da amostra são usados estudos de Lambert e Beer onde a luz emergente decai exponencialmente com o aumento da concentração e do caminho percorrido na solução e é dada pela seguinte equação:

$$I = I_0 10^{-\epsilon lc} \quad (2)$$

onde c é a concentração da amostra, l é o comprimento da cubeta e $\epsilon(\lambda)$ é o coeficiente de extinção ou absortividade que é uma característica da substância dependente do comprimento de onda (λ) da radiação.

A razão entre a intensidade transmitida (I) e a intensidade inicial (I_0) da radiação é definida como transmitância ($T = I/I_0$) e que pode ser escrita como:

$$T = 10^{-\epsilon lc} \quad (3)$$

No entanto, podemos definir a absorbância A cuja expressão é:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

E por fim, chegamos à forma mais geral da lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon lc \quad (5)$$

Dessa forma, a lei de Beer-Lambert relaciona a absorvância de uma amostra à concentração. Isto permite tanto a determinação da concentração de qualquer amostra de uma solução com auxílio da equação (8) mostrar a dependência da absorvância com radiações eletromagnéticas de diversos comprimentos de luz formando o espectro de emissão de uma substância (Silva, 2011).

4.8 TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_P)

Para determinação do coeficiente de partição, foram feitas titulações espectrofotométricas de uma solução de quercetina a 21,5 μM . Para tanto, alíquotas da suspensão de LUVs foram adicionadas para obtenção de uma faixa de concentração de 0 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A cada adição, registrou-se um espectro de absorção de 300 a 500 nm no espectrofotômetro UV-Vis. Os espectros foram corrigidos para o efeito de diluição e a segunda derivada foi obtida para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima. Os valores de K_P foram determinados por gráficos de ajuste com a equação abaixo:

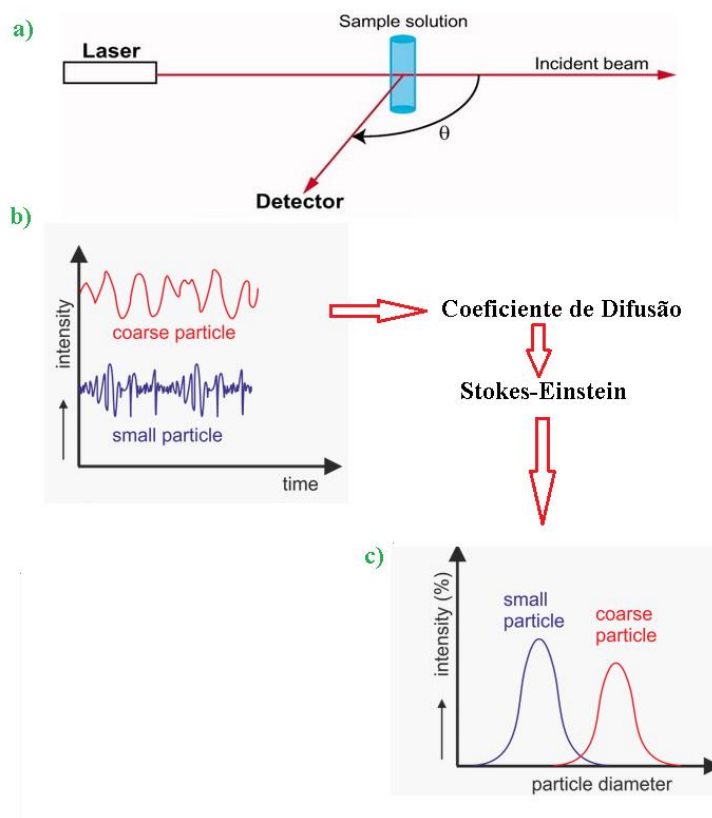
$$\frac{\text{Abs (L)}}{\text{Abs}_0} = 1 + \left(\frac{\text{Abs}_{\text{max}}}{\text{Abs}_0} - 1 \right) \times \frac{K_P \gamma_L [L]}{1 + K_P \gamma_L [L]} \quad (6)$$

onde $\text{Abs}_{(L)}$, Abs_0 e Abs_{max} são, respectivamente, a absorvância na presença de LUVs, na ausência, e a absorvância máxima obtida; $[L]$ é a concentração de fosfolipídios; K_P é o coeficiente de partição molecular lipídio/água, e γ_L sendo o volume molar do lipídio ($0,75 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPÍDICAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA

A técnica usada para analisar o tamanho e o PDI foi o DLS (do inglês *Dynamic light scattering*), conhecido também como espectroscopia de correlação de luz. Essa técnica é usada para obtenção do diâmetro médio e da homogeneidade da distribuição de tamanho das MLVs+Que. No DLS um raio laser é incidido sobre a amostra e o espalhamento resultante é registrado por um detector. Esse espalhamento, constitui da luz dispersa por cada partícula presente na amostra. Essas partículas estão em movimento browniano, de modo que suas posições mudam constantemente. Como consequência, a luz dispersa sofre o fenômeno de interferência. A mudança da posição dos centros de dispersão resultam em pequenas flutuações na intensidade da dispersão dando origem ao termo espalhamento de luz “dinâmica”. A alteração da intensidade da luz dispersa é medida em relação ao tempo em um determinado ângulo fixo em relação à direção da incidência do feixe - geralmente 90° , como esquematizado na Figura 12. Através do movimento das partículas é possível determinar a velocidade e o seu coeficiente de difusão translacional. Assim, o tamanho médio de sistemas esféricos é obtido através da relação de Stokes-Einstein na equação 7 (3p-instruments, 2020).

Figura 12 - a) Representação esquemática da configuração óptica de um sistema DLS. Por convenção, o ângulo de espalhamento θ é o ângulo entre o feixe incidente que sai da amostra e o detector. b) O detector analisa a intensidade pelo tempo. c) O coeficiente de



Fonte: Adaptado Lorber, 2012

A equação de Stokes-Einstein - que relaciona a escala de tempo da difusão de partículas com o diâmetro hidrodinâmico da esfera equivalente da partícula é:

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

onde D é a constante de difusão (que o DLS mede), B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade e r é o raio da partícula esférica.

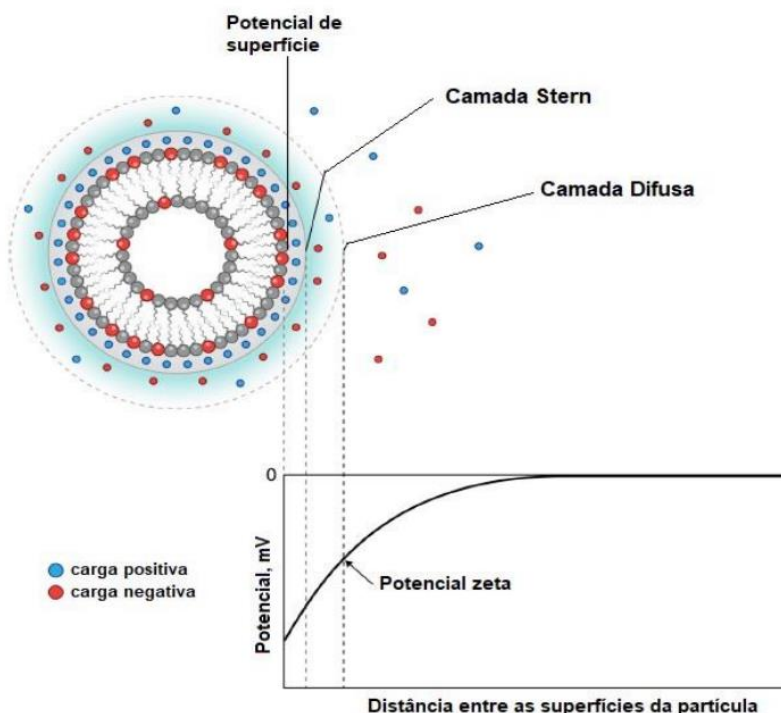
Nesse estudo as medidas de DLS foram realizadas em equipamento ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) no Laboratório de Biofísica de Membranas do Departamento de Física da UNESP de São José do Rio Preto - SP. Assim, 150 μL de solução contendo as MLVs+Que foram adicionadas a frascos do tipo eppendorf contendo 1850 μL de tampão HEPES 20 mmol L^{-1} + NaF 150 mmol L^{-1} , e homogeneizadas. As suspensões foram então transferidas para uma cubeta descartável DTS 1060 (Malvern) (FIGURA 13) com eletrodos de ouro, para a realização das medidas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes a 25° C.

Figura 13 - Cubeta capilar descartável modelo DTS1070



Fonte: Do Autor, 2021

As medidas de potencial zeta possibilitam explorar as propriedades de carga superficial das formulações por meio de velocimetria doppler. É uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática entre partículas, dessa forma pode-se compreender os processos de dispersão e agregação entre as moléculas, pois se refere ao potencial eletrostático presente no limite de uma camada de íons que envolve a partícula. (DE LIMA E MORTARI, 2022). A Figura 14 é uma representação esquemática da dupla camada que envolve a partícula em meio aquoso. A partícula representada constitui de um lipossoma composto por fosfolipídios carregados aniônicos e zwiteriônicos, em ambiente aquoso e na presença de espécies iônicas. A dupla camada é formada por uma primeira camada (Stern) composta principalmente por contra-íons carregados positivamente. A segunda camada (potencial zeta) é uma camada difusiva que consiste em contraíons e íons, que entram em contato com o ambiente orgânico ou aquoso (Carvalho, 2018). O potencial zeta é a diferença entre o potencial elétrico na superfície de cisalhamento da partícula e o potencial elétrico da solução (BERBEL MANAIA et al., 2017; SLADE, 2014).

Figura 14- Potencial Zeta

Fonte: Adaptado de SMITH et al., 2017.

Nas técnicas usadas para medir o potencial zeta, as partículas dispersas em meio aquoso são colocadas em uma célula com dois eletrodos e submetidas a um campo elétrico. A presença deste campo resulta na mobilidade das partículas (chamada de mobilidade eletroforética) em direção ao eletrodo de carga oposta a elas. As partículas passarão a se mover com uma velocidade relacionada à sua carga, que pode ser obtida pela equação 8 (Silva, 2016).

$$u_e = \frac{2\zeta\epsilon f(\kappa a)}{3\eta} \quad (8)$$

ue é a mobilidade eletroforética, ζ é o potencial zeta, ϵ é a constante dielétrica média, $f(\kappa a)$ é a função de Henry, κ é o comprimento de Debye, o raio da partícula e η é a viscosidade média.

As medidas de Potencial Zeta foram realizadas em equipamento ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) no Laboratório de Biofísica de Membranas do Departamento de Física da UNESP de São José do Rio Preto - SP. Assim, 150 μL de solução contendo as MLVs + Que foram adicionadas a frascos do tipo eppendorf contendo 1850 μL de tampão HEPES 20 mmol L^{-1} + NaF 150 mmol L^{-1} , e homogeneizadas. As suspensões foram então transferidas para uma cubeta descartável DTS 1060 (Malvern) com eletrodos de ouro, para a realização das medidas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes a 25° C.

4.10 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA EM MLVS.

A eficiência de encapsulamento (%EE) da Que pelas MLVs foi determinada através do método indireto. Para isso 500 μL de MLVs+ Que foi centrifugado (FIGURA 15.a) por 10 minutos a 12.000 rpm. Após 100 μL do sobrenadante (FIGURA 15.b) foram diluídos em 1900 μL de metanol e a concentração foi determinada pelo aparelho UV-VIS usando o espectrofotômetro modelo Shimadzu UV2600 (Shimadzu Corp. Japan). A equação 9 foi utilizada para determinar a eficiência de encapsulamento da Que (%EE) das três amostras analisadas.

$$\%EE = 100 - \left(\frac{[QUE]_{sobrenadante}}{[QUE]_{total}} \times 100 \right) \quad (09)$$

sendo [Que] sobrenadante a quantidade de quercetina encontrada no sobrenadante; [Que] total a quantidade total de quercetina adicionada no preparo das MLVs.

Figura 15 - a) Centrífuga b) Sobrenadante e pellet obtido após centrifugação.



Fonte: Do Autor, 2021

4.11 ENSAIO DE PERFIL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA IN VITRO

Testes de liberação *in vitro* foram realizados para monitorar as cinéticas de liberação da quercetina em função das distintas composições lipídicas. Para os testes, 1350 μL de MLVs + Quercetina foram adicionadas à membrana de diálise (membranas de acetato de celulose; 18,2 M Ωcm ; ponto de corte = 12,400 MW, Sartorius Alemanha). Ambos os lados da membrana foram selados para evitar vazamento formando assim uma bolsa de diálise (FIGURA 16 a). As bolsas foram colocadas imersas em um recipiente de 30 mL contendo tampão HEPES pH 7,4 (HEPES 20 mmol L⁻¹ + NaF 150 mmol L⁻¹) e Tween 80 (FIGURA 16 b), sendo mantidas sob agitação e protegidas da luz (FIGURA 17).

A liberação da quercetina foi analisada pela extração de alíquotas de 2 mL da solução receptora em intervalos de tempo de 0h, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h e 48h em temperatura ambiente. A cada coleta de 2 mL de uma alíquota para análise 2 mL de tampão HEPES + Tween 80 eram adicionados ao meio para manter o volume constante durante o experimento. A quantidade de quercetina liberada em cada momento foi determinada pelo UV-VIS usando o espectrofotômetro Shimadzu UV2600 (Shimadzu Corp. Japan). A absorbância obtida em cada alíquota foi convertida em porcentagem de liberação com auxílio da curva de calibração, possibilitando a obtenção do padrão de liberação da quercetina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 16 - a) Membrana de diálise contendo MLVs com quercetina e tampão. b) Membrana de diálise dentro do erlenmeyer com 30 ml de tampão

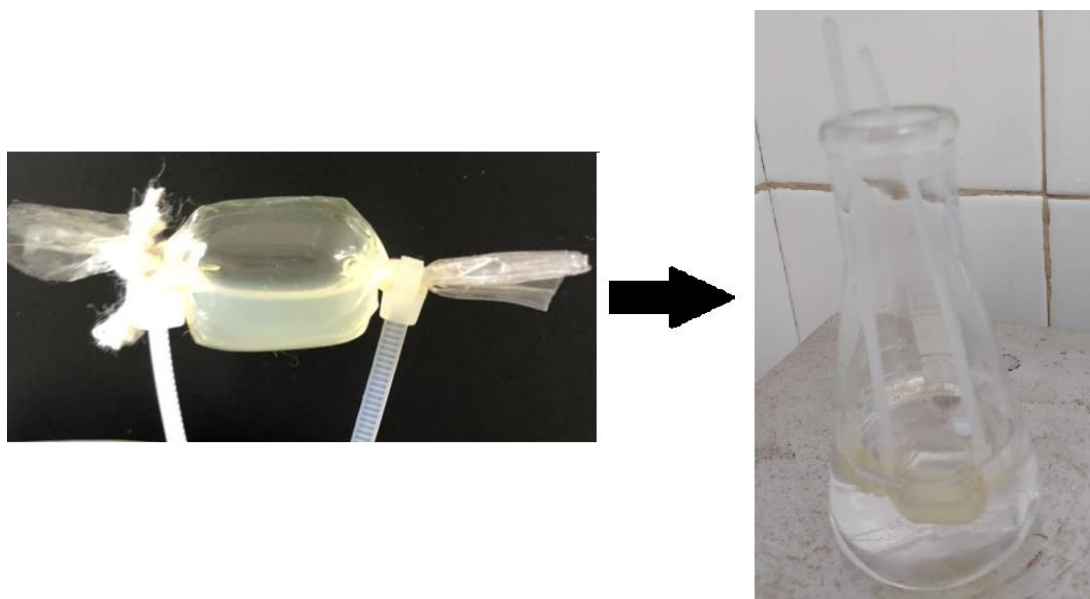


Figura 17 - a) Membrana de diálise contendo MLVs com quercetina e tampão dentro do erlenmeyer com 30 ml de tampão em um agitador magnético; b) Erlenmeyer mantido sob o abrigo da luz



Fonte: Do Autor, 2021

4.12 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO POR MODELAGEM MATEMÁTICA

As cinéticas de liberação foram analisadas a luz de distintos modelos para elucidar o mecanismo de liberação relacionando a quantidade de polifenol liberada com o tempo de liberação. No presente trabalho, fez-se uso de 04 modelos matemático: Zero Ordem, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (SIEPMANN, 2001; KUMAR et al., 2020; MURA et al., 2021; BAISHYA, 2017):

i) Modelo de ordem zero: Neste modelo, a liberação do composto bioativo pode ser representada pela equação 10:

$$C_t = C_0 + K_0 \times t \quad (10)$$

onde, C_t é a quantidade de droga liberada no tempo t ; C_0 é a concentração inicial do fármaco no tempo $t=0$ e K_0 é a constante de taxa de ordem zero. Assim, a cinética de ordem zero define o processo de liberação constante do fármaco e se o nível do fármaco permanece constante ao longo da liberação.

ii) Modelo de primeira ordem: Processo de primeira ordem é aquele cuja taxa é diretamente proporcional à concentração do fármaco/bioativo em reação, ou seja, quanto maior a concentração, mais rápida é a reação. Portanto, segue uma cinética linear calculada pela equação 11.

$$\log C = \log C_0 - \frac{K_1}{2.303} \times t \quad (11)$$

onde K_1 é a constante de taxa de primeira ordem expressa em tempo⁻¹ ou por hora, C_0 é a concentração inicial da droga, C é a porcentagem de droga restante no tempo t .

iii) Modelo de Higuchi: A liberação de uma molécula bioativa de um sistema de liberação de drogas (DDS) envolve processos de dissolução e difusão. Seguindo a equação 12 abaixo:

$$Q = K_H \times t^{1/2} \quad (12)$$

onde, K_H é a constante de dissolução de Higuchi; Q é a quantidade cumulativa de molécula bioativa liberada no tempo t .

iv) Modelo Korsmeyer-Peppas: O modelo Korsmeyer-Peppas é um modelo bem conhecido usado para descrever o mecanismo de liberação de um composto ativo. Korsmeyer e Peppas estabeleceram uma relação simples que descreve a liberação da droga de um sistema polimérico seguindo o tipo de dissolução. A equação é representada da seguinte forma (13):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{kp} \times t^n \quad (13)$$

onde, M_t / M_∞ é uma fração da droga liberada no tempo t ; M_t é a quantidade de droga liberada no tempo t ; M_∞ é a quantidade de droga liberada após o tempo ∞ ; n é o expoente difusional ou expoente de liberação do fármaco; K_{kp} é a constante de taxa de liberação de Korsmeyer.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

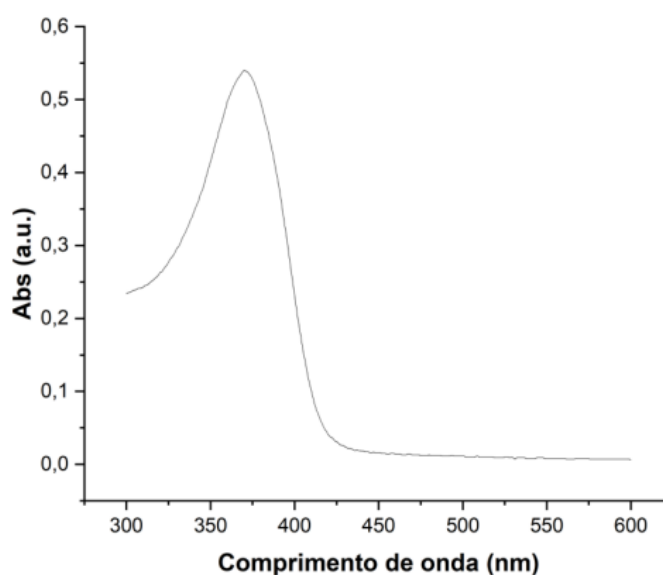
Os resultados obtidos são apresentados como Média \pm Desvio Padrão (SD). As estatísticas foram realizadas no *Origin Software* (versão 8.5) usando uma análise Anova de uma via seguida pelo Teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA QUERCETINA EM METANOL

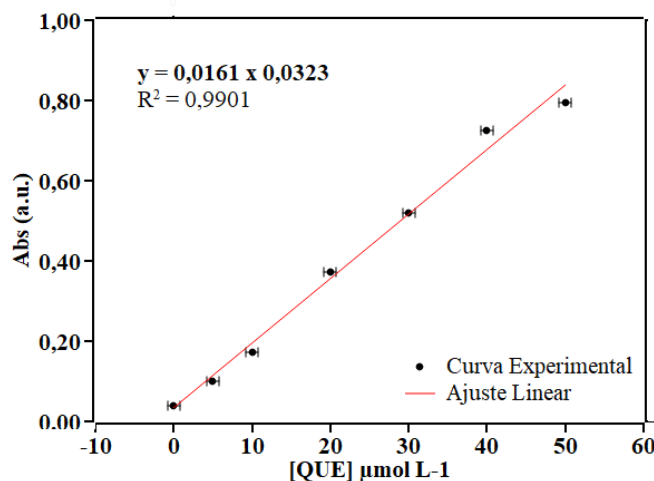
Curvas de calibração são utilizadas para determinar uma concentração desconhecida de uma solução. Essa relação tem origem na proporcionalidade direta entre a concentração de soluções e a quantidade de luz absorvida, em comprimentos de onda característicos, nos limites da Lei de Beer-Lambert. A lei de Beer-Lambert é amplamente utilizada para estudos que envolvem encapsulamento desde a construção da curva de calibração para quantificar o bioativo bem como no acompanhamento das cinéticas de liberação e eficiência do encapsulamento. A determinação de uma curva de calibração auxilia na quantificação de agentes que se encontram dispersos em soluções de modo experimental, como é o caso dos sistemas de liberação de fármacos ou bioativos. Nesse sentido, uma curva de calibração da quercetina em metanol foi construída para estabelecer uma referência que possibilita quantificar tanto a quercetina encapsulada nas vesículas multilamelares quanto a fração liberada nas cinéticas de liberação. A figura 18 exibe um exemplo de espectro de absorbância da quercetina em metanol para a concentração de $21,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em seguida, as intensidades de máxima absorção foram plotadas em função da respectiva concentração do polifenol, como mostrado na figura 19.

Figura 18 - : Espectro de absorbância da quercetina em metanol



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

Figura 19 - Curva de calibração obtida para o padrão de quercetina usando metanol como solvente, $\lambda = 372$ nm, a 25 ° C. (Os pontos representam a média de um triplicado e a linha contínua é obtida a partir do ajuste linear)



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

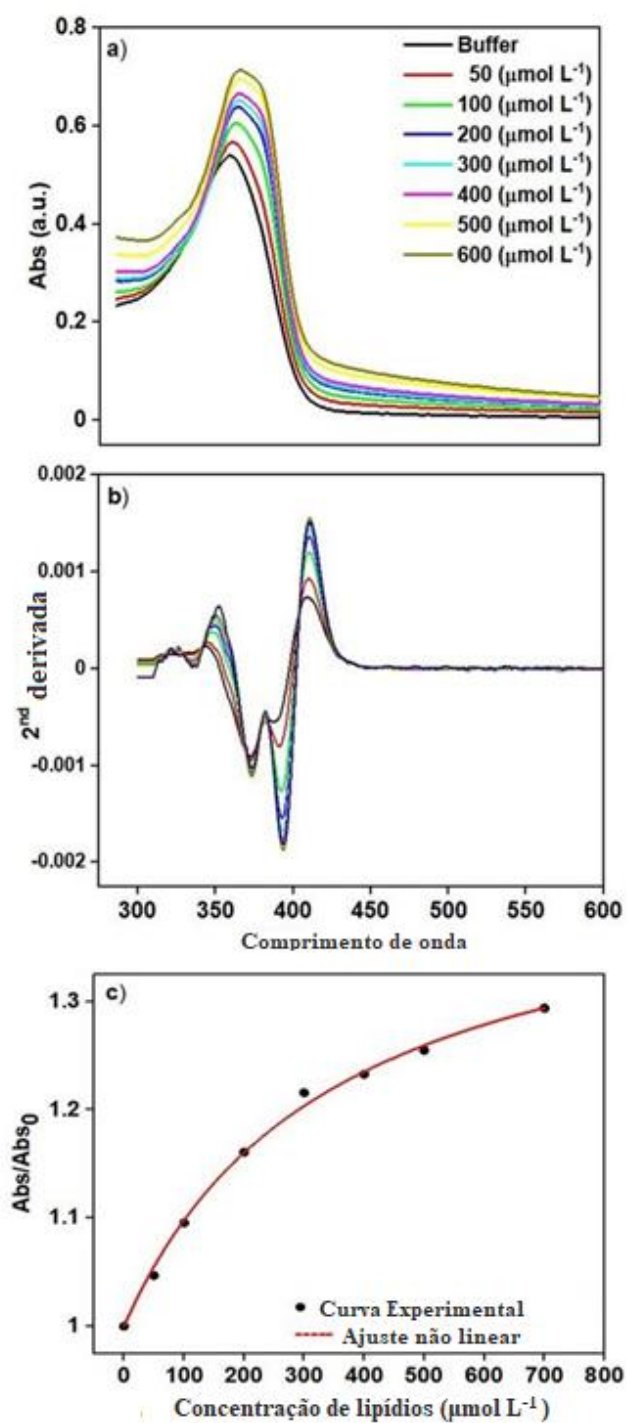
É possível notar que a curva construída apresenta um comportamento linear respeitando os limites da lei de Beer-Lambert, em concordância com os dados disponíveis na literatura (SAHA et al., 2018; GOÑI et al., 2008). O ajuste linear sobre os dados experimentais foi realizado exibindo o coeficiente de correlação, $R^2 = 0,9901$. Em seguida a curva obtida foi submetida a um ajuste linear para verificação da linearidade do sistema e a conformidade com a lei de Beer-Lambert.

5.2 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K_P)

Coeficiente de Partição (K_P) foi utilizado para avaliar a afinidade do composto bioativo pelas composições lipídicas POPC/Col/POPG (60:20:20) e POPC/POPG (80:20). Esse estudo é feito através das mudanças observadas no espectro da quercetina em função da adição de solução lipídica. A Figura 20a mostra as mudanças espectrais de quercetina em função da adição da solução lipídica POPC/Col/POPG (60:20:20). É possível notar que a intensidade de absorção aumenta com a adição do lipídio, bem como um deslocamento espectral para maiores comprimentos de onda. Esse efeito é um indicativo de que o polifenol está se deslocando de um ambiente polar, como o tampão, para um ambiente apolar, como a bicamada lipídica (RICH et al., 2017; LEITE et al., 2021). Os espectros obtidos para cada concentração de lipídio foram

submetidos ao cálculo da segunda derivada, Figura 20b. Este método foi utilizado para determinar o comprimento de onda de absorbância máxima para cada condição. Assim, as respectivas absorbâncias máximas foram normalizadas e ajustadas pela eq. 6 para obtenção do K_P (FIGURA 20c). Os valores para cada composição lipídica estão listados na tabela 5. Através deste trabalho obteve-se os valores para as composições POPC/Col/POPG (60:20:20) e POPC/POPG (80:20). Os valores apresentados para as demais composições foram obtidos por Leite e colaboradores 2021.

Figura 20 - Titrulações espectrofotométricas de quercetina ($21,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sob concentrações crescentes de lipídios ($0 - 600 \mu\text{mol L}^{-1}$). a) Mudanças espectrais de quercetina representativas em função da adição de solução lipídica para POPC/Col/POPG (60:20:20) b) Segundas derivadas do conjunto de espectros mostrado em a) para determinar o comprimento de onda de absorbância máxima. c) Determinação dos valores de K_P na presença de POPC/Col/POPG (60:20:20) LUVs em pH 7,4. A linha contínua foi obtida usando o ajuste não linear mostrado na equação 1. Os experimentos foram realizados a 25°C



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

Tabela 5 - Valores do coeficiente de partição para cada composição lipídica

Composição Lipídica	$K_P (10^4)$
POPC (100)	$1.00 \pm 0.10^*$
POPC/POPG (80:20)	0.43 ± 0.03
POPC/Col (80:20)	$1.60 \pm 0.03^*$
POPC/Col/POPG (60:20:20)	0.97 ± 0.10

* Esses valores foram obtidos em (SLADE et al., 2021).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

Os resultados mostram que a quercetina particiona significativamente para os sistemas lipídicos ($K_P \sim 10^4$). Tomando como referência o valor do coeficiente de partição obtido para a composição de POPC (100%) podemos notar que a presença do Col na solução POPC/Col (80:20) aumentou significativamente a afinidade da Quercetina por essa composição. No entanto, a presença de lipídios aniônicos (POPG) reduz sua afinidade por eles, o que provavelmente está relacionado à carga elétrica líquida negativa, exibida pela quercetina em pH 7,4 (AWASTHI et al., 2021), dando origem à repulsão eletrostática entre a quercetina e os lipídios.

Já os resultados para POPC/Col/POPG confirmam a alta afinidade do polifenol pela composição contendo 20% de Col, apesar da redução da fluidez da membrana (SLADE et al., 2021). Nessa composição, observou-se que a presença tanto de lipídios aniônicos quanto do Col contribuíram para uma afinidade similar àquela obtida para POPC (100). Assim, pode-se notar que a afinidade da quercetina pelo Col pode reduzir os possíveis efeitos da repulsão eletrostática relacionados à presença do POPG.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPÍDICAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA

O tamanho médio é uma das características mais importantes a serem levadas em consideração na formulação de sistemas nano e microparticulados, pois este parâmetro influencia em outros fatores tais como a capacidade de carregamento, biodistribuição, toxicidade, meia-vida sistêmica, perfil de liberação, estabilidade, internalização celular, perfil

de liberação e capacidade de agir em um alvo específico (DE LIMA E MORTARI, 2022). Para analisar o tamanho médio foram preparadas formulações contendo MLVs+QUE (vesículas multilamelares + quercetina) e caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) em cada composição lipídica. Vale ressaltar que o DLS não fornece informações sobre o formato da nanopartícula e que elas tendem a se agregar em água, alterando seu tamanho e propriedades de superfície subestimando o tamanho real da partícula. Também que a partícula não pode absorver o mesmo comprimento de onda do laser usado no equipamento, pois dessa forma não é possível determinar o tamanho da partícula (BERBEL MANAIA et al., 2017).

Essa análise possibilitou acessar o diâmetro médio das estruturas obtidas e o grau de homogeneidade do sistema por meio do Índice de Polidispersidade (PdI) (AWASTHI et al., 2021; PIVETTA et al., 2019). Os resultados estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Diâmetro médio das diferentes composições de lipídios contendo quercetina encapsulada. (Média e SE, n = 9, valores de p <0,05 foram considerados significativos)

Composição Lipídica	Diâmetro Médio (nm)
POPC (100%)	2068.3 ± 150
POPC/POPG (80:20)	605.9 ± 77.9
POPC/Col (80:20)	1884.0 ± 74.1
POPC/Col/POPG (60:20:20)	63.3 ± 7.8

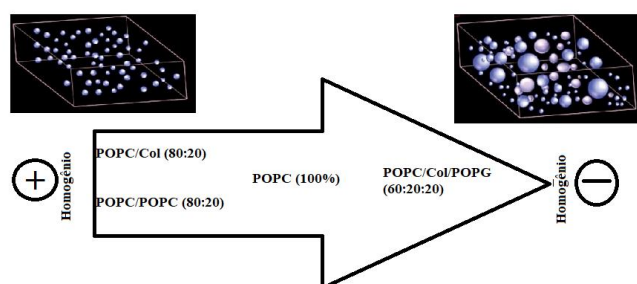
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

Os diâmetros médios obtidos para as MLVs + QUE compostas por POPC (100%) e POPC/POPG (80:20) e POPC/Col (80:20) são característicos dos previstos para essas estruturas (100 - 1000 nm para MLVs de composição lipídica geral (PINHEIRO et al., 2011; FATOUROS e ANTIMISIARIS, 2002; JEON et al., 2015); até 1970 nm para POPC e POPC/Col (90:10) (LAWRENCE et al., 1993; ESPIRITU et al., 2016). Através deste resultados é possível notar que a quercetina não contribui significativamente para o aumento do diâmetro médio das estruturas. Isso é coerente com os estudos de Jovanović e col., 2018 e Espiritu e col., 2016, a presença da quercetina não afeta os tamanhos médios das MLVs para composições de POPC (100%) e POPC/Col (90:10) (JOVANOVIĆ et al., 2018; ESPIRITU et al., 2016) e também não afetou o tamanho médio quando encapsulado outras moléculas bioativas em MLVs (SHAJI e IYER, 2012; SAHA et al., 2018; LAWRENCE et al., 1993); BONECHI et al., 2018).

O resultado obtido para a composição POPC/Col/POPG diverge do encontrado para as demais formulações, apresentando um diâmetro médio de 63.3 ± 7.8 nm. Isso indica que a combinação de POPG e colesterol promoveu a redução significativa desse parâmetro.

Outro parâmetro utilizado na caracterização das formulações é o PDI. Amplamente usado para avaliar a homogeneidade do sistema (FIGURA 20), pois representa a distribuição das populações de tamanho dentro de uma amostra (DANAEI et al., 2018). Os valores numéricos de PDI variam de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com múltiplas populações de tamanho de partícula) (JOVANOVIĆ et al., 2018). Também é conhecido como o índice de heterogeneidade, é um índice numérico e adimensional. Os valores inferiores a 0,05 descrevem amostras altamente monodispersas e valores superiores a 0,7 descrevem amostras polidispersas, que não são muito desejáveis para aplicações terapêuticas (DE LIMA E MORTARI, 2022) e não sendo adequado para ser analisado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (RICCI et al., 2016). Nossos resultados são exibidos na Tabela 7 e mostram valores que variam de 0,350 a 0,527. A presença de colesterol ou POPG resultou em sistemas mais homogêneos do que POPC puro e POPC/Col/POPG. Considerando o POPC (100%) como referência, nota-se que o POPG reduziu tanto o tamanho médio quanto os valores de PDI, sugerindo que a carga pode modular essas características das MLVs+QUE. Em contrapartida, o Col foi capaz de contribuir para a homogeneização da distribuição de tamanhos do sistema sem afetar o tamanho da estrutura, resultado que é coerente com as observações de Jovanović et al. (2018).

Figura 21 - Representação esquemática da homogeneidade das composições lipídicas.



Fonte: Do Autor, 2021.

Tabela 7 - Valores de PDI das formulações de distintas composições lipídicas. (Média e SE, n = 9, valores de p <0,05 foram considerados significativos)

Composição Lipídica	PdI
POPC (100%)	0.399 ± 0,05
POPC/POPG (80:20)	0.350 ± 0.03
POPC/Col (80:20)	0.350 ± 0.07
POPC/Col/POPG (60:20:20)	0.527 ± 0.04

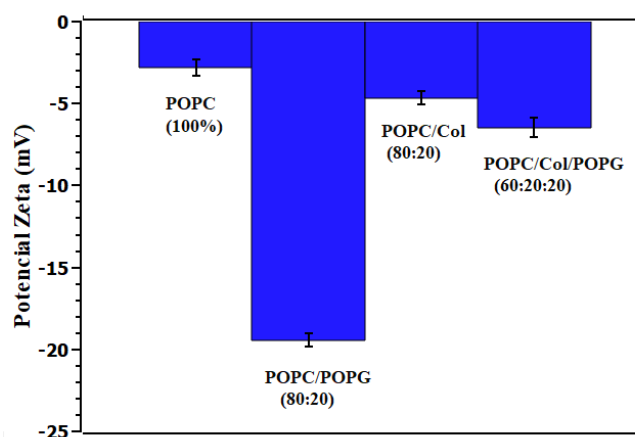
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

As composições POPC (100%); POPC/POPG (80:20) e POPC/Col (80:20) são moderadamente polidispersas (BHATTACHARJEE, 2016) e estão próximas do limite superior ao que é aceitável para a entrega de drogas usando transportadores à base de lipídios. Apesar da literatura apresentar que as formulações baseadas em lipídeo são consideradas aceitáveis quando apresentam PDIs abaixo de 0,3, deve ser ressaltado que as normas e diretrizes estão em constante atualização e que diferentes faixas de aceitabilidade são consideradas para cada tipo de aplicação e vias de administração (DANAEI et al., 2018). Destes resultados observa-se, ainda, que a presença de Col e POPG separadamente reduz a homogeneidade dos sistemas em comparação a POPC puro. Isso sugere que a inserção de componentes carregados ou de enrijecimento foram capazes de produzir efeitos semelhantes neste parâmetro quando isolados nas composições lipídicas, mas que não foram observados quando coexistem em POPC/Col/POPG (60:20:20).

O potencial Zeta é derivado de medições da mobilidade eletrocinética e fornece informações sobre a intensidade das cargas elétricas superficiais dos sistemas. Varia de - 100 mV a +100 mV. Valores entre -10 mV e +10 mV são considerados eletricamente neutros, enquanto potenciais zeta inferiores a -30 mV são fortemente aniônicos e potenciais zeta superiores a +30 mV são fortemente catiônicos (DE LIMA E MORTARI, 2022). O potencial ideal para indicar estabilidade de partículas dispersas em uma solução é acima de +15mV ou abaixo de -15mV, que acarreta em maior repulsão eletrostática entre as partículas. Enquanto valores entre -15mV e +15mV indicam condições instáveis que favorecem agregação, coagulação e floculação (FIGUEREDO, 2015; SILVA, 2016; MALVERN, 2020).

A figura 22 apresenta os valores médios de potencial zeta para cada formulação. Foram obtidos os seguintes valores de potencial zeta médio: $-2,81 \pm 0,5$ mV para POPC (100%), $-19,43 \pm 0,4$ mV para POPC/POPG (80:20), $-4,66 \pm 0,4$ mV para POPC/Col (80:20) e $-6,47 \pm 0,6$ mV para POPC/Col/POPG (60:20:20).

Figura 22 - a) Potencial zeta médio das formulações de distintas composições lipídicas.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

O potencial apresentado por POPC/Col é mais negativo que o apresentado por POPC(100%). Este efeito deve-se ao fato de que a inclusão de esteróis pode alterar a ordem dos fosfolípidios e a espessura da bicamada possibilitando a realização de ligações de hidrogênio entre lípidios e esteróis bem como mudanças na carga total das formulações (JOVANOVIĆ et al., 2018; BHATTACHARYA e HALDAR, 2002; MANDIĆ et al., 2019). Além disso, pode-se relacionar este resultado ao fato de que a quercetina apresenta maior coeficiente de partição pela composição POPC/Col, consequentemente, uma maior quantidade de quercetina pode estar adsorvida na superfície dessas MLVs. Como a quercetina apresenta carga elétrica negativa em pHs neutros, a sua adsorção na superfície pode contribuir para um potencial zeta ainda mais negativo.

Jovanović et al. (2018) encontraram valores de potencial zeta próximos a -8 mV e -10 mV para MLVs compostos por POPC e POPC/Col (80:20) respectivamente, na ausência de NaF. Esses valores negativos nas composições zwitteriônicas estão relacionados à reorientação dos grupos das cabeças lipídicas, devido ao estado da fase lipídica e às espécies lipídicas

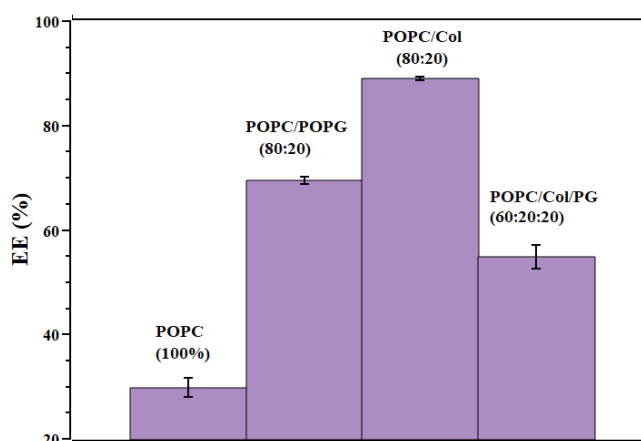
(JOVANOVIĆ et al., 2018). Nossos resultados para formulações zwitteriônicas também apresentam valores negativos, mas além dos efeitos decorrentes de suas composições, incluem os efeitos de carga desencadeados pela presença da quercetina e a força iônica do ambiente fisiológico. No entanto, pode ser visto na literatura para sistemas semelhantes que a quercetina contribui ligeiramente para suas propriedades de carga (LAWRENCE et. al, 1993; MANDIĆ et al., 2019). Esse efeito também foi observado por Bonechi et al. (2018), que mostrou que a incorporação de quercetina reduz o potencial zeta dos lipossomas DOPC/DOPE zwitteriônico (50:50) e DOPE/DOPA (50:50) aniônicos em $\Delta\zeta = 2\text{mV}$ e 5mV , respectivamente, na razão molar de 1: 1 entre lipídios totais e antioxidantes.

O potencial zeta mais negativo foi encontrado para POPC/POPG (80:20) ($-19,43 \pm 0,4\text{ mV}$) e está relacionado ao caráter aniônico da molécula de POPG e proporciona maior estabilidade ao sistema como nanocarreador. Esta estabilidade se dá pela repulsão eletrostática entre as MLVs dispersas em solução, reduzindo a tendência de agregação e fusão entre essas estruturas (PIVETTA et al., 2019; SCIOLLA et al., 2021; MANO et al., 2018; VÁŇOVÁ et al., 2017; PAQUET-CÔTÉ et al., 2019; BATISTA et al., 2017; DE LIMA E MORTARI, 2022). Nossos resultados mostram que essa condição pode ser obtida pela inserção de fosfolipídios aniônicos nas formulações. Zanin et al., 2013 encontrou valores de potencial zeta -20mV para lipossomas POPC/POPG (80:20) puros, sugerindo que uma pequena quantidade de quercetina está adsorvida na superfície das MLVs. Este resultado está de acordo com o resultado da partição da quercetina pela mesma composição lipídica, no qual a menor afinidade foi apresentada. Para POPC/Col/POPG, esperava-se que os valores do potencial zeta fossem maiores, dada a fração POPG (20%). Considerando os resultados de DLS e potencial zeta, é possível notar que tanto a presença de quercetina quanto a presença de POPG trazem carga ao sistema. Essa carga demonstrou atuar como fator modulador no diâmetro médio das formulações em relação ao POPC puro. Neste sentido, a presença de quercetina, colesterol, POPC e na formulação, observa-se que tanto a carga quanto a rigidez contribuem para a redução do tamanho dos MLVs. O efeito de carga pode estar relacionado à reorganização de lipídios aniônicos na presença de quercetina para minimizar a repulsão eletrostática entre essas espécies. Enquanto o efeito de rigidez relaciona-se às interações específicas entre quercetina e colesterol, conforme indicado pelos coeficientes de partição, e consistente com o efeito de condensação deste flavonóide relatado por Tarahovsky et al. (2008) e Leite et al. (2022). Como consequência, a sinergia desses efeitos pode ser responsável pela redução significativa do tamanho das MLVs onde coexistem rigidez e carga.

5.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA EM MLVS.

A eficiência de encapsulamento da quercetina em função da composição das MLV também foi avaliada. Para isso, foram realizados testes de eficiência por meio de espectroscopia UV-Vis, cujos resultados são apresentados na figura 23.

Figura 23 - Eficiência média de encapsulação (% EE) das composições lipídicas testadas contendo quercetina encapsulada.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

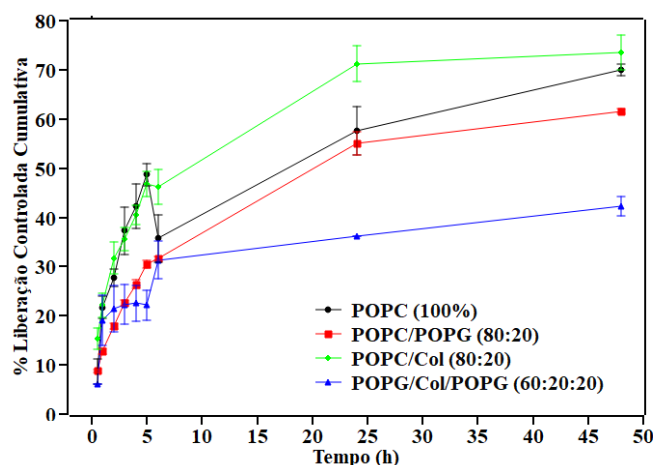
As eficiências de encapsulamento seguiram a ordem: POPC/Col (80:20) > POPC/POPG(80:20) > POPC/Col/ POPG (60:20:20) > POPC (100%) sugerindo que a incorporação de Col e/ou POPG nas formulações melhorou o encapsulamento da quercetina em relação ao POPC puro. A alta eficiência de encapsulamento para quercetina em misturas contendo POPC e colesterol já foi obtida por Ramli et al. (2020) onde $90,1 \pm 0,6\%$. Embora a maior eficiência de encapsulamento seja encontrada para a composição para a qual a quercetina tem a maior afinidade, este parâmetro não se mostra determinante para o encapsulamento de quercetina, visto que, a composição lipídica para a qual a quercetina tem a afinidade mais baixa (POPC/POPG), tem a segunda maior eficiência de encapsulamento. Esse resultado sugere que a repulsão eletrostática que pode atuar na redução da afinidade lipídio-quercetina não impede o encapsulamento provavelmente impulsionado por interações não eletrostáticas, como as hidrofóbicas. Isso é reforçado ao considerar o caráter pouco solúvel da quercetina em água (SAHA et al., 2018; TONIAZZO et al., 2017; HUANG et al., 2017; CODEVILLA et al., 2015).

Fosfolipídios carregados negativamente já se mostraram eficientes para a encapsulação da curcumina em lipossomas, atingindo eficiências de encapsulamento acima de 80% e permitindo resultados ótimos para liberação lenta e deposição na pele (PAMUNUWA et al., 2016). Os resultados para POPC/Col/POPG (60:20:20) mostram que a mistura de POPG e Col reduziu a eficiência de encapsulação do flavonóide em relação a POPC/POPG e POPC/Col podendo ser relaciona ao fato desta composição apresentar os menores diâmetros médios, conforme exibido na Tabela 6.

5.5 ENSAIO DE PERFIL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA IN VITRO

Ensaio de liberação controlada da quercetina encapsulada nas MLVs foram realizados para avaliar a cinética de liberação do polifenol. O perfil de liberação in vitro foi obtido pelo gráfico da porcentagem cumulativa da liberação de polifenol em relação a quantidade encapsulada em função do tempo (M_t / M_∞ versus t). Os ensaios de liberação controlada para a quercetina encapsulada nas MLVs para cada composição lipídica são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Ensaios de liberação controlada obtidos em λ_{max} de 378 nm para a quercetina nas diferentes composições lipídicas testadas



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

Todas as formulações exibiram uma liberação significativa que é dependente da composição lipídica. A menor taxa de liberação foi obtida para POPC/Col/POPG(60:20:20) consistente com nossos resultados para esta mesma composição que mostram estruturas de tamanho médio reduzido e eficiência de encapsulamento moderada. Além disso, o efeito de

enrijecimento da bicamada lipídica pelo colesterol deve ser considerado e pode estar interferindo neste processo. O enrijecimento proporcionado pelo colesterol também é visto na liberação de quercetina pela composição de POPC/Col (80:20), onde o maior conteúdo de quercetina foi encapsulado associado, no entanto, observa-se uma liberação atenuada. Essa atenuação atingiu percentuais equivalentes às observadas para a formulação que apresentou a menor eficiência de encapsulamento (POPC (100%). Além disso, esse resultado corrobora o fato de o flavonóide ter maior afinidade pela composição de POPC/Col, o que também pode prejudicar a cinética de liberação. A composição de POPC/POPG exibe a maior taxa de liberação. Este resultado corrobora com o baixo coeficiente de partição da quercetina pela mesma mistura lipídica. Além disso, possibilita destacar que, do ponto de vista tecnológico, esta composição apresenta os melhores resultados para constituir um sistema nanocarregador de quercetina, pois tem diâmetro médio em escala nanométrica, boa estabilidade e homogeneidade na distribuição de tamanhos e significativas eficiências de encapsulamento e liberação do flavonóide. Com isso, é possível apontar a carga, como um parâmetro importante na construção de sistemas nano e microcarregadores.

4.8 APLICAÇÃO DE DADOS DE LIBERAÇÃO DE QUERCETINA NOS MODELOS MATEMÁTICOS

Foi realizada avaliação cinética dos perfis de liberação de quercetina nas distintas composições lipídicas, para elucidar os mecanismos envolvidos na liberação de bioativos dos sistemas estudados. O presente trabalho, fez-se uso das seguintes abordagens matemáticas: Zero Ordem, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER et al., 1983; SIEPMANN, 2001; KUMAR et al., 2020; MURA et al., 2021; BAISHYA, 2017). Um fato comum entre as cinéticas de liberação, é a presença de uma taxa inicial de liberação que é significativamente rápida, ou seja, a quercetina é liberada mais rapidamente nas primeiras 06 horas do experimento. Esse comportamento é comumente atribuído a liberação dos bioativos que estão na superfície externa das formulações, ao passo que a liberação posterior é mais lenta devido a liberação de quercetina do núcleo interno das MLVs (KUMAR et al., 2020).

Foram usados os modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi para ajustar os resultados, enquanto o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (KP) foi usado para entender os mecanismos de liberação controlada. As cinéticas de liberação acompanhadas dos ajustes matemáticos são exibidas nas Figuras 25 a 28. A Tabela 7 mostra os parâmetros obtidos para

cada modelo e cada formulação. Os ajustes mais adequados para nossos sistemas foram obtidos usando os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas. É importante mencionar que o modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que apresentou o melhor coeficiente de correlação, R^2 para os sistemas com liberação superior a 60%, demonstrando que o modelo mencionado foi capaz de descrever a cinética de liberação do fármaco pelos lipossomas (KUMAR et al., 2020; MURA et al., 2021; BAISHYA, 2017; HAGHIRALSADAT et al., 201; JAIN e JAIN, 2016). Mostrando que a liberação de quercetina pelas formulações testadas segue a lei de Fick, pois apresenta $n \leq 0,43$ (KUMAR et al., 2020; MURA et al., 2021; BAISHYA, 2017), uma vez que, quando o expoente de difusão assume valores de $n < 0,43$ tem-se um indicativo de mecanismos de liberação que seguem a lei de Fick. Valores intermediários $0,43 \leq n \leq 0,85$ sugerem comportamento anômalo com liberação não Fickiana, enquanto $n > 0,85$ indica que o mecanismo é governado por processos de relaxação da matriz polimérica, definida como transporte tipo caso II (HAGHIRALSADAT et al., 201; JAIN e JAIN, 2016; FARIA et al., 2016; DOURADO et al., 2017; SIEPMANN e SIEPMANN, 2006; HUANG E BRAZEL, 2001; SIEPMANN et al., 2002). Por fim, nossos resultados demonstraram que apesar das diferenças desencadeadas pelas composições lipídicas apontadas ao longo deste estudo, os ensaios de liberação não foram suscetíveis a essas alterações.

Figura 25 - Modelos de Korsmeyer-Peppas aplicados a cinética de liberação da quercetina.

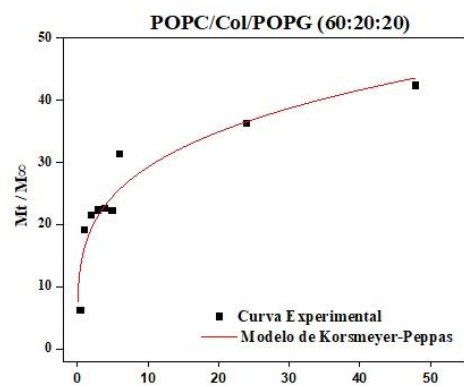
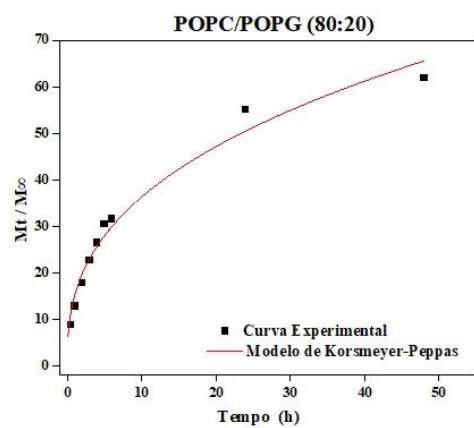
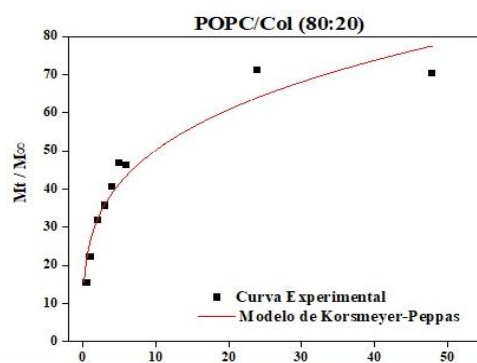
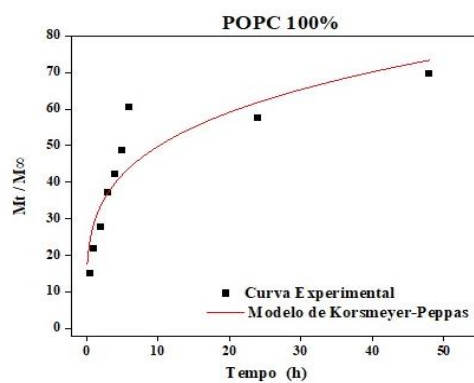


Figura 26 - Modelos de Ordem Zero aplicados à cinética de liberação da quercetina.

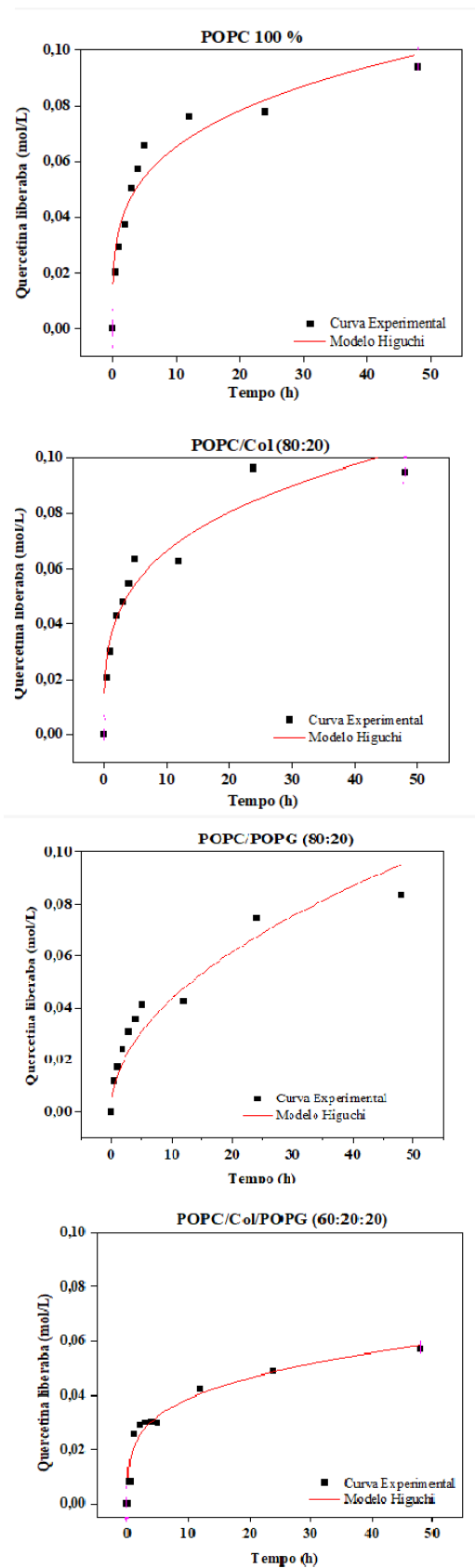


Figura 27 - Modelos de Primeira Ordem aplicados à cinética de liberação da quercetina.

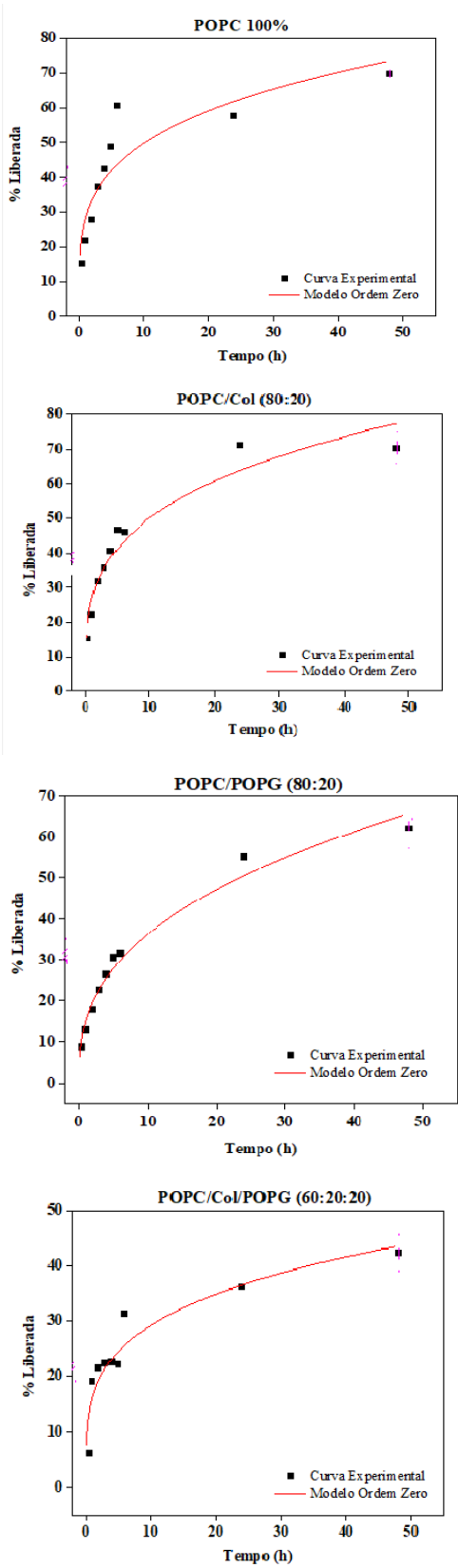


Figura 28 - Modelos de Ordem Zero aplicados à liberação cinética da quercetina

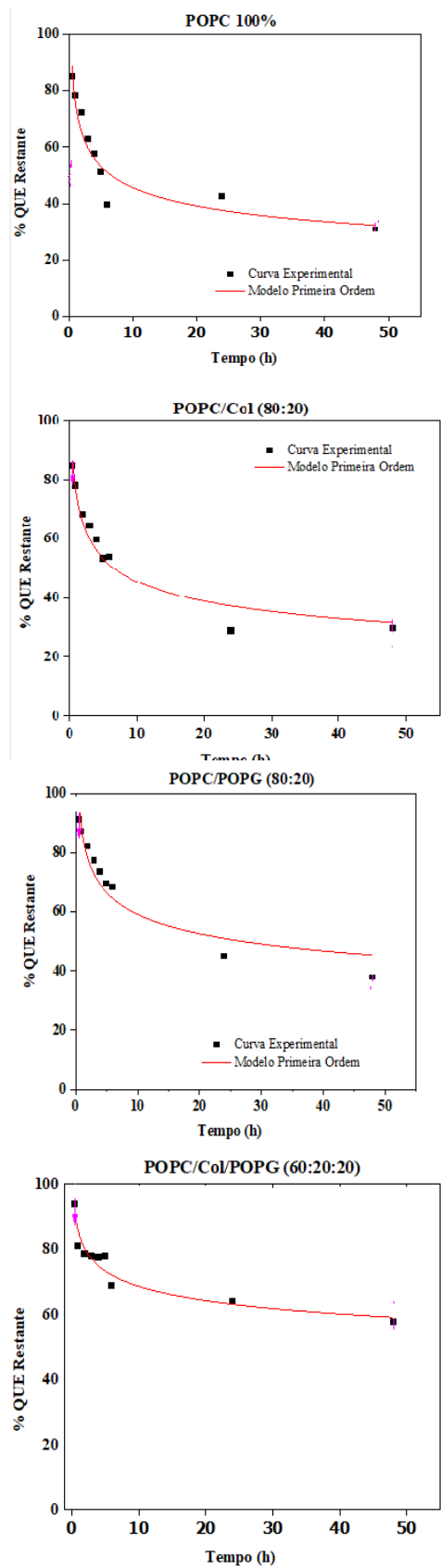


Tabela 8 - Parâmetros obtidos por meio de ajustes lineares para cada modelo matemático Onde, R^2 é o coeficiente de correlação de cada modelo matemático; n é o expoente difusional ou expoente de liberação do fármaco; K_{kp} é a constante de taxa de liberação de K_0 é a constante de taxa de ordem zero; C_0 é a concentração inicial do fármaco no tempo $t=0$; K_1 é a equação da taxa de primeira ordem expressa no tempo⁻¹ ou por hora.

	Korsmeyer-Peppas			Higuchi		Ordem Zero			Primeira Ordem		
	R^2	n % h	K_{kp} % h ⁻¹	R^2	K_H mol L ⁻¹ h ⁻¹	R^2	K_0 % h ⁻¹	C_0 %	R^2	K_1 % h ⁻¹	C_0 %
POPC	0,81	0,25	28,16	0,91	0,03	0,81	0,24	28,16	0,41	0,01	1,38
POPC/ POPG	0,98	0,37	15,27	0,96	0,01	0,97	0,37	15,27	0,54	0,01	1,21
POPC/ Chol	0,93	0,28	26,55	0,92	0,03	0,93	0,27	26,57	0,39	0,01	1,44
POPC/ Chol/P OPG	0,88	0,25	16,27	0,91	0,02	0,87	0,25	16,27	0,62	0,01	1,23

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021

6 CONCLUSÃO

- ✓ Os efeitos de diferentes composições lipídicas para a encapsulamento da quercetina por MLV foram estudados;
- ✓ A afinidade da quercetina para os sistemas lipídicos é dependente da composição lipídica, com coeficientes de partição da ordem de 10^4 ;
- ✓ As formulações MLVs+Que foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico e medições de potencial zeta enquanto as eficiências de encapsulação e liberação foram realizadas via espectrofotometria;
- ✓ A rigidez, imposta por Col, aumentou tanto a homogeneidade da distribuição de tamanho quanto a eficiência de encapsulamento do sistema POPC/Col, possibilitando uma taxa significativa de liberação de quercetina;
- ✓ A presença de carga devido ao POPG resultou em efeitos notáveis, pois modulou o tamanho médio e a distribuição do tamanho da formulação POPC/POPG, bem como resultou em altas eficiências de encapsulamento e liberação;
- ✓ Já a combinação de rigidez e carga na formulação POPC/Col/POPG deu origem ao menor diâmetro médio, maior heterogeneidade na distribuição de tamanho e menor eficiência de liberação;
- ✓ A cinética de liberação de quercetina foi analisada usando modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas e mostrou que o mecanismo de liberação da quercetina é independente da composição lipídica de acordo com a lei de Fick;
- ✓ Alterações na composição lipídica modificam parâmetros importantes, que podem auxiliar no desenvolvimento de novos nanocarregados e microcarregadores.

7. REFERÊNCIAS

3p-instruments. Disponível no site: <https://www.3p-instruments.com/measurement-methods/dynamic-light-scattering/> Acessado dia 13/05/2020

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K. **Liposome**: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. 2013. doi:10.1186/1556-276x-8-102

ALIZADEH, S. R.; ALI EBRAHIMZADEH, M. **O-substituted quercetin derivatives**: Structural classification, drug design, development, and biological activities, a review. *Journal of Molecular Structure*. Volume 1254. 2022.ISSN 0022-2860.2022. doi:10.1016/j.molstruc.2022.132392

ALVARES, D. S.; MONTI, M. R.; RUGGIERO NETO, J.; & WILKE, N. **The antimicrobial peptide Polybia-MP1 differentiates membranes with the hopanoid, diplopterol from those with cholesterol**. *BBA Advances*, 1, 100002. 2021. doi:10.1016/j.bbadv.2021.100002

AMIN, F., & BANO, B. **Damage of cystatin due to ROS-generation and radical-scavenging activity of antioxidants and associated compounds**. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 369–379. 2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.10

APOLINÁRIO A.C.; PACHIONI-VASCONCELOS JA, PESSOA JR A, RANGEL YAGUI CO **Polimerossomos versus lipossomos**: a evolução da “Bala Mágica.” *Química Nova*. 2017. doi: 10.21577/0100-4042.20170054

Arriaga, L. R.; López-Montero, I.; Monroy, F.; Orts-Gil, G.; Farago, B.; & Hellweg, T. **Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases**: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 96(9), 3629–3637. 2009. doi:10.1016/j.bpj.2009.01.045

ATKINS, Peter.; PAULA, Julio de. **Físico - Química**: fundamentos. 5. ed. Rio de Janeiro: Nacional, 2011. 493 p.

AWASTHI, R.; SINGARE, D.; KULKARNI, G.; JINDAL, S. Preparation and in vitro evaluation of Tacrolimus loaded liposomal vesicles by two methods: A comparative study. *Journal of Research in Pharmacy*. 25. 1-1. 10.35333/jrp.2021.292.

BAISHYA H. (2017) **Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets**. *Journal of Developing Drugs*. <http://doi.org/10.4172/2329-6631.1000171>

BANDARA, S.; MOLLEY, T. G.; KIM, H.; BHARATH, P. A.; KILIAN, K.; & LEAL, C. **The structural fate of lipid nanoparticles in the extracellular matrix**. *Materials Horizons*. 2019 doi:10.1039/c9mh00835g

BATISTA C.M.; CARVALHO C.M.B.; MAGALHÃES N.S.S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas**: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C. et al. **Flavonoide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas.** Alim. Nutr.; v.15, p.285-292. 2004

BERBEL MANAIA, E.; PAIVA ABUÇAFY, M.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; LALLO Silva, B.; OSHIRO-JÚNIOR, J. A.; & CHIAVACCI, L. **Physicochemical characterization of drug nanocarriers.** International Journal of Nanomedicine, Volume 12, 4991–5011. 2017. doi:10.2147/ijn.s133832

BHATTACHARYA, S.; HALDAR, S. **Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain–backbone linkage.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1467(1), 39–53. 2000. doi:10.1016/s0005-2736(00)00196-6

BONECHI, C.; DONATI, A.; TAMASI, G.; LEONE, G.; CONSUMI, M.; ROSSI, C. MAGNANI, A. **Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress.** Biophysical Chemistry, 233, 55–63. 2018. doi:10.1016/j.bpc.2017.11.003

CARVALHO, P. M.; FELÍCIO, M. R.; SANTOS, N. C.; GONÇALVES, S.; & DOMINGUES, M. M. **Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development.** Frontiers in Chemistry, 6. 2018. doi:10.3389/fchem.2018.00237

CODEVILLA C.F.; BAZANA M.T.; SILVA C.B.; BARIN J.S.; DE MENEZES C.R. **Nanoestruturas Contendo Compostos Bioativos Extraídos de Plantas.** Ciência e Natura. 2015. doi:10.5902/2179-460X19743

CONQUER, J. A.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; RAGUZZINI, A.; HOLUB, B. J. **Supplementation with Quercetin Markedly Increases Plasma Quercetin Concentration without Effect on Selected Risk Factors for Heart Disease in Healthy Subjects,** The Journal of Nutrition, Volume 128, Issue 3, Pages 593–597, 1998. doi:10.1093/jn/128.3.593

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; MOZAFARI, M. **Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems.** Pharmaceutics, 10(2), 57. 2018. doi:10.3390/pharmaceutics10020057

DE LIMA L.S.; MORTARI M.R. **Therapeutic nanoparticles in the brain: A review of types, physicochemical properties and challenges.** Int J Pharm. 2022 Jan 25;612:121367. 2022. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121367.

DELGADO, J. M. F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa.** Instituto Politécnico de Bragança, 2013

DOURADO JUNIOR, S. M.; NUNES, E. S.; MARQUES, R. P.; ROSSINO, L. S.; QUITES, F. J.; SIQUEIRA, J. R.; & MORETO, J. A. **Controlled release behavior of sulfentrazone herbicide encapsulated in Ca-ALG microparticles: preparation, characterization, mathematical modeling and release tests in field trial weed control.** Journal of Materials Science, 52(16), 9491–9507. 2017. doi:10.1007/s10853-017-1103-9

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica,** Ed. Campus, Rio de Janeiro, 1979.

EPAND, R. M. **Lipid polymorphism and protein–lipid interactions**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376(3), 353–368. 1998. doi:10.1016/s0304-4157(98)00015-x

ESPIRITU, R. A.; CORNELIO, K.; KINOSHITA, M.; MATSUMORI, N.; MURATA, M.; NISHIMURA, S.; et al. **Marine sponge cyclic peptide theonellamide A disrupts lipid bilayer integrity without forming distinct membrane pores**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(6), 1373–1379. 2016. doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.019

FALLER, A. L. K.; & FIALHO, E. **Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil**. *Revista de Saúde Pública*, 43(2), 211–218. 2009. doi:10.1590/s0034-89102009005000010

FALSAFI, S. R.; ROSTAMABADI, H.; BABAZADEH, A.; TARHAN, Ö.; RASHIDINEJAD, A.; BOOSTANI, S.; et al. **Lycopene nanodelivery systems: recent advances**. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 119. 2022. Pages 378-399. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.016>.

FARIA, D. M.; DOURADO JÚNIOR, S. M.; NASCIMENTO, J. P. L. DO, NUNES, E. DA S.; MARQUES, R. P.; ROSSINO, L. S.; & MORETO, J. A. **Development and Evaluation of a Controlled Release System of TBH Herbicide Using Alginate Microparticles**. *Materials Research*, 20(1), 225–235. 2016. doi:10.1590/1980-5373-mr-2016-0443

FATOUROS, D. G.; & ANTIMISIARIS, S. G. **Effect of Amphiphilic Drugs on the Stability and Zeta-Potential of Their Liposome Formulations: A Study with Prednisolone, Diazepam, and Griseofulvin**. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251(2), 271–277. 2002. doi:10.1006/jcis.2002.8432

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. **Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids**. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061–1080. 1995. doi:10.1016/0278-6915(95)00077-1

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; & DEMICHELI, C. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio**. *Química Nova*, 28(3), 511–518. 2005. doi:10.1590/s0100-4042200500030002

GAUTAM, L.; SHRIVASTAVA, P.; YADAV, B.; JAIN, A.; SHARMA, R.; VYAS, Sonal.; VYAS, S.P. Vyas. **Multicompartment systems: A putative carrier for combined drug delivery and targeting**. *Drug Discovery Today*. 2021. doi: 10.1016/j.drudis.2021.12.007

GOÑI, F. M.; ALONSO, A.; BAGATOLLI, L. A.; BROWN, R. E.; MARSH, D.; PRIETO, M.; & THEWALT, J. L. **Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(11-12), 665–684. 2008. doi:10.1016/j.bbalip.2008.09.002

GORBENKO N.I.; BORIKOV O.Y.; KIPRYCH T.V.; IVANOVA O.V.; TARAN K.V.;, LITVINOVA T.S.; **Quercetin improves myocardial redox status in rats with type 2 diabetes**. 2021. doi: 10.1016/j.drudis.2021.12.007

HAGHIRALSADAT, F.; AMOABEDINY, G.; HELDER, M. N.; NADERINEZHAD, S.; SHEIKHHA, M. H.; FOROUZANFAR, T.; & ZANDIEH-DOULABI, B. **A comprehensive**

mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(1), 169–177. 2017. doi:10.1080/21691401.2017.1304403

HENRIKSEN, J.; ROWAT, A. C.; & IPSEN, J. H. **Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity.** *European Biophysics Journal*, 33(8), 732–741. 2004. doi:10.1007/s00249-004-0420-5

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; JANOFF, A. S.; & CULLIS, P. R. **Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 40(2-4), 89–107. 1986. doi:10.1016/0009-3084(86)90065-4

HUANG, M.; SU, E.; ZHENG, F.; & TAN, C. **Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin.** *Food & Function*, 8(9), 3198–3208. 2017. doi:10.1039/c7fo00508c

HUANG, X.; & BRAZEL, C. S. **On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems.** 2001. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 121–136. doi:10.1016/s0168-3659(01)00248-6

HUH, S. Y.; SHIN, J.-W.; NA, J.-I.; HUH, C.-H.; YOUN, S.-W.; & PARK, K.-C. (2010). **Efficacy and safety of liposome-encapsulated 4-n-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: A randomized controlled split-face trial.** *The Journal of Dermatology*, 37(4), 311–315. 2010. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.007

JAIN, A.; & JAIN, S. K. **In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 201, 28–40. 2016. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.10.

JASH A, UBEYITOGULLARI A, RIZVI SSH (2021) **Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances.** *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/d1tb00126d>

JASH, A.; UBEYITOGULLARI, A.; & RIZVI, S. S. H. **Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances.** *Journal of Materials Chemistry B*. 2021. doi:10.1039/d1tb00126d

JEON, S.; YOO, C. Y.; & PARK, S. N. **Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 129, 7–14. 2015. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.018

JOVANOVIĆ, A. A.; BALANČ, B. D.; OTA, A.; AHLIN GRABNAR, P.; DJORDJEVIĆ, V. B.; ŠAVIKIN, K. P.; POKLAR ULRIH, N. **Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics.** *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018. doi:10.1002/ejlt.201800039

KALBASSI M.R.; BEHZADI T.M.; PAKNEJAD H. **Influence of both free and nanoencapsulated quercetin on fatty acid profile of zebrafish (*Danio rerio*) muscle and eggs.** 2021. <http://isfj.ir/article-1-2438-en.html>

KHURSHEED, R.; SINGH, S. K.; WADHWA, S.; GULATI, M.; KAPOOR, B.; JAIN, S. K.; DUA, K. **Development of mushroom polysaccharide and probiotics based solid self-nanoemulsifying drug delivery system loaded with curcumin and quercetin to improve their dissolution rate and permeability: State of the art.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 744–757. 2021. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.170

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; & PEPPAS, N. A. (1983). **Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers.** *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35. doi:10.1016/0378-5173(83)90064

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; & PEPPAS, N. A. **Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers.** *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35. 1983. doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9

KUMAR R, CHOUDHARY DK, DEBNATH M (2020) **Development of BSA conjugated on modified surface of quercetin- loaded lipid nanocarriers for breast cancer treatment.** *Materials Res Express*. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6774>

KUMAR, R.; CHOUDHARY, D. K.; & DEBNATH, M. **Development of BSA conjugated on modified surface of quercetin- loaded lipid nanocarriers for breast cancer treatment.** *Materials Research Express*, 7(1), 015411. 2020. doi:10.1088/2053-1591/ab6774

KUSACZUK, M.; KRETOWSKI, R.; NAUMOWICZ, M.; STYPUŁKOWSKA, A.; CECHOWSKA-PASKO, M. **A Preliminary Study of the Effect of Quercetin on Cytotoxicity, Apoptosis, and Stress Responses in Glioblastoma Cell Lines.** *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1345. doi: 10.3390/ijms23031345

LAWRENCE, S.; ALPAR, H.; MCALLISTER, S.; & BROWN, M. **Liposomal (MLV) Polymyxin B: Physicochemical Characterization and Effect of Surface Charge on Drug Association.** *Journal of Drug Targeting*, 1(4), 303–310. 1993. doi:10.3109/10611869308996088

LEBÈGUE, E.; FARRE, C.; JOSE, C.; SAULNIER, J.; LAGARDE, F.; CHEVALIER, Y.; ... JAFFREZIC-RENAULT, N. **Responsive Polydiacetylene Vesicles for Biosensing Microorganisms.** *Sensors*, 18(2), 599. 2018. doi:10.3390/s18020599

LONG, Q.; XIE, Y.; HUANG, Y.; WU, Q.; ZHANG, H.; XIONG, S.; GONG, C. **Induction of Apoptosis and Inhibition of Angiogenesis by PEGylated Liposomal Quercetin in Both Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Ovarian Cancers.** *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(6), 965–975. 2013. doi:10.1166/jbn.2013.1596

LORBER, B.; FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; & KERN, D. (2012). **Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students.** *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372–382. 2012. doi:10.1002/bmb.20644

LUCHINI, A.; VITIELLO, G. **Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies.** *Biomimetics*, 6(1), 3. 2020. doi:10.3390/biomimetics6010003

MANDIĆ L.; SADŽAK A.; STRASSER V.; BARANOVIĆ G.; DOMAZET JURAŠIN D, DUTOUR SIKIRIĆ M, ŠEGOTA S. (2019) **Enhanced Protection of Biological Membranes during Lipid Peroxidation: Study of the Interactions between Flavonoid Loaded**

Mesoporous Silica Nanoparticles and Model Cell Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20112709>

MANO CM, GUARATINI T, CARDOZO KHM, COLEPICOLO P, BECHARA EJH, BARROS MP. (2018) **Astaxanthin Restrains Nitrate-Oxidative Peroxidation in Mitochondrial-Mimetic Liposomes: A Pre-Apoptosis Model**. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md16040126>

MANO, C., GUARATINI, T., CARDOZO, K., COLEPICOLO, P., BECHARA, E., & BARROS, M. Astaxanthin Restrains Nitrate-Oxidative Peroxidation in Mitochondrial-Mimetic Liposomes: A Pre-Apoptosis Model. *Marine Drugs*, 16(4), 126. 2018. doi:10.3390/md16040126

MORANTE-ZARCERO S.; ENDRINO A.; CASADO N. **Evaluation of mesostructured silica materials with different structures and morphologies as carriers for quercetin and naringin encapsulation**. *Journal of Porous Materials*. 2021. doi:10.1007/s10934-021-01144-7

MOREIRA, T.S.A. **Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização controlada (RAFT) para vetorização biodirigida de tamoxifeno** – Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

MURA, P., MAESTRELLI, F., D'AMBROSIO, M., LUCERI, C., & CIRRI, M. **Evaluation and Comparison of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Vectors to Develop Hydrochlorothiazide Effective and Safe Pediatric Oral Liquid Formulations**. *Pharmaceutics*, 13(4), 437. 2021. doi:10.3390/pharmaceutics13040437

NAQVI, S., PANGHAL, A., & FLORA, S. J. S. **Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs**. *Frontiers in Neuroscience*, 14. 2020. doi:10.3389/fnins.2020.00494

OGUZ M.; DOGAN B.; DURDAGI S.; BHATTI A.; KARAKURT S.; YILMAZ M.; **Investigation of Supramolecular Interaction of Quercetin with p-sulfonated Calix arenes using Molecular Modeling and their In vitro Cytotoxic Response on Selected Cancer Cells**. *New Journal of Chemistry*. 45. 2021. Doi.:10.1039/D1NJ03038H.

OMOLO, C. A., HASSAN, D., DEVNARAIN, N., JAGLAL, Y., MOCKTAR, C., KALHAPURE, R. S., GOVENDER, T. **Formulation of pH responsive multilamellar vesicles for targeted delivery of hydrophilic antibiotics**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 207, 112043. doi:10.1016/j.colsurfb.2021.112043

OWEN, A. E. **Fundamentals of UV-visible spectroscopy**. 1996.

PAMUNUWA, G.; KARUNARATNE, V.; & KARUNARATNE, D. N. **Effect of Lipid Composition on In Vitro Release and Skin Deposition of Curcumin Encapsulated Liposomes**. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/4535790

PAQUET-CÔTÉ, P.-A., TUCK, K. L., PARADIS, J.-P., GRAHAM, B., & VOYER, N. **Modulating the activity of membrane-active peptides through Zn(II) complexation**. *Tetrahedron Letters*, 58(50), 4672–4676. 2017. doi:10.1016/j.tetlet.2017.10.066

PINHEIRO, M., LÚCIO, M., LIMA, J. L., & REIS, S. **Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB.** *Nanomedicine*, 6(8), 1413–1428. 2021. doi:10.2217/nnm.11.122

PINHEIRO, R.G.R.; PINHEIRO, M.; NEVES, A.R. **Nanotechnology Innovations to Enhance the Therapeutic Efficacy of Quercetin.** *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Oct 9;11(10):2658. doi: 10.3390/nano11102658.

PIVETTA, T. P., SILVA, L. B., KAWAKAMI, C. M., ARAUJO, M. M., DEL LAMA, M. P. F. M., NAAL, R. M. Z. G., MARCATO, P. D. **Topical formulation of quercetin encapsulated in natural lipid nanocarriers:** Evaluation of biological properties and phototoxic effect. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101148. 2019. doi:10.1016/j.jddst.2019.101148

RAMLI N., NORA'AINI A., HAMZAH S. **Physicochemical characterization of quercetin-loaded liposomes prepared by sonication for functional food application.** *Journal of Sustainability Science and Management*. 15. 15-27. 2020. Doi:10.46754/jbsd.2020.08.002.

REZAEI-SADABADY, R., EIDI, A., ZARGHAMI, N., & BARZEGAR, A. **Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes.** *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 128–134. 2014. doi:10.3109/21691401.2014.926456

RICCI, M., OLIVA, R., DEL VECCHIO, P., PAOLANTONI, M., MORRESI, A., & SASSI, P. **DMSO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing DPPC liposomes.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(12), 3024–3031. 2016. doi:10.1016/j.bbamem.2016.09.012

RICH, G., BUCHWEITZ, M., WINTERBONE, M., KROON, P., & WILDE, P. Towards an Understanding of the Low Bioavailability of Quercetin: A Study of Its Interaction with Intestinal Lipids. *Nutrients*, 9(2), 111. 2017.doi:10.3390/nu9020111

SAHA, S.; ROY, A.; BAHADUR, S.; CHOUDHURY, A. **Fabrication and in-vitro evaluation of liposomal quercetin and its optimization.** *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 11. 61. 2018. Doi:10.5958/0974-360X.2018.00012.4.

SCHWENDENER, R. A. **Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances.** *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2(6), 159–182. 2014. doi:10.1177/2051013614541440

SCIOLLA, F., TRUZZOLILLO, D., CHAUVEAU, E., TRABALZINI, S., DI MARZIO, L., CARAFA, M., SENNATO, S. (2021). **Influence of drug/lipid interaction on the entrapment efficiency of isoniazid in liposomes for antitubercular therapy: a multi-faced investigation.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112054. 2021. doi:10.1016/j.colsurfb.2021.112054

SHAJI, J.; IYER, S. **Double-loaded liposomes encapsulating Quercetin and Quercetin beta-cyclodextrin complexes:** Preparation, characterization and evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 6(3), 218. 2012. doi:10.4103/0973-8398.104840

SIEPMANN, J. **Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC).** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2-3), 139–157. 2001. doi:10.1016/s0169-409x(01)00112-0

SIEPMANN, J.; FAISANT, N.; BENOIT, J. *Pharmaceutical Research*, 19(12), 1885–1893. 2002. doi:10.1023/a:1021457911533

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. (N.D.). **Microparticles Used as Drug Delivery Systems**. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 15–21. 2006. doi:10.1007/3-540-32702-9_3

SILVA, Aldriano José da. **Desenvolvimento de um leitor digital de absorbância microprocessado**. Dissertação de Mestrado. FFCLRP – Departamento de Física e Matemática – USP. Ribeirão Preto. 2011

SILVA, L.B. **Preparação, caracterização e avaliação do potencial citotóxico in vitro de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com folato encapsulando quercetina em células de câncer de bexiga**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/D.60.2017

SLADE N. B. L., Martins D.B., DOS SANTOS CABRERA M.P. **Quercetin Induces Lipid Domain-Dependent Permeability**. *ChemRxiv*. Cambridge: Cambridge Open Engage. This content is a preprint and has not been peer-reviewed. 2021. doi:10.26434/chemrxiv.14371916.v1

SLADE, N. B. L., 2014. **The Electrostatic and Non-Electrostatic Interactions of Bioactive Peptides with Model Membranes**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2014

SOUZA, S. S. da S.; COSTA, D. C.C. da; SANTOS, C. A. F.; Targino, H.M. de L. **Teor de quercetina de acessos de cebola do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido**. 2013. P. 139-144.

TARAHOVSKY, Y. S., MUZAFAROV, E. N., & KIM, Y. A. **Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 314(1-2), 65–71. 2008. doi:10.1007/s11010-008-9766-9

TONIAZZO T, PERES MS, RAMOS AP, PINHO SC (2017) **Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles**, *Food Bioscience*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.003>

TONIAZZO, T., PERES, M. S., RAMOS, A. P., & PINHO, S. C. **Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles**. *Food Bioscience*, 19, 17–25.2017. doi:10.1016/j.fbio.2017.05.003

US Department of Agriculture. (2018) USDA database for the flavonoid content of selected foods. Beltsville (MD): **US Department of Agriculture**. Disponível em :< <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/80400525/Data/Flav/Flav3.3.pdf> > Acessado dia 17/11/2019

VAN MEER, G., VOELKER, D. R., & FEIGENSON, G. W. **Membrane lipids: where they are and how they behave**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124. 2008. doi:10.1038/nrm2330

VÁŇOVÁ, J., LIIMATTA, L. J., ČESLA, P., & WIEDMER, S. K. **Determination of distribution constants of antioxidants by electrokinetic chromatography.** Cogent Chemistry, 3(1). 2017. doi:10.1080/23312009.2017.1385173

VIEIRA, D. B., & GAMARRA, L. F. **Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment.** Einstein (São Paulo), 14(1), 99–103. 2016. doi:10.1590/s1679-45082016rb3475

Waseem, M.; Kaushik, P.; Dutta, S.; Chakraborty, R.; Hassan, Md I.; Parvez, S. **Modulatory Role of Quercetin in Mitochondrial Dysfunction in Titanium Dioxide Nanoparticle-Induced Hepatotoxicity.** 2022. doi: 10.1021/acsomega.1c04740

WONG, M.-Y., CHIU, G. N. C. **Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 7(6), 834–840. 2011. doi:10.1016/j.nano.2011.02.001

XING, P.; ZHAO, Y. **Supramolecular Vesicles for Stimulus-Responsive Drug Delivery.** Small Methods, 2(4), 1700364. 2018. doi:10.1002/smtd.201700364

Yuan, Z. Chen L.; Fan L.; Tang M.; Yang G.; Yang H. et al. **Liposomal Quercetin Efficiently Suppresses Growth of Solid Tumors in Murine Models.** Clinical Cancer Research, 12(10), 3193–3199. 2006. doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-2365

Zanin, L. M. P., Dos Santos Alvares, D., Juliano, M. A., Pazin, W. M., Ito, A. S., & Ruggiero Neto, J. **Interaction of a synthetic antimicrobial peptide with model membrane by fluorescence spectroscopy.** European Biophysics Journal, 42(11-12), 819–831. 2013. doi:10.1007/s00249-013-0930-0

ZHAO, L., CEN, F., TIAN, F., LI, M.-J., ZHANG, Q., SHEN, H., ... DU, J. **Combination treatment with quercetin and resveratrol attenuates high fat diet-induced obesity and associated inflammation in rats via the AMPK α 1/SIRT1 signaling pathway.** Experimental and Therapeutic Medicine. 2017. doi:10.3892/etm.2017.5331

ZHOU, J., FANG, L., LIAO, J., LI, L., YAO, W., XIONG, Z., & ZHOU, X. **Investigation of the anti-cancer effect of quercetin on HepG2 cells in vivo.** PLOS ONE, 12(3), e0172838. 2017 doi:10.1371/journal.pone.0172838