



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE QUERCETINA E RESVERATROL  
ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS ELÁSTICOS EM CÉLULAS DE LEUCEMIA  
(HL-60)**

Recife

2017

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE QUERCETINA E RESVERATROL  
ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS ELÁSTICOS EM CÉLULAS DE LEUCEMIA  
(HL-60)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), na área de concentração de biotecnologia, na Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Recife

2017

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Pereira, Marcela Araújo**

**Atividade antiproliferativa de quercetina e resveratrol encapsulados em lipossomas elásticos em células de leucemia (HL-60) / Marcela Araújo Pereira- Recife: O Autor, 2017.**

**100 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Nereide Stela dos Santos**

**Coorientador: Pabyton Gonçalves Cadena**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.**

**Inclui referências e apêndice**

**1. Nanotecnologia 2. Lipossomas 3. Química vegetal I. Santos, Nereide Stela dos (orient.) II. Cadena, Pabyton Gonçalves (coorient.) III. Título**

**620.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017- 417**

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE QUERCETINA E RESVERATROL  
ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS ELÁSTICOS EM CÉLULAS DE LEUCEMIA  
(HL-60)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), na área de concentração de biotecnologia, na Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 27 / 02 / 2014

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães – UFPE

(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

(Titular – Membro interno)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana de Souza Rebouças

(Titular – Membro externo)

Aos meus pais, Jaqueline e Sérgio,  
pelo amor, cuidado e dedicação sempre.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de mais essa etapa e por sempre estar guiando os meus passos.

Aos meus pais, Sérgio e Jaqueline, por todo apoio, compreensão, amor e dedicação. Vocês são meus exemplos.

À minha irmã, Daniela, por estar sempre ao meu lado dando suporte e força.

Ao Fernando, você foi quem me sustentou e ergueu durante todos os problemas que me foram impostos.

À minha Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães, pela oportunidade, confiança e por me fazer uma pessoa tão apaixonada pela ciência.

Ao meu Co-orientador, Pabyton Cadena, por todo esforço, dedicação, colaboração, ensinamentos e confiança durante essa pesquisa.

Aos meus amigos, vocês são os irmãos que Deus me permitiu escolher ao longo da vida.

Ao grupo SLC, que antes de tudo, foi e é minha família científica.

Um agradecimento especial à Rafa e Milena, vocês foram minha força e orientação.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami (LIKA), por todo suporte e colaboração na realização do projeto.

À Profa. Teresinha, Jaciana, Maria e Nelson, vocês foram os anjos que iluminaram esse projeto.

À Profa. Adriana, por todo o esforço que foi empenhado e confiança o trabalho.

À Paulo, você é uma pessoa ímpar e contribuiu de forma significativa a este trabalho.  
Agradeço por todo o empenho, dedicação e carinho que você teve comigo.

Ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O primeiro passo para a vitória é a vontade de  
vencer”

(Mahatma Gandhi )

## RESUMO

Fitoquímicos são compostos naturais oriundos de vegetais. Estes são conhecidos por apresentarem inúmeras atividades farmacológicas. Dois grupos importantes pertencentes a esta classe são os flavonoides e os polifenóis. O flavonoide quercetina (QUE) e o polifenol resveratrol (RES) têm sido diretamente associados com efeitos anticancerígenos, a partir de sua atividade antioxidante. Sua utilização na terapêutica ainda é limitada devido à baixa solubilidade aquosa, o que leva a uma baixa biodisponibilidade. Uma alternativa capaz de superar estas limitações é a utilização da nanotecnologia farmacêutica, a partir da incorporação de sistemas de liberação controlada de fármacos como os lipossomas (Lipo), que são vesículas esféricas compostas por uma bicamada de fosfolídeos que têm como vantagem a alta biocompatibilidade. No presente estudo, visamos à avaliação da eficácia de lipossomas elásticos de desoxicolato de sódio contendo QUE e RES nanoencapsulados a partir da sua atividade antioxidante, que foi determinada pelo método de ABTS [2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) sal diamônio], quantificação do conteúdo de peroxidação lipídica pelo método de TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico) e avaliação da atividade antiproliferativa destes compostos a partir da viabilidade celular através do método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolína) e elucidação do mecanismo de morte celular pela marcação com os corantes anexina e iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Os líofilos de QUE/RES-Lipo permaneceram estáveis durante 300 dias, sem variação significativa ( $p < 0,05$ ) no índice de polidispersão, com eficiência de encapsulação maior que 87%. Os estudos de atividade antioxidante mostraram que, na mesma concentração, QUE teve uma maior atividade (TEAC  $1091.93 \pm 15,4 \mu\text{M}$ ), em relação ao RES (TEAC  $867.98 \pm 31.75 \mu\text{M}$ ). QUE/RES-Lipo aumentou a atividade antioxidante em 12% comparado a QUE/RES livre, reduziu o conteúdo de peroxidação lipídica em 56%, além de apresentar a melhor atividade antiproliferativa reduzindo a viabilidade celular em 81%, com uma redução de 25% na  $\text{IC}_{50}$  em relação a QUE/RES livre. Quanto ao mecanismo de morte celular, foi verificado que QUE e RES agem por apoptose e a formulação QUE/RES-Lipo apresentou 81,8% de morte celular, com um aumento de 60% em relação aos fármacos livres. Desta forma, baseado nos resultados, podemos concluir que a formulação lipossomal elástica contendo QUE e RES nanoencapsulados teve boa atividade contra a linhagem HL-60. Atualmente, outros estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados para melhorar a eficácia e atividade da formulação.

**Palavras-chave:** *Quercetina, Resveratrol, Liposomas, HL-60.*

## ABSTRACT

Phytochemicals are natural compounds found in plants. They have numerous pharmacological activities. Two important groups belonging to this class are flavonoids and polyphenols. The flavonoid quercetin (QUE) and the polyphenol resveratrol (RES) have been directly associated with anticancer effects, from its antioxidant activity. Their use in therapy is still limited due to the low aqueous solubility, which leads to a low bioavailability. An alternative capable of overcoming these limitations is the use of pharmaceutical nanotechnology, from the incorporation of drug controlled release systems like liposomes (Lipo), which are spherical vesicles composed of a bilayer of phospholipids which have the advantage of high biocompatibility. In the present study, we aimed to evaluate the effectiveness of sodium deoxycholate elastic liposomes containing QUE and RES nanoencapsulated from its antioxidant activity, which was determined by ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) salt diammonium] method, content of lipid peroxidation by TBARS (thiobarbituric acid reactive species) method and antiproliferative activity of these compounds from the cell viability through MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay and elucidation of the cell death mechanism with dyes Annexin and propidium iodide marking by flow cytometry. The lyophilized QUE/RES-Lipo remained stable during 300 days without significant variation ( $p < 0.05$ ) in polydispersity index, with encapsulation efficiency higher than 87%. The antioxidant activity studies showed that, at the same concentration, QUE had greater activity (TEAC  $1091.93 \pm 15.4 \mu\text{M}$ ), comparing to RES (TEAC  $867.98 \pm 31.75 \mu\text{M}$ ). QUE/RES-Lipo increased antioxidant activity in 12% compared to free QUE/RES, reduced the content of lipid peroxidation in 56%, in addition, had the best antiproliferative activity, reducing cell viability in 81%, with a reduction of 25% on  $\text{IC}_{50}$ . As mechanism of cell death, it was verified that QUE and RES act by apoptosis and the QUE/RES-Lipo showed 81.8% of cell death, with an increase of 60% in relation to free drugs. Based on the results, we can conclude that the liposomal formulation containing QUE and RES nanoencapsulated had good activity against HL-60 cell line. Currently, *in vitro* and *in vivo* studies are being conducted to enhance the effectiveness and activity of the formulation.

**Keywords:** *Quercetin, resveratrol, liposomes, HL-60.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<u>FIGURA</u>	<u>LEGENDA</u>	<u>PÁGINA</u>
Figura 1	Estrutura geral dos flavonoides .....	18
Figura 2	Estrutura dos flavonoides. A. Fórmula estrutural dos flavonoides. B. O estado de oxidação e saturação define os subgrupos dos flavonoides .....	20
Figura 3	Estrutura química da molécula de quercetina .....	22
Figura 4	Sequências de reações indicando a formação de espécies quinonas para a quercetina dependente do meio e pH .....	23
Figura 5	Estrutura química da molécula de resveratrol .....	26
Figura 6	Estrutura química da molécula do ácido desoxicólico .....	29
Figura 7	Estrutura química da molécula do desoxicolato de sódio .....	30
Figura 8	Vias de apoptose .....	31
Figura 9	Farmacocinética de um fármaco tradicional (a) e de um sistema de liberação controlada (b) .....	33
Figura 10	Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de Micropartículas: microesferas (matriz polimérica) e microcápsulas (cápsulas com parede polimérica e cavidade oca ou aquosa) .....	34
Figura 11	Características estruturais dos lipossomas .....	36
Figura 12	Tipos de lipossomas dependendo do tamanho e número de lamelas .....	37
Figura 13	Destino dos lipossomas convencionais por via endovenosa.....	38
Figura 14	Propriedades físico-químicas do QUE / RES-Lipo liofilizado em armazenamento a $25 \pm 5$ ° C na presença de umidade e luz durante 300 dias: A. Tamanho médio da vesícula (nm); B. índice	

	de polidispersão; C. Conteúdo de drogas (%); D. Eficiência de encapsulação de medicamentos (%). .....	43
Figura 15	O efeito do pH na carga superficial (potencial zeta) dos lipossomas.....	44
Figura 16	Curva padrão Trolox (A) e equivalente trolox ( $\mu\text{M}$ ) de quercetina e de resveratrol (B) em diferentes concentrações usando o método ABTS .....	45
Figura 17	Atividade antioxidante de QUE e RES puro e encapsulado em lipossomas. Foram utilizados QUE/RES-Lipo (Lyo QUE/RES-Lipo) liofilizados durante 550 dias após redispersão em água deionizada.....	46
Figura 18	Peroxidação lipídica de formulações lipossomais. O teor de peroxidação lipídica foi avaliado utilizando o método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com valores expressos em equivalentes de MDA (nmol).....	47
Figura 19	Viabilidade de células HL-60 tratadas com QUE e RES, como compostos individuais ou carregadas em lipossomas. As células foram incubadas com compostos em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{M}$ ) durante 72 h. A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico MTT.....	48
Figura 20	Apoptose e necrose induzidas por QUE e RES, livres ou carregadas em lipossomas elásticos em células de leucemia HL-60 usando análise citotrométrica de fluxo de anexina V-FITC e IP coradas. Células não tratadas (controle) ou tratadas com QUE/RES e QUE/RES-Lipo na concentração de 200 $\mu\text{M}$ . A porcentagem de células apoptóticas foi calculada pelo software BD Accuri C6.....	50

## LISTA DE TABELAS

<u>TABELA</u>	<u>LEGENDA</u>	<u>PÁGINA</u>
Tabela 1	Classificação dos flavonoides de acordo com sua fórmula estrutural .....	19
Tabela 2	Diferenças morfológicas entre as células com apoptose e necrose	32
Tabela 3	A atividade antiproliferativa, expressa como IC <sub>50</sub> , de QUE/RES-lipossomas em células HL-60 em comparação com compostos puros.....	49

## SUMÁRIO

1. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	15
2. <u>OBJETIVOS</u> .....	17
2.1.GERAL.....	17
2.2.ESPECÍFICOS.....	17
3. <u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</u> .....	18
3.1.FLAVONÓIDES.....	18
3.2.QUERCETINA.....	22
3.3.RESVERATROL.....	25
3.4.DESOXICOLATE DE SÓDIO E ÁCIDO DESOXICÓLICO.....	29
3.5.MORTE CELULAR.....	30
3.6.NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	32
3.6.1. LIPOSSOMAS.....	34
4. <u>METODOLOGIA</u> .....	39
4.1.REAGENTES.....	39
4.2.PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO QUERCETINA E RESVERATROL ENCAPSULADOS.....	39
4.3.ESTABILIDADE A LONGO PRAZO.....	40

4.4.EFEITO DO pH NA CARGA SUPERFICIAL DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE /RES ENCAPSULADOS.....	40
4.5.PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS.....	40
4.6.ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS.....	41
4.7.CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS.....	41
4.8.MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	42
5. <u>RESULTADOS</u> .....	42
5.1.ESTABILIDADE A LONGO PRAZO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS.....	42
5.2.EFEITO DO pH NA CARGA SUPERFICIAL DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE /RES ENCAPSULADOS.....	43
5.3.ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS.....	44
5.4.PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS.....	46
5.5.CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS.....	47
5.6.MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	49
6. <u>DISCUSSÃO</u> .....	50

7. <u>CONCLUSÕES</u> .....	55
8. <u>REFERÊNCIAS</u> .....	57
<u>APÊNDICE A: ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS</u> .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais e extratos de plantas é a forma mais antiga e mais difundida de medicação. Um desses grupos de plantas são os fitoquímicos que são conhecidos por exercer atividade anticancerígena, em parte com base na sua atividade antioxidante (RAFTER, 2002). Fitoquímicos também podem interferir em vias de sinalização intracelulares, tais como aquelas que regulam a proliferação, indução de apoptose e a resposta ao stress oxidativo (Roy et al., 2003). Um composto bioativo importante bastante difundido na dieta humana é a quercetina (7,3,5,3',4'-pentahidroxi-flavona) (QUE), um flavonoide encontrado em vegetais, frutas e plantas que tem inúmeras atividades biológicas devido à sua capacidade para inibir as enzimas, que atuam como antioxidantes, e regulam a resposta imunitária (WANG, 2013).

Numerosos estudos têm relatado os efeitos antiproliferativos da quercetina em uma variedade de linhas celulares cancerígenas, incluindo glioma (BRAGANHOL et al., 2006); Osteosarcoma (XIE et al., 2010); câncer cervical (VIDYA PRIYADARSINI ET AL., 2010); câncer de próstata (HSIEH e WU, 2009), câncer de mama (CHOI et al., 2008); leucemia mielóide (DURAJ et al., 2005) e câncer de cavidade oral (KANG et al., 2010).

Outro composto bioativo amplamente reconhecido por suas atividades farmacológicas é o resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (RES), uma fitoalexina encontrada em várias frutas que têm sido associados com efeitos anticancerígenos. A citotoxicidade do resveratrol também está relacionada à sua atividade antioxidante (ATHAR et al., 2007). Resveratrol pode inibir o crescimento e induzir a apoptose em células de melanoma (HSIEH et al., 2005); câncer de mama (SCARLATTI et al., 2003); câncer de estômago (ATTEN et al., 2005), câncer de pulmão (KIMURA e OKUDA, 2001); câncer de próstata (GAO et al., 2004); neuroblastoma (Nicolini et al., 200); hepatoma (MICHELS et al., 2006); fibrosarcoma (MOUSA et al., 2005); câncer pancreático (MOURIA et al., 2002) e leucemia (SU et al., 2005).

Mertens - Talcott e Percival (2005) verificaram efeito sinérgico quercetina e resveratrol no ciclo celular, foi observado um aumento na porcentagem de células na fase G0/G1 em 12 h, e em uma parada na fase S após 24 h, com reforçada apoptose mediada por caspase-3, em células de leucemia (HL-60). Apesar do seu potencial clínico, a utilização de QUE e RES na terapia farmacêutica ainda é limitada devido à baixa solubilidade em água e, conseqüente baixa biodisponibilidade (LI et al., 2013).

Neste quadro, uma alternativa para superar estas limitações é a utilização de sistemas nanoestruturados de liberação de fármaco, tais como lipossomas, que são vesículas biocompatíveis e versáteis, compostas por uma camada dupla de fosfolipídios que podem encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Entre eles, temos os lipossomas elásticos, que são vesículas com uma maior capacidade de deformação. Os compostos que podem conferir elasticidade aos lipossomas convencionais são os surfactantes, tais como o desoxicolato de sódio (SDC) (CEVC E BLUME, 2001). SDC é um sal biliar extensivamente estudado como um potenciador de permeação das membranas biológicas (PAUL et al.,1998).

Nosso estudo anterior estabeleceu formulações estáveis de nanoliposomas SDC-elásticos contendo QUE e RES encapsulados na bicamada de fosfolipídios (CADENA et al., 2013). No presente estudo, avaliamos a estabilidade dos lipossomas a partir da estabilidade de armazenamento, a atividade antioxidante e os níveis de peroxidação lipídica. O mecanismo anti-proliferativo em células de leucemia promielocítica humana (HL-60) foi investigado por citometria de fluxo. Nosso objetivo é avaliar se a associação de QUE e RES, como compostos individuais ou carregado em lipossomas elásticos, pode ser mais eficaz na atividade antiproliferativa do que estes flavonóides como compostos individuais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a atividade antiproliferativa de lipossomas elásticos contendo quercetina e resveratrol nanoencapsulados em células de leucemia (HL-60).

### 2.2. ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar a estabilidade do líófilo da formulação lipossomal contendo quercetina e resveratrol por um período de 1 ano;

2.2.2. Determinar a estabilidade das formulações lipossomais de acordo com a variação de pH;

2.2.3. Quantificar a atividade antioxidante da quercetina e resveratrol livres e encapsulados em lipossomas elásticos;

2.2.4. Determinar os níveis de peroxidação lipídica das diferentes formulações lipossomais;

2.2.5. Avaliar a atividade antiproliferativa das formulações lipossomais em linhagem celular HL-60;

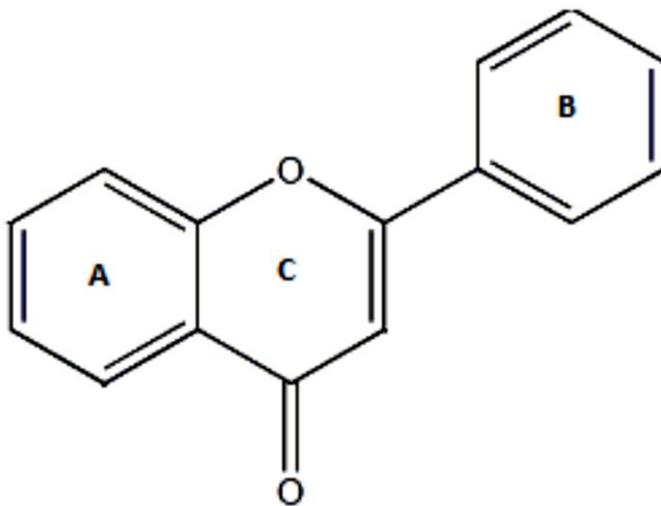
2.2.6. Verificar o mecanismo de morte celular induzidos pelos flavonoides.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. FLAVONOIDES

Flavonoides englobam inúmeras estruturas químicas e constituem uma importante classe de polifenóis. São conhecidos por serem metabólitos secundários comumente distribuídos entre frutas, legumes, nozes, sementes, flores e cascas, sendo parte integrante da dieta humana. Estão classificados como compostos naturais derivados do anel benzo- $\gamma$ -pirona, possuem baixo peso molecular e englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1993). Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis benzeno conectados por um anel pirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figura 1) (MOT et al., 2014). A figura 1 aborda a estrutura geral dos flavonoides e o sistema de numeração utilizado para distinguir as posições de carbono em torno da molécula. Os três anéis fenólicos são referidos como A, B, e C (ou pirano) (COOK e SAMMAN, 1995).

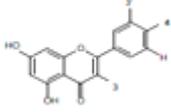
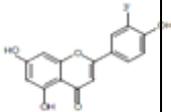
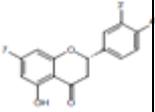
Figura 1 - Estrutura geral dos flavonoides.



Fonte: (COOK e SAMMAN, 1995).

Estes compostos podem ser classificados em diversos subgrupos baseado na presença de ligações duplas, grupos hidroxil, metil, glicosídeos e diferentes posições das moléculas. As principais classes são flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, diidroflavonois e chalconas (Tabela 1) (KO et al., 2014). Estas mudanças na estrutura química e orientação da molécula são importantes, pois determinam o tipo de atividade bioquímica que o determinado flavonoide apresentará.

Tabela 1 - Classificação dos flavonoides de acordo com sua fórmula estrutural

Classe de Flavonoide	Fórmula estrutural	Composto	3'	4'	3	7	Plantas
Flavonol		Quercetina	OH	OH	OH	-	Casca de cebola Espinheiros do mar Cenoura Casca de cebola <i>Saururus chinensis</i> <i>Saururus chinensis</i>
		Isohamnetina	O-CH <sub>3</sub>	OH	OH	-	
		Kaempferol	H	OH	OH	-	
		Espiraeosídeo	OH	O-	O-	-	
		Quercitrina	OH	glicose	ramnose	-	
		Isoquercetrina	OH	OH	O-glicose	-	
Flavona		Apigenina	H	-	-	-	Salsa Cenoura
		Luteonina	OH	-	-	-	
Flavonona		Narigenina	H	-	-	OH	Toranja Limão Toranja Toranja Laranja Toranja
		Hesperetina	OH	-	-	OH	
		Narirutina	H	-	-	O-	
		Narigina	H	-	-	rutinosí	
		Hesperedina	OH	-	-	deo O- neoespe ridose O- rutnosíd eo	

Fonte: Tabela modificada de KO et al., 2014.

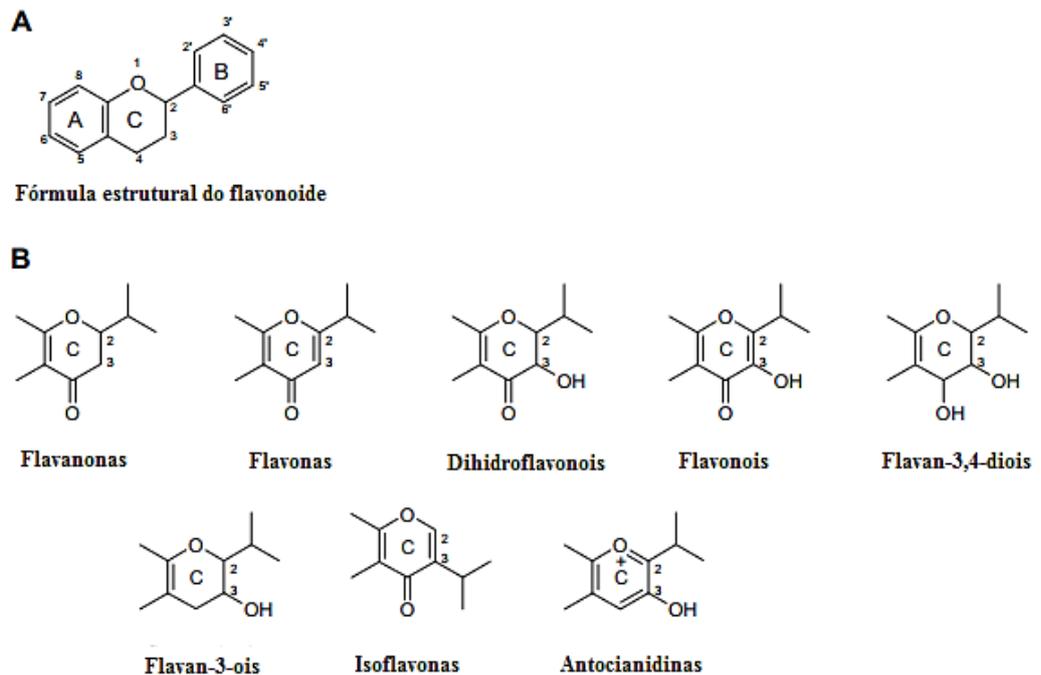
Os flavonoides que contêm um grupo hidroxila na posição C-3 do anel C são classificados com 3-hidroxiflavonoides (flavonóis, antocianidinas, leucoantocianidinas, e as catequinas), e aqueles que não têm o grupo hidroxila são classificados como 3-desoxiflavonoides (flavanonas e flavonas). A classificação dentro das duas famílias é baseada em como os grupos hidroxila ou metila são adicionados em diferentes posições da molécula (Figura 2). Os isoflavonoides diferem dos outros grupos, pois o anel B está ligado à posição C-3 do anel C, ao invés de C-2. As antocianidinas e catequinas, por outro lado, não possuem o grupo carbonila em C-4 (KUHNAU, 1976).

Muitos flavonoides estão presentes e ocorrem naturalmente na forma de glicosídeos em plantas, e quando ingeridos, são hidrolisados pelas bactérias presentes na flora bacteriana, revelando suas formas biologicamente ativas, forma aglicona. As formas agliconas (flavonoides sem açúcar) ocorrem com menor frequência. Pelo menos oito monossacáridos ou combinações destes diferentes (di ou trissacarídeos) podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxila da forma aglicona. O grande número de flavonoides é um resultado das muitas combinações diferentes

de flavonoides agliconas e esses açúcares. As porções mais comuns de açúcar incluem d-glicose e l-ramnose. Os glicósidos são geralmente O-glicosidos, com a porção de açúcar ligado ao grupo hidroxilo na posição C-3 ou C-7 (WILLIAMS et al., 1994).

O metabolismo dos flavonoides ocorre principalmente no lúmen gastrointestinal, células da parede do intestino e fígado e é de suma importância, pois afeta a atividade biológica do flavonoide e a sua capacidade de agir nas células. Uma característica destes compostos é que eles aparecem como ácido glucurônico e conjugados de sulfato na corrente sanguínea (ERLUND, 2004).

Figura 2 - Estrutura dos flavonoides. **A.** Fórmula estrutural dos flavonoides. **B.** O estado de oxidação e saturação define os subgrupos dos flavonoides.



Fonte: Figura modificada de MARTENS et al., 2010.

O interesse dos pesquisadores pelos flavonoides surgiu nos anos 90 e desde então só tem crescido devido ao seu largo espectro de atividades biológicas e farmacológicas (ERLUND, 2004). São conhecidos por serem potentes antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (ANGELIS, 2005) e têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças como diabetes mellitus, alergias, úlceras pépticas, terapias anti-câncer (LINK et al. 2010), neuroprotetores (PRIPREM et al., 2008), cardioprotetores (YANG et al., 2008), antivirais, hepatoprotetores (SU et al., 2003) e nefroprotetores (SHOSKES et al., 1998).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonoides. Tais mecanismos incluem: a) opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela reação de Fenton ou Harber-Weis; c) sequestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes (PIETTA, 2000).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos é o uso de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade. Contudo, há divergências quanto ao seu uso, pois, acredita-se que os antioxidantes reduziram a eficiência dos tratamentos radio e quimioterápicos (WEIJ et al., 1997). Há evidências de que os antioxidantes podem ser uma boa escolha na intervenção terapêutica junto à quimioterapia por auxiliar na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (DRISKO et al., 2003).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e majoritários são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres (DECKER, 1997). Diferentes flavonoides podem atuar em vários níveis do processo cancerígeno. Se o dano ao DNA causar a mutação dos genes implicados na morte e proliferação celular, que é a causa do câncer, a sua prevenção é possível quando esta mutação é prevenida. Assim, os flavonoides poderiam inibir a carcinogênese química (geração de radicais livres endógenos, radiação ultravioleta e raio-X) e biológica (bactéria *Helicobacter pylori* causadora da úlcera estomacal, e associada ao desenvolvimento de câncer no estômago; e alguns vírus) (LÓPEZ-LÁZARO et al., 2002).

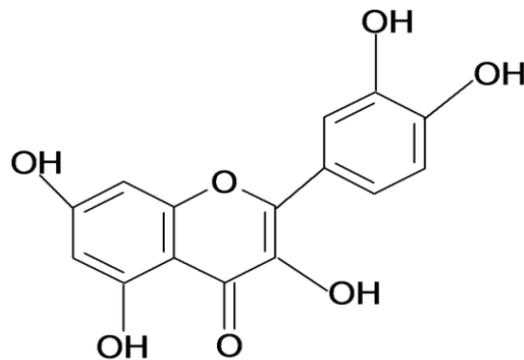
Também foi visto na literatura que os flavonoides têm ação anticancerígena. O câncer pode ser considerado uma doença genética causada pela aquisição sequencial de mutações em genes implicados na proliferação e morte celular. O dano causado ao DNA pode resultar de processos endógenos como erros na duplicação do DNA e instabilidade química em certas bases do DNA ou de interações com agentes exógenos como radiação ionizante e ultravioleta, agentes químicos e biológicos como os vírus (LÓPEZ-LÁZARO, 2002). É uma síndrome que envolve

em geral, as etapas de iniciação, promoção e progressão. Diversos trabalhos têm visado o estabelecimento da associação entre a ingestão e os níveis séricos de certos nutrientes e o risco de câncer (FLAGG et al., 1995; ZIEGLER et al., 1996).

### 3.2. QUERCETINA

A Quercetina, (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) (QUE), é um flavonoide pertencente a uma extensa classe de compostos polifenólicos presente nas plantas, e está representada na Figura 3.

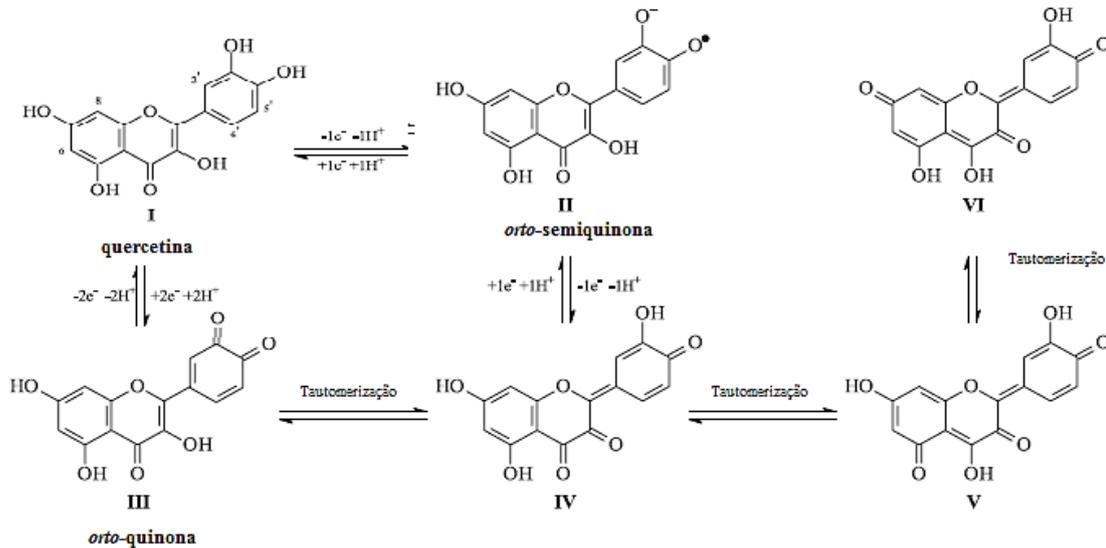
Figura 3 - Estrutura química da molécula de quercetina.



Fonte: PEREIRA M.A., 2014

Apresenta-se como um pó amarelo-alaranjado, com fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$  e peso molecular de 302,24 g/mol para a forma anidra e de 338,27 g/mol para a forma diidratada. Ela torna-se anidra na faixa de temperatura de 93 a 97 °C e decompõe-se a 314 °C. Em relação à solubilidade, este composto é praticamente insolúvel em água (cerca de 0,30-0,70 µg/mL), sendo mais solúvel em etanol a frio (3,45 µg/mL) e a quente (43,48 µg/mL) (BUDAVARI, 1996); possui um pKa de 6,74 (ARSHAD et al., 2009). Esta molécula sofre auto-oxidação em soluções orgânicas ou em meio aquoso. A auto-oxidação é dependente do pH e da solução tampão utilizadas, assim como da presença de oxidantes, e está relacionada com a dissociação dos grupos OH das moléculas, levando a um aumento do pH da solução. A quercetina se encontra na forma neutra ou catiônica em pH menores que 5, neutra ou de monovalente em pH 5 e na forma mono ou bivalentes em pH 7,5 (Figura 4) (MOMIC et al., 2007).

Figura 4 - Sequências de reações indicando a formação de espécies quinonas para a quercetina dependente do meio e pH.



Fonte: Modificado de TIMBOLA et al., 2006.

Uma das razões do sucesso da quercetina, provavelmente, é pelo fato de possuir uma maior biodisponibilidade em relação aos outros fitoquímicos. Ela representa o flavonol mais abundante encontrado na dieta humana, com uma ingestão diária, estimada em 5 – 40 mg/dia por indivíduos que consomem grandes quantidades de frutas, vegetais, legumes e bebidas ricas em flavonoides, como exemplo as maçãs, cebolas e tomates (HERTOG et al., 1995). Em função do seu interesse químico e propriedades biológicas, é um dos flavonoides mais estudados. (LEOPOLDINI et al., 2011).

A quercetina presente nas frutas e vegetais não se apresenta na forma aglicona (sem grupos de açúcares), e sim, na forma glicosilada. A explicação bioquímica para a alta biodisponibilidade da quercetina glicosilada é, em grande parte, pelo processo de deglicosilação realizado pelas bactérias da flora intestinal, e após a absorção, a quercetina é metabolizada em diferentes órgãos como intestino, colón, rim e fígado. Sua absorção é influenciada pela presença da microflora (BOOTS, HAENEN & BAST, 2008; MANACH et al., 2004).

Boots e colaboradores (2004) verificaram em seus estudos que o tempo de meia vida da quercetina e de seus metabólitos é de 11 a 28 horas, o que sugere a possibilidade de um aumento significativo nas concentrações plasmáticas após aplicação contínua. Durante um estudo de dois anos conduzido pelo NTP (National Toxicology Program), ratos machos F344/N alimentados com 2 g/kg peso corporal/dia de quercetina (correspondente a uma dose de 140 g para um

indivíduo de 70 kg), apresentaram nefropatia crônica grave, hiperplasia e neoplasias de células epiteliais dos túbulos renais. Em doses mais baixas, a partir de 50 a 500 mg/kg/dia, nenhum efeito adverso foi relatado (HARWOOD et al., 2007). Uma dose oral única de 4 g de quercetina não foi associada com efeitos colaterais em humanos. Doses intravenosas de 100 mg de quercetina foram aparentemente bem toleradas. Porém, doses de 2,5 g em um adulto de aproximadamente 70 kg, uma vez por semana, durante três semanas, foram associadas a toxicidade renal em dois dos dez pacientes (FERRY et al., 1996).

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil, por quelar íons de ferro, e na peroxidação lipídica, por reagir com radicais peroxi de lipídeos (AFANAS'EV et al., 1989).

A quercetina pode regular o ciclo celular, interagir com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais. Adicionalmente, a quercetina inibe a atividade da tirosina quinase. As etapas de iniciação e promoção do melanoma foram bloqueadas quando a quercetina foi administrada 30 min antes da aplicação do indutor 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), em ratos. Por bloquear a promoção deste tumor, a quercetina foi considerada como um efetivo agente preventivo (WU et al., 1998).

Knekt e colaboradores (2002) encontraram uma relação inversa entre o consumo de flavonoides e a incidência de câncer pulmonar, em homens e mulheres acima de 20 anos de idade, sendo que a quercetina representava cerca de 95% do consumo total de flavonoides neste estudo.

O interesse clínico pela quercetina tem aumentado por causa de seus efeitos em doenças cardiovasculares, observados em populações com uma dieta rica em flavonoides. Estudos epidemiológicos demonstraram uma correlação inversa entre morte por doenças cardiovasculares (DCV) e consumo moderado de bebidas alcoólicas. O aumento sérico da lipoproteína de alta densidade (HDL), nestes indivíduos, indica que o consumo moderado de bebida alcoólica é o responsável por este efeito protetor. Como exemplo, tem-se os flavonoides do vinho tinto implicados na proteção contra doenças cardiovasculares devido à diminuição da concentração sérica de LDL (HERTOG et al., 2002) e inibição da agregação plaquetária. O possível mecanismo pelo qual os flavonoides mantêm a integridade vascular tem conduzido aos

estudos sobre o sequestro de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, atividades da lipogenase, da ciclooxigenase e da fosfolipase A2. Os flavonoides também inibem a oxidação da LDL, a agregação plaquetária e a atividade da proteína quinase C e promovem vasodilatação (FORMICA et al., 1995).

Tan et al., (2003) verificaram que a quercetina inibe importantes passos da angiogênese *in vitro*, incluindo a proliferação, migração e formação tubular das células do endotélio, e *in vivo*, ela exerce atividade antiangiogênica. Todos esses efeitos são dose-dependentes.

Como compostos naturais presentes abundantemente na nutrição humana, os flavonoides são uma classe de substâncias com potencial atividade nefroprotetora. Estudo *in vitro* demonstrou que a quercetina leva a um aumento significativo da sobrevivência celular quando há falência renal induzida, sendo o resultado dose-dependente (AHLENSTIEL et al., 2003). Estudos comprovaram que a ingestão oral de quercetina pode proteger o fígado contra a falência induzida por isquemia-reperfusão, pela melhora da capacidade antioxidativa hepática (SU et al., 2003).

Rayalam et al (2008) estudaram o mecanismo de ação de QUE sobre pré-adipócitos. Foi observado um decréscimo do potencial de membrana pela redução da regulação de poli (ADP-Ribose) polimerase, bcl-2 e ativação da caspase-3, iniciando assim um processo de apoptose. QUE também induziu a lipólise em adipócitos, pois é potente inibidora de fosfodiesterase, uma enzima que hidrolisa o AMPc com consequente inativação da proteína quinase. Devido à inibição da atividade da fosfodiesterase há um aumento da lipólise no adipócito.

Numerosos estudos têm relatado os efeitos antiproliferativos da quercetina em uma variedade de linhagens celulares cancerígenas, incluindo glioma (BRAGANHOL et al., 2006), osteosarcoma (XIE et al., 2010), câncer cervical (VIDYA PRIYADARSINI ET AL., 2010), câncer de próstata (HSIEH e WU, 2009), câncer de mama (CHOI et al., 2008), leucemia mielóide (DURAJ et al., 2005) e câncer de cavidade oral (KANG et al., 2010).

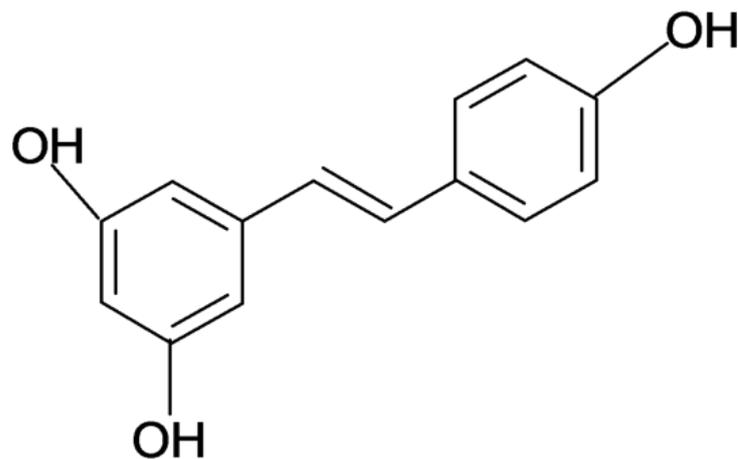
### 3.3. RESVERATROL

O resveratrol (5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol) é uma fitoalexina polifenólica que é sintetizada a partir de seus precursores, a p-cumaroil coenzima e a malonil coenzima, numa proporção de um para três. A malonil coenzima deriva de uma combinação

das unidades de acetil coenzima formado a partir da fenilalanina que, em plantas, pode ser sintetizada a partir de açúcares pela via do ácido chiquimico. Através da perda de um grupo amina pela desaminação oxidativa catalizada por uma enzima específica, a fenilalanina amônia biase, a fenilalanina é convertida em ácido cinâmico que é hidroxilado enzimaticamente ao ácido p-cumárico; na etapa final, a p-cumaroil coenzima é formada a partir de coenzimas livres por uma coenzima ligase. A condensação da p-cumaroil coenzima com três moléculas de malonil coenzima é realizada pela atividade da estilbeno sintetase ou resveratrol sintetase, resultando na formação do resveratrol da videira. Quatro moléculas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) são formadas para cada mol de resveratrol sintetizado (FREGONI, 1999).

O resveratrol apresenta fórmula molecular de C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> (Figura 5), peso molecular de 228,24. Possui pKa de 9,3 e é pouco solúvel em água (água: 0,03 g/L, DMSO: 16 g/L, álcool: 50 g/L) (ALLAN et al., 2009) e encontra-se em 72 espécies vegetais (distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias), porém é encontrada em poucos alimentos destinados ao consumo humano, dentre eles destacam-se a uva (*Vitis vinífera L.*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (TREVISAN, 2003) e é produzido em resposta ao estresse como um mecanismo de defesa contra infecções fúngicas, virais, bacterianas e danos da exposição à radiação ultravioleta (CADDEO et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura química da molécula de resveratrol.



Fonte: PEREIRA M.A., 2014

Os benefícios potenciais do resveratrol dependem, em parte, da sua absorção, biodisponibilidade e metabolismo. Recentemente, vários estudos examinaram a absorção do resveratrol *in vivo*, onde foi observado que pelo menos 70% dele é absorvido em humanos após doses orais; no entanto, só foi possível rastrear traços de compostos derivados do resveratrol no plasma. Existe uma grande variação quando se trata da absorção e biodisponibilidade do RES, porém estas não são afetadas pelo tipo de refeição ou pela quantidade de lipídios presentes na

alimentação. Após a administração oral de resveratrol puro em seres humanos, o glicuronídeo foi o metabólito principal detectado no plasma e urina. (MENG et al., 2004).

RES foi primeiramente isolado das raízes do heléboro branco (planta *Veratum grandiflorum*) em 1940, e mais tarde em 1963 das raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa. Inicialmente, sendo apenas caracterizada como uma fitoalexina, o resveratrol atraiu pouca atenção até 1992, quando foi postulado como explicação para alguns dos efeitos cardioprotetores do vinho tinto. Desde então, vários trabalhos foram feitos com o resveratrol, que demonstrou prevenir ou diminuir a progressão de algumas doenças, como o câncer, doenças cardiovasculares e isquêmicas, assim como aumentar a resistência ao estresse e a longevidade de vários organismos, de leveduras e vertebrados (BAUR e SINCLAIR, 2006).

Jang et al. (1997) publicaram um artigo reportando a capacidade do resveratrol em inibir a carcinogênese em várias fases. Os mesmos autores descobriram que a aplicação tópica de resveratrol reduziu o número de tumores de pele em ratos, em até 98%. O composto foi identificado com base em sua capacidade de inibir a atividade da ciclo-oxigenase (COX-1) que se correlaciona com a promoção do antitumor.

Outro mecanismo pelo qual o resveratrol pode combater a formação de tumores é pela inibição do ciclo celular e apoptose. Os efeitos do resveratrol anti-proliferativo e pro-apoptótico no tumor de linhagens celulares foram extensivamente documentados in vitro (AGGARWAL et al., 2004) e são suportados pela regulação de proteínas do ciclo celular e aumento da apoptose. Uma explicação mais precisa para esta ação seria através da sensibilização de células tumorais pelo fator de necrose tumoral (TNF), relacionado à indução de apoptose através do ligante - TRAIL (FULDA e DEBATIN, 2004) ou por mecanismos que envolvem a modulação de ciclinas, regulação da p16 e p53 e rotas mediadas por PKC (CHEN et al., 2004; SHIH et al., 2004; ZHANG. et al., 2006).

Também conhecido pelos seus efeitos cardioprotetores, o resveratrol é uma das explicações para o “paradoxo francês”, termo criado para relacionar a alimentação dos franceses rica em gorduras saturadas com o índice relativamente baixo de doenças coronarianas, justificado pelo alto consumo de vinho tinto (RENAUD e GUEGUEN, 1998). A agregação excessiva ou inadequada de plaquetas pode levar à formação de trombos e subsequentes bloqueios nos vasos sanguíneos que resultam em isquemia transitória, infarto do

miocárdio ou acidente vascular cerebral. Curiosamente, o resveratrol impede a agregação plaquetária *in vitro* (BERTELLI et al., 1995) através do seu efeito protetor sobre a inibição da COX-1 e da subsequente atividade da COX-2, porque o equilíbrio de prostaglandinas sintetizadas pelas duas isoformas regula a homeostase vascular (BAUR e SINCLAIR, 2006).

Compostos fenólicos presentes no vinho tinto elucidam atividade antioxidante e evitam a oxidação de LDL. O resveratrol é relatado como um dos mais potentes antioxidantes contra Eros (Espécies reativas do oxigênio) e essa sua atividade pode também estar associada com a proteção contra a progressão da aterosclerose, já que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um evento importante no desenvolvimento desta doença (KING et al., 2006). Na verdade, ele mostrou ser mais potente que outros flavonóides em prevenir a oxidação catalisada por cobre e como o LDL têm alta afinidade com o cobre, esta atividade de quelação impede a modificação oxidativa do LDL (SAIKO et al., 2008). Além disso, devido ao seu caráter lipofílico, o resveratrol é capaz de se ligar às partículas de lipoproteína, o que acentua essa atividade antioxidante (BELGUENDOZ et al. 1998).

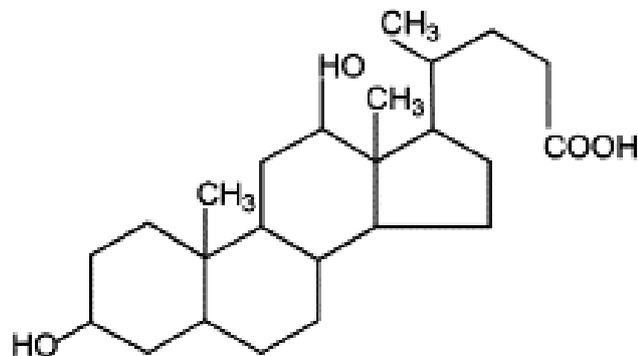
O RES é um dos principais nutrientes da longevidade que pode simular os efeitos de restrição de calorias que inclui expansão da vida útil, aprimoramento do tecido patológico, aumento da resistência, biogênese mitocondrial, gasto de energia, sensibilidade à insulina e diminuição do acúmulo de gordura, entre outros (DAS et al., 2010). Bauer et al. (2006) mostraram pela primeira vez que o resveratrol poderia estender a vida útil em mamíferos. Neste estudo, foi concluído que dietas com alto teor calórico (60% de calorias de gordura) induz obesidade, provocando a resposta inflamatória e comorbidades, tais como diabetes e aterosclerose, diminuindo o tempo de vida em caso de ratos com meia-idade, mas o tratamento com resveratrol (22,4 mg/kg/dia) ao longo da dieta prorroga o período de vida pela indução da sirtuína (Sirt1).

A citotoxicidade do resveratrol também está relacionada à sua atividade antioxidante (ATHAR et al., 2007). Resveratrol pode inibir o crescimento e induzir a apoptose em células de melanoma (HSIEH et al., 2005), câncer de mama (SCARLATTI et al., 2003), câncer gástrico (ATTEN et al., 2005), câncer de pulmão (KIMURA e OKUDA, 2001); câncer de próstata (GAO et al., 2004), neuroblastoma (CHEN et al., 2011), hepatoma (MICHELS et al., 2006), fibrosarcoma (MOUSA et al., 2005), câncer de pâncreas (MOURIA et al., 2002) e leucemia (SU et al., 2005).

### 3.4. DESOXICOLATO DE SÓDIO E ÁCIDO DESOXICÓLICO

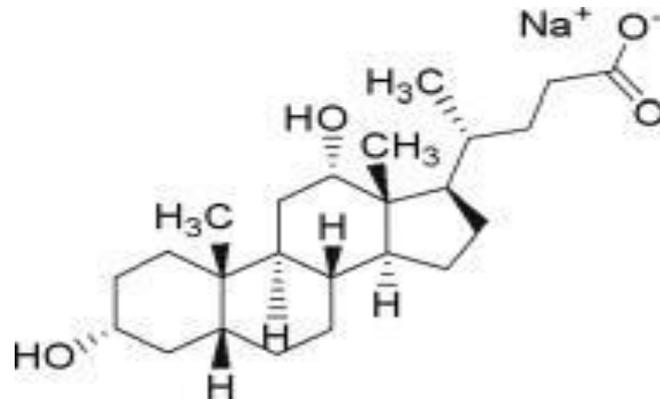
O ácido desoxicólico (DCA) é um ácido biliar natural de origem secundária, constituído de formas conjugadas do ácido cólico (Figura 6), e quando apresentado na forma de sal de sódio, é chamado de desoxicolato de sódio (Figura 7), tem boa capacidade de permeação, e é amplamente investigada no campo da nanotecnologia. Ácidos biliares são esteroides anfifílicos que foram extensivamente estudados como intensificadores de permeabilidade de várias membranas biológicas (LALIC-POPOVIC et al., 2013).

Figura 6 - Estrutura química da molécula do ácido desoxicólico.



Fonte: Figura modificada de GAO et al., 2008.

Figura 7 - Estrutura química da molécula do desoxicolato de sódio.



Fonte: WU et al., 2013.

Este é utilizado na indústria farmacêutica para o tratamento de em disfunções hepáticas, mas é mais utilizado como surfactante.

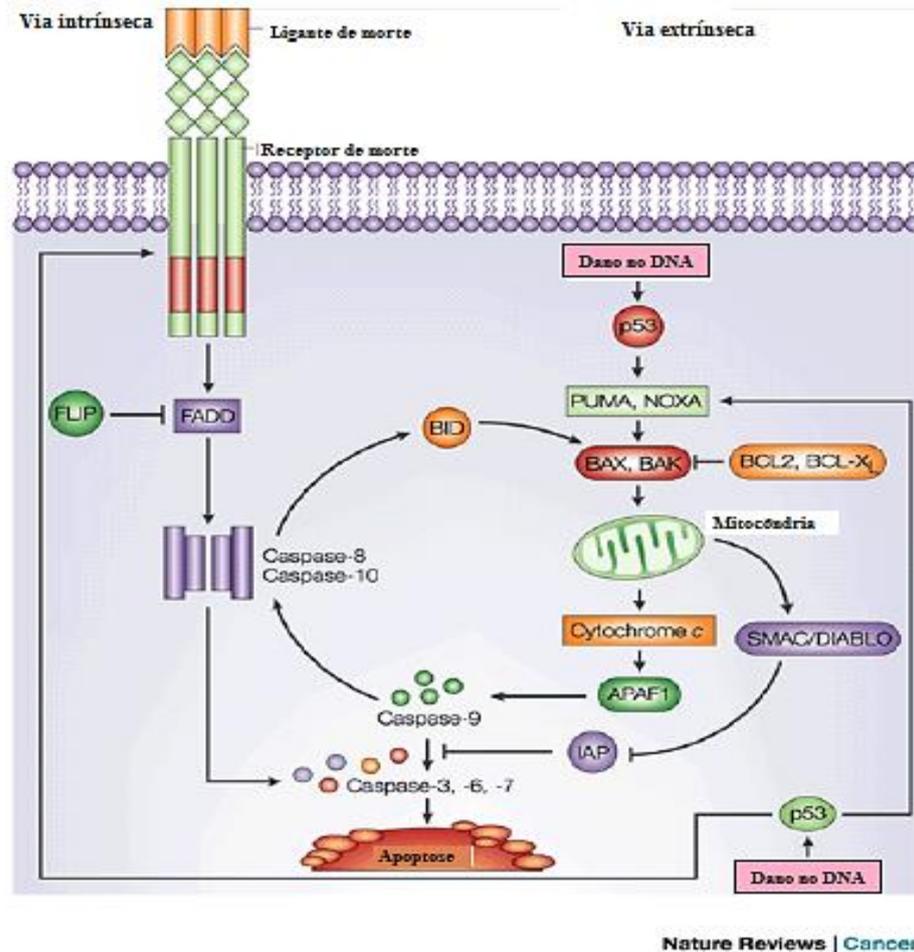
Os surfactantes possuem propriedades químicas polares e apolares que facilitam a emulsificação de substâncias insolúveis pela redução da tensão superficial na sua interface, e devido a estas características, os sais biliares são compostos capazes de aumentar a solubilidade e permeabilidade (ROTUNDA et al., 2004).

### 3.5. MORTE CELULAR

A morte celular é uma resposta à lesão celular, a qual chega a um nível em que os danos causados as células são irreversíveis. Os tipos de morte celular são caracterizados em três tipos apoptose, necrose e autofagia, de acordo com NNCD (*The nomenclature committee on cell death*) (KROEMER et al., 2009).

O processo apoptótico é disparado frente a lesões no DNA da célula causadas por agentes físicos, químicos, biológicos e outros. A Figura 8 descreve o processo os diferentes processos de ativação da apoptose. Ao entrar em apoptose, a célula pode apresentar como características marcantes do processo de morte celular programada a condensação da cromatina, retração celular (redução do tamanho da célula), fragmentação do DNA, perda do volume celular, citoplasma denso, organelas compactadas, formação de blebs (prolongamentos da membrana celular), aumento do tamanho e número dos blebs com a formação dos corpos apoptóticos, que serão fagocitados pelos macrófagos sem a presença de um fenômeno inflamatório (ELMORE, 2007).

Figura 8 - Vias da apoptose. Via extrínseca (lado esquerdo) e via intrínseca (lado direito)



Fonte: Figura modificada de ASHKENAZI, 2002.

A necrose é caracterizada pelo extravasamento do material intracelular e são observados danos às organelas como mitocôndrias e retículos. Com o início deste processo, ocorre a ruptura dos lisossomos, dando início a uma resposta inflamatória local, decorrente das citocinas, resultantes de uma exposição exacerbada ao agente tóxico (YAKOVLEV, FADEN, 2004).

O processo necrótico difere-se da apoptose pelo fato deste resultar na morte imediata das células, sem que a mesma possa se rearranjar para a fagocitose. A necrose ocorre quando há falha na regulação do equilíbrio (homeostasia), depois que a célula sofre danos irreparáveis (SCHUKTZ; HARRINGTON; 2003). A célula que se encontra em necrose sofre um aumento no seu tamanho, o que causa aumento da fragilidade da membrana celular, resultando no aumento da permeabilidade e posterior rompimento da membrana (SCHULTZ, HARRINGTON, 2003). Na tabela 2 são apresentadas características que diferem as células em apoptose e necrose.

Tabela 2: Diferenças morfológicas entre as células com apoptose e necrose.

MORFOLOGIA APOPTOSE	MORFOLOGIA NECROSE
Retração da célula	Aumento celular
Conteúdo celular íntegro	Vazamento do conteúdo celular
Liberação do citocromo c pela mitocôndria	Destruição das organelas
Fragmentação do DNA em pares de base múltiplos de 180	Fragmentação do DNA em pares de bases aleatórios
Formação de corpos apoptóticos para fagocitose	Formação de detritos (nem todos são fagocitados)
Processo não-inflamatório	Processo inflamatório

Fonte: Tabela adaptada de McHUGH; TURINA, 2006.

Já a morte celular por autofagia geralmente ocorre quando a célula se apresenta em situação de depleção de nutrientes, na qual, a mesma degrada seus componentes celulares através do mecanismo lisossômico, visando gerar energia à célula. São observados também vacúolos, indicando a presença de membranas neste processo (KLIONSKY, 2000).

### 3.6. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

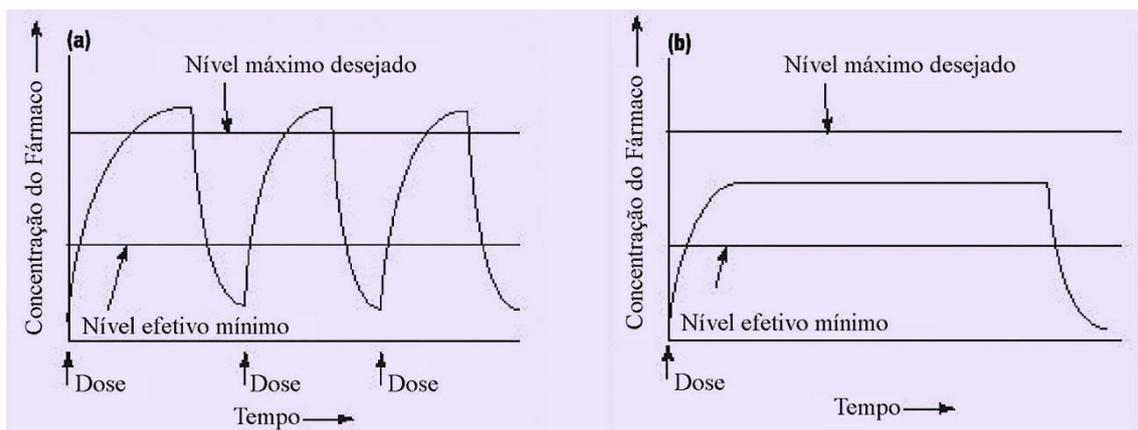
A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas que está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica. Esta tecnologia surgiu nos anos 1960 com o desenvolvimento inicialmente da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pó com tamanho das partículas em escala micrométrica. A microencapsulação é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis, o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhoria da biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas e nanovesículas (PIMENTEL et al., 2007).

Os sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, dentre elas destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); a diminuição

expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítiospecificidade); a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos; a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (TORCHILIN, 2012; PIMENTEL et al., 2007).

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (AZEVEDO, 2002). A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada está descrita na Figura 9.

Figura 9 - Farmacocinética de um fármaco tradicional (a) e de um sistema de liberação controlada (b).



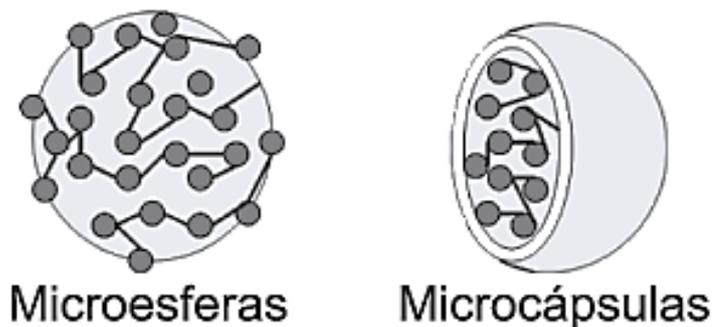
Fonte: Modificado de LOW et al., 2001

A descoberta dos lipossomas nos anos 1960 veio aumentar a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica com sistemas lipídicos para vetorização de fármacos. Atualmente são desenvolvidos nanossistemas, tais como lipossomas

e nanopartículas, e microsistemas, como micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões (SILVA, 2004).

Micropartículas são partículas poliméricas esféricas matriciais (microesferas) ou reservatórios (microcápsulas) (Figura 10), que promovem a liberação controlada de fármacos ou substâncias biologicamente ativas hidrofílicas (AHSAN et al., 2002) ou hidrofóbicas (RIBEIRO-COSTA et al., 2004). O processo de microencapsulação possui larga aplicação industrial e para desenvolvimento de novas formas farmacêuticas devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (MANDAL et al., 2001; VANDENBERG et al., 2001; YOUAN et al., 2001).

Figura 10 - Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de Micropartículas: microesferas (matriz polimérica) e microcápsulas (cápsulas com parede polimérica e cavidade oca ou aquosa).



Fonte: PIMENTEL et al., 2007.

Já as nanocápsulas são sistemas coloidais vesiculares de tamanho nanométrico, em que o fármaco está confinado em uma cavidade oca ou oleosa, estabilizada por membrana polimérica (LEGRAND et al., 1999; BRIGGER et al., 2002). As nanocápsulas são utilizadas para vetorização de fármacos hidrofóbicos, que são incorporados na cavidade interna oleosa (SANTOS et al., 2005).

### 3.6.1. LIPOSSOMAS

Lipossomas ou vesículas fosfolipídicas, são sistemas coloidais que ocorrem naturalmente e podem ser preparados artificialmente, como mostrado por Bangham e seus alunos em meados da década de 1960. No início, eles foram usados para estudar as membranas biológicas e nas várias aplicações práticas, mais notavelmente como carreadores de fármacos

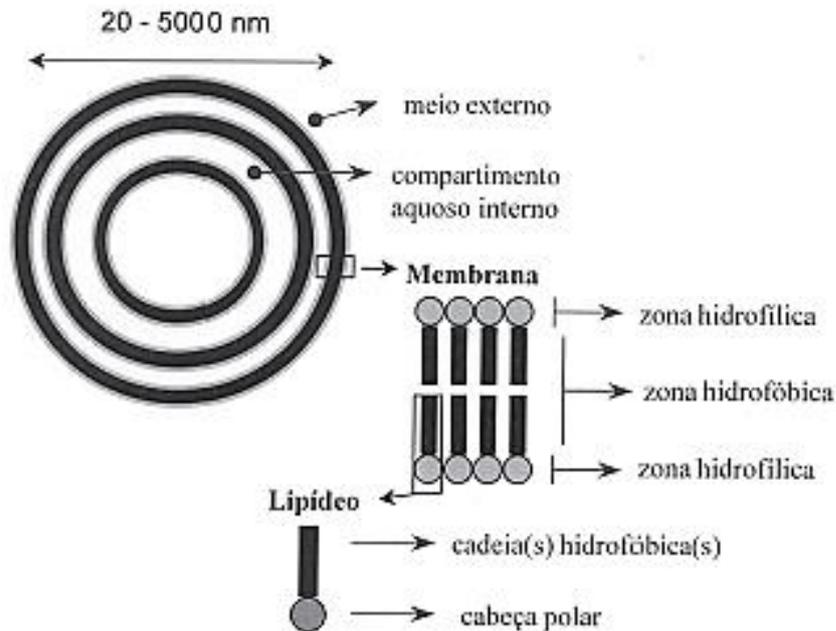
(GREGORIADIS, 1990). Hoje, eles são muito aplicados como modelo e ferramenta em várias disciplinas científicas, como Biofísica nas propriedades de membranas celulares e canais; Química, na catálise e energia de conversão; Bioquímica, na função de proteínas de membrana e em Biologia, na função celular e no tráfego, sinalização e excreção da célula (LASIC, 1998).

Essas vesículas são constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. Uma grande vantagem dos lipossomas, com relação a outros sistemas transportadores de fármacos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais (GREGORIADIS, 1985). Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (TORCHILIN, 2005). Além disso, os lipossomas são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (Figura 11) (FRÉZARD, 2005; BATISTA, 2007).

Segundo Torchilin (2005) as principais atividades biológicas dos lipossomas são:

- Aumentar a biocompatibilidade;
- Carregar fármacos hidrofílicos em seus compartimentos internos (FA) e fármacos hidrofóbicos nas membranas (FO);
- Proteger os fármacos da inativação pelo meio externo e evitar reações colaterais indesejáveis;
- Oferecer liberação de produtos farmacêuticos em células ou dentro de compartimentos celulares individuais;
- Versatilidade, pois podem alterar o tamanho, carga e propriedades de superfície simplesmente por adicionar novos compostos na preparação de lipossomas e/ou por variação de métodos de preparação.

Figura 11 - Características estruturais dos lipossomas.



Fonte: FRÉZARD et al, 2005.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho, o número de bicamadas e pelo método de preparação, não muito utilizado. O tamanho dos lipossomas pode variar desde vesículas muito pequenas (25 nm) a grandes (2500 nm). Além disso, eles podem conter uma única bicamada lipídica ou múltiplas bicamadas em torno do compartimento aquoso interno. Sendo assim, surgem três tipos de lipossomas classificados da seguinte forma (Figura 12) segundo SHARMA e SHARMA (1997):

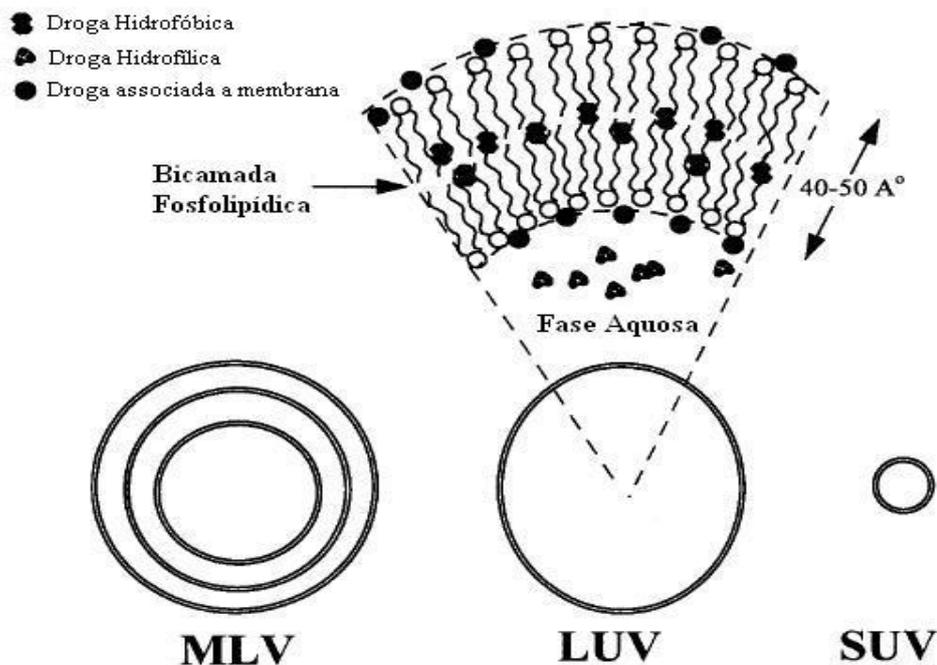
- Lipossomas multilamelares (*Multilamellar Vesicles* - MLV): são os lipossomas formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Proporcionam maior encapsulamento de substâncias lipofílicas e são mais estáveis por longo tempo de estocagem. Seu diâmetro é variável de acordo com o número de lamelas, podendo ir de 400 a 3500 nm.

- Lipossomas pequenos unilamelares (*Small Unilamellar Vesicles* - SUV): São os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, constituídos por apenas uma bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso. São termodinamicamente instáveis, susceptíveis a agregação e fusão. Seu diâmetro varia de 20 a 200 nm.

- Lipossomas grandes unilamelares (*Large Unilamellar Vesicles* - LUV): São também constituídos por apenas uma bicamada, com uma grande cavidade aquosa, útil para fármacos hidrofílicos. Seu diâmetro varia de 200 a 1000 nm.

O tamanho do lipossoma é um dos principais parâmetros que determinam a fração capturada pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). Pequenos lipossomas (< 100 nm) são opsonizados mais lentamente e a uma menor extensão, quando comparados com lipossomas grandes (> 100 nm). Essas particularidades também servem para determinar a meia-vida do lipossoma na circulação, e podem influenciar no grau de encapsulamento da droga (SHARMA e SHARMA, 1997).

Figura 12 - Tipos de lipossomas dependendo do tamanho e número de lamelas.



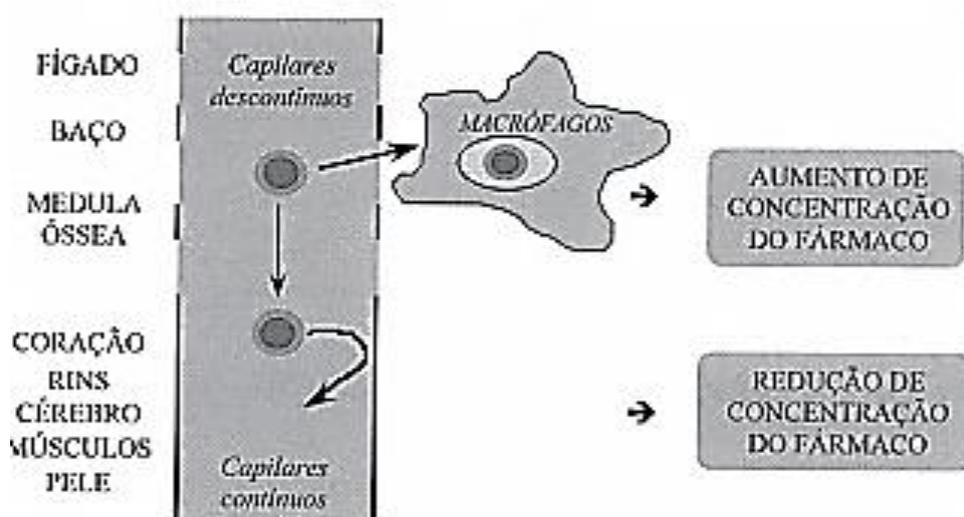
Fonte: Modificado de SHARMA e SHARMA, 1997.

Os fármacos de interesse podem ser incorporados tanto no compartimento aquoso (substâncias hidrossolúveis), quanto na membrana dos lipossomas (substâncias lipofílicas ou anfifílicas) e dois parâmetros importantes devem ser levados em consideração quanto à eficácia dos lipossomas. Esses parâmetros são a taxa de encapsulação do fármaco e a relação fármaco/massa lipídica. Esses parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana (quantidade de lipídeo utilizada). A taxa de encapsulação deverá ser maximizada, pois é inversamente relacionada à

quantidade de substância não encapsulada que é perdida na maioria das vezes. A relação fármaco/massa lipídica deverá também ser maximizada, visto que determina a quantidade de lipídeo a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lipídeo veiculada, menor serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (FRÉZARD et al, 2005).

Os lipossomas convencionais (formados de fosfatidilcolina ou de surfactantes não-iônicos e de colesterol), quando encontrados na circulação, são naturalmente capturados pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, principalmente do fígado, do baço e da medula óssea (Figura 13). Portanto, a administração de fármacos na forma encapsulada nesses lipossomas resulta no aumento de sua concentração nesses órgãos, assim como na redução da concentração em órgãos apresentando capilares contínuos. A captura celular dos lipossomas é favorecida pelo processo de opsonização, que ocorre assim que os lipossomas entram em contato com os componentes do sangue. Depois da fagocitose, os lipossomas são degradados pelas fosfolipases lisossomais e a substância é liberada nos fagolisossomas, podendo se difundir para o citossol ou ser excretada para o meio extracelular. A velocidade de liberação do princípio ativo pode ser controlada pela manipulação tanto da composição da membrana (influenciando a velocidade de degradação dos lipossomas), quanto do tamanho dos lipossomas (influenciando a eficiência de captura pelos macrófagos) (FRÉZARD et al, 2005).

Figura 13 - Destino dos lipossomas convencionais por via endovenosa.



Fonte: FRÉZARD et al, 2005.

Assim, lipossomas pequenos serão capturados com menor eficiência pelos macrófagos do que lipossomas grandes, estes lipossomas pequenos permanecerão mais tempo na circulação

sanguínea e apresentarão uma liberação mais prolongada. Na década de 90, verificou-se que o destino *in vivo* dos lipossomas poderia ser controlado através da manipulação de suas características de superfície. Foi observado que a incorporação na membrana dos lipossomas de lipídeos acoplados a polímeros de etilenoglicol altera suas interações com as células, sendo o efeito mais importante o impedimento da captura pelos macrófagos e a prolongação de sua presença na circulação. Em consequência, este tipo de lipossomas, chamado de “lipossomas furtivo”, promove uma presença prolongada da substância no organismo, aumenta a distribuição para outros órgãos, além daqueles do sistema mononuclear fagocitário. Esses lipossomas podem ainda ser direcionados para determinados tipos celulares, via receptores ou ligantes específicos, através do acoplamento de anticorpo ou ligante na extremidade do polímero (FRÉZARD et al, 2005; TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas possuem inúmeras aplicações, pois se mostram como uma alternativa para superar as limitações da aplicação direta dos fármacos e ajudar na sua permanência no tecido alvo. Algumas delas são: tratamento de leishmanioses (FRÉZARD et al, 2005), tratamento de esquistossomose (FRÉZARD et al, 2005), tratamento da malária (PIMENTEL et al., 2007), tratamento de diferentes tipos de câncer, vacinas, terapia genética (LASIC, 1998), tratamento de lipomas, lipodistrofia, obesidade e gordura localizada (YANG et al., 2008), ação neuroprotetora (PRIPREM et al., 2008), ação cardioprotetora, entre outras.

#### 4. METODOLOGIA

##### 4.1. REAGENTES

A Quercetina (QUE), resveratrol (RES), desoxicolato de sódio (SDC), colesterol (CH), ABTS, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico (TBA), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido), trealose e Annexin-V-FITC/PI foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A fosfatidilcolina de soja (PC) (98% de Epikuron 200) foi obtida da Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Alemanha). Solventes orgânicos e outros produtos químicos foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

##### 4.2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUERCETINA E RESVERATROL

Os lipossomas elásticos de SDC que contêm QUE e RES encapsulados (Lipo vazio, QUE-Lipo, RES-Lipo e QUE/RES-Lipo) foram preparados usando o método de hidratação do

filme lipídico, descrito anteriormente por Cadena et al. (2013). Para estudos de estabilidade a longo prazo, os lipossomas liofilizados foram obtidos utilizando-se trealose (10% p / v) como crioprotetor. Após a preparação, os lipossomas foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e submetidos à liofilização (EZ-DRY, FTSS System, New York, EUA) a 200 bar por 48 h.

#### 4.3. ESTABILIDADE A LONGO PRAZO

A estabilidade de armazenamento dos lipossomas liofilizados em presença de umidade, luminosidade e variação de temperatura ( $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) foi avaliada. Após a reconstituição com água deionizada, as amostras foram analisadas por medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta ( $\zeta$  mV) e eficiência de encapsulação (EE%) durante 300 dias de armazenamento. O tamanho de partícula e PDI dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons padrão (analisador de partículas Delsa <sup>TM</sup> NanoS, Beckman-Coulter). O potencial zeta dos lipossomas foi medido usando o zetasizer Malvern 3000HSA. A eficiência de encapsulação de medicamentos foi determinada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação usando unidades Ultrafree® (Millipore, EUA, corte de MW = 10 000 Da). Após centrifugação das amostras (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japão) a 8776 g durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , os conteúdos de QUE e RES no sobrenadante foram quantificados de acordo com Cadena et al. (2013).

#### 4.4. EFEITO DO pH NA CARGA SUPERFICIAL DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS

A titulação de formulações lipossomais foi realizada com variação de pH de 8,0 a 3,0 usando um zetasizer Malvern 3000HSA associado ao autotitulado MPT-1. As amostras de lipossomas (200  $\mu\text{L}$ ) foram diluídas com 10 ml de água desionizada e o pH foi ajustado automaticamente por titulação com HCl 1 M, HCl 0,25 M e NaOH 0,25 M. Em valores de pH predefinidos variando de 8.0 a 3.0, o potencial zeta dos lipossomas foi analisado.

#### 4.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

A peroxidação lipídica de lipossomas foi avaliada utilizando o método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito anteriormente (Draper & Handley, 1990). Uma alíquota das formulações lipossomais (400 µL) foi adicionada a ácido tiobarbitúrico 0,67%, p / v e foi aquecida num banho de água a ferver durante 1 h. O TBARS foi determinado a 532 nm e a quantidade de equivalente de MDA (nmol) foi calculada usando uma curva padrão de tetrametoxipropano (TMP) variando de 0,2 a 0,7 nmol.

#### 4.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS

A atividade antioxidante de QUE, RES, a sua combinação (QUE/RES) e todas as formulações lipossomais (Lipo vazio, QUE-Lipo, RES-Lipo e QUE/RES-Lipo) foram determinadas utilizando o radical ABTS\*. O método baseia-se na capacidade de um antioxidante para reduzir ABTS\* em sua forma incolor (Lucas-Abellán et al., 2011). Para a geração ABTS \* a partir de sal ABTS, reagiu 3 mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> com 8 mM de sal ABTS em água destilada, durante 16 h a temperatura ambiente no escuro. A solução ABTS\* foi então diluída com etanol para obter uma absorbância inicial de 0,7 a 734 nm, utilizando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 pro UV-Vis. A solução de ABTS\* foi preparada todos os dias. As habilidades antioxidantes foram expressas como equivalentes de Trolox µM usando uma curva de calibração Trolox preparada para uma faixa de concentração de 100 a 2000 µM. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### 4.7. CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS

A citotoxicidade de QUE/RES-lipossomas foi avaliada em células HL-60 usando o método MTT. As células foram semeadas (10<sup>5</sup> células/poço) em microplacas de 96 poços. Os compostos de teste (6,25 a 200 µM) dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço e incubados durante 72 h a 37 ° C. Em seguida, adicionou-se MTT (5,0 mg/mL) à placa e a citotoxicidade dos compostos de teste foi estimada pela capacidade de células vivas para reduzir o amarelo de tetrazólio a um produto de formazan azul (Nunes et al., 2012). Após 3 h, o produto de formazan foi dissolvido em DMSO e a absorbância foi medida utilizando um leitor de placas. O efeito antiproliferativo dos compostos de teste foi quantificado como a porcentagem de absorbância de controle de corante reduzido a 560 nm.

#### 4.8. MECANISMO DE MORTE CELULAR

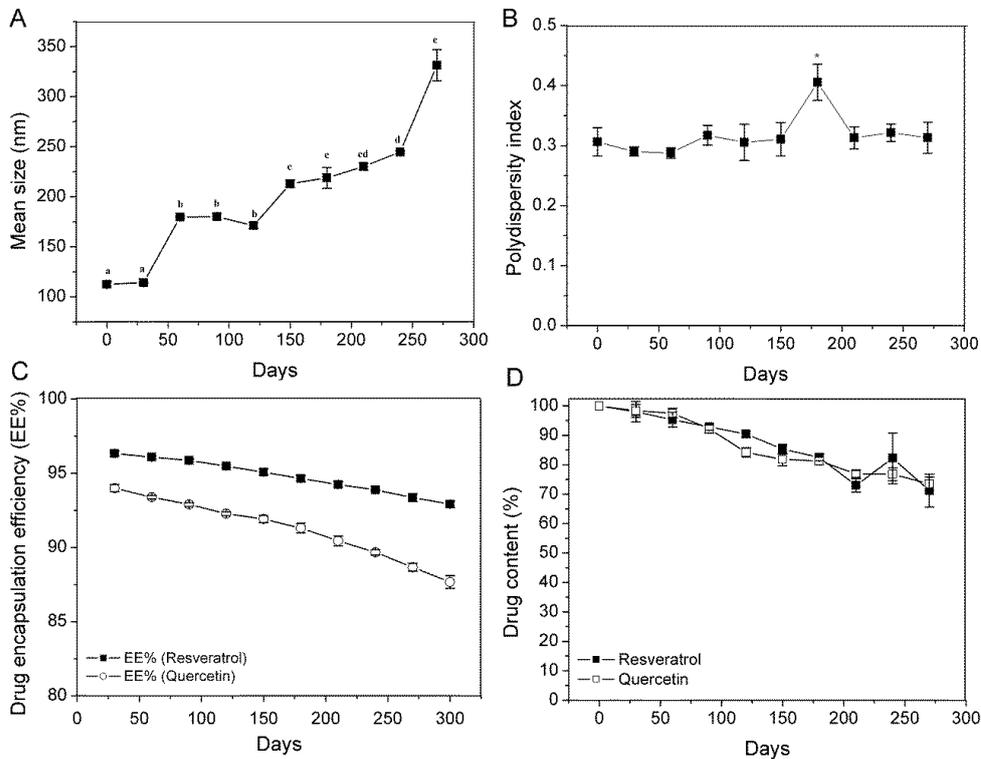
O mecanismo de morte celular causado pelos lipossomas contendo QUE/RES encapsulados em células HL-60 foi avaliado por citometria de fluxo usando anexina V-FITC e PI. As células HL-60 foram cultivadas em placas de 6 poços e, em seguida, foram tratadas com QUE/RES livre ou encapsulado em lipossomas elásticos (200  $\mu$ M) durante 24 h. A análise de citometria de fluxo com Annexin V-FITC foi feita de acordo com as instruções do fabricante. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão de ligação e coradas com 5  $\mu$ l de anexina V-FITC à temperatura ambiente durante 5 min no escuro, seguido da adição de 5  $\mu$ l de PI por mais 10 min. A fluorescência AnnexinV-FITC e iodeto de propídio (PI) foi detectada por um citômetro de fluxo BD Accury C6 (Becton Dickinson), foram adquiridos cerca de 20.000 eventos (em gated). A fluorescência foi excitada a 488 nm e medida com filtro FL1 (530 nm / 15 nm) ou FL2 (585 nm / 21 nm) para Annexin V-FITC e PI, respectivamente. As porcentagens de distribuição de células normais, células na apoptose precoce e células em apoptose ou necrose tardia foram calculadas usando o software BD Accury C6 (Becton Dickinson).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. ESTABILIDADE A LONGO PRAZO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS

A Figura 13 mostra a estabilidade de armazenamento do QUE / RES-Lipo liofilizado de acordo com suas propriedades físico-químicas. De acordo com a Figura 14a, o tamanho médio das vesículas do QUE / RES-lipo liofilizado aumentou de 138,4 nm (após a fabricação, no dia 0) para 331,33 nm (300 dias de armazenamento) com valores de PDI não variáveis, exceto no 180º dia (Fig. 14b). A eficiência de encapsulamento de drogas permaneceu constante durante um ano de armazenamento de lipossomas com 87,6% de quercetina e 92,9% de resveratrol, com perda de fármaco de 3,43% e 6,33%, respectivamente (Fig. 14c). Além disso, cerca de 70% do teor de QUE e RES (%) permaneceram em suas formas não oxidadas após hidratação de lipossomas liofilizados no ano de armazenamento exposto à luz (Fig. 14d).

Figura 14 - Propriedades físico-químicas do QUE / RES-Lipo liofilizado em armazenamento a  $25 \pm 5^\circ \text{C}$  na presença de umidade e luz durante 300 dias: A. Tamanho médio da vesícula (nm); B. índice de polidispersão; C. Conteúdo de drogas (%); D. Eficiência de encapsulação de medicamentos (%).



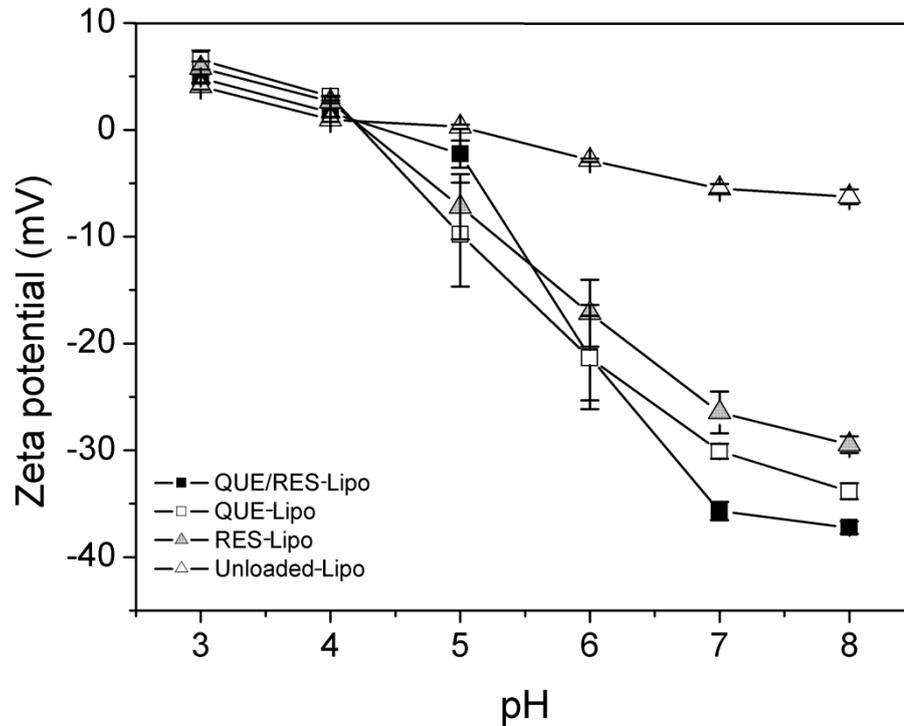
Fonte: PEREIRA M.A., 2014.

## 5.2. EFEITO DO pH NA CARGA SUPERFICIAL DE QUE/RES-LIPOSSOMAS

Após a titulação de lipossomas de pH 8,0 a 3,0, o potencial zeta aumentou gradualmente para 4,83 mV, 6,53 mV e 5,8 mV para QUE / RES-lipo, QUE-lipo e RES-lipo, respectivamente. Nenhuma variação do potencial zeta foi encontrada em pH = 8,0 para todas as formulações lipossômicas.

Os pontos isoelétricos (pI) das formulações lipossômicas foram 5,02 para lipo não descarregado, 4,41 para QUE-Lipo, 4,57 para RES-Lipo e 4,67 para QUE / RES-Lipo.

Figura 15 - O efeito do pH na carga superficial (potencial zeta) dos lipossomas.

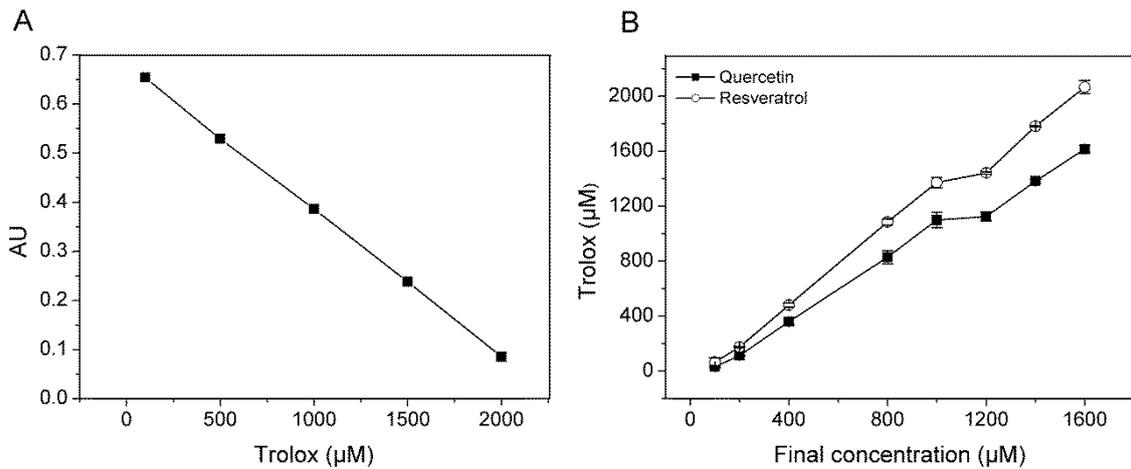


Fonte: PEREIRA. M.A., 2014.

### 5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

A curva analítica do trolox (Fig. 16a) para os ensaios de linearidade foi plotada com cinco concentrações permitindo a derivação da seguinte equação de ajuste linear:  $AU = 0,682 (\pm 0,003) - 0,0003 (\pm 0,000001) [\text{Trolox } \mu\text{M}]$ . A curva analítica foi validada pelo método de mínimos quadrados mostrando coeficientes de correlação superiores a 0,9999 e a análise de variância unidirecional (ANOVA) mostrando valores de F e p de 18,999,59 e  $<0,001$ , respectivamente. A curva na Fig. 16b mostra a resposta linear entre as concentrações de QUE e RES e o equivalente  $\mu\text{M}$  Trolox, com  $IC_{50}$  de 880  $\mu\text{M}$  para QUE e 1.117,24  $\mu\text{M}$  para RES.

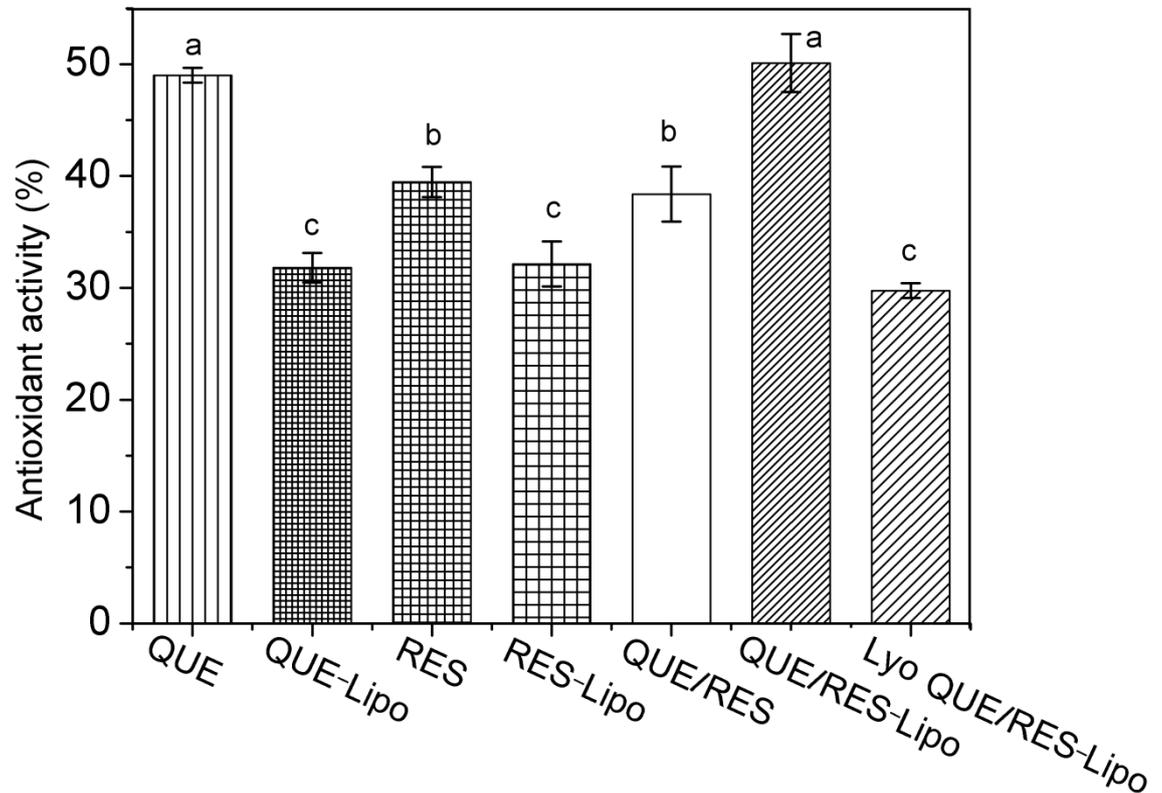
Figura 16 - Curva padrão Trolox (A) e equivalente trolox ( $\mu\text{M}$ ) de quercetina e de resveratrol (B) em diferentes concentrações usando o método ABTS.



Fonte: PEREIRA, M.A., 2014.

A Figura 17 mostra que QUE e RES tiveram atividade antioxidante, tanto drogas livres quanto presas em lipossomas elásticos. A uma concentração de 800 µM, QUE apresentou maior atividade antioxidante do que RES (21% superior), com um valor de TEAC de 1091,93 ± 15,4 µM de Trolox e TEAC de 867,98 ± 31,75 µM Trolox, respectivamente. É importante ressaltar que o encapsulamento de QUE e RES nos lipossomas atenua a atividade antioxidante e protege as substâncias da oxidação. A atividade antioxidante de QUE / RES-Lipo foi 12% superior a QUE / RES, com TEAC de 1117,69 ± 60,93 µM de Trolox. Lyophilized QUE / RES-Lipo mostrou TEAC de 639,5442 ± 15,14 µM e atividade antioxidante de 29,7%, com perda de apenas 20% em cerca de 550 dias de armazenamento.

Figura 17 - Atividade antioxidante de QUE e RES puro e encapsulado em lipossomas. Foram utilizados QUE/RES-Lipo (Lyo QUE / RES-Lipo) liofilizados durante 550 dias após redispersão em água deionizada.

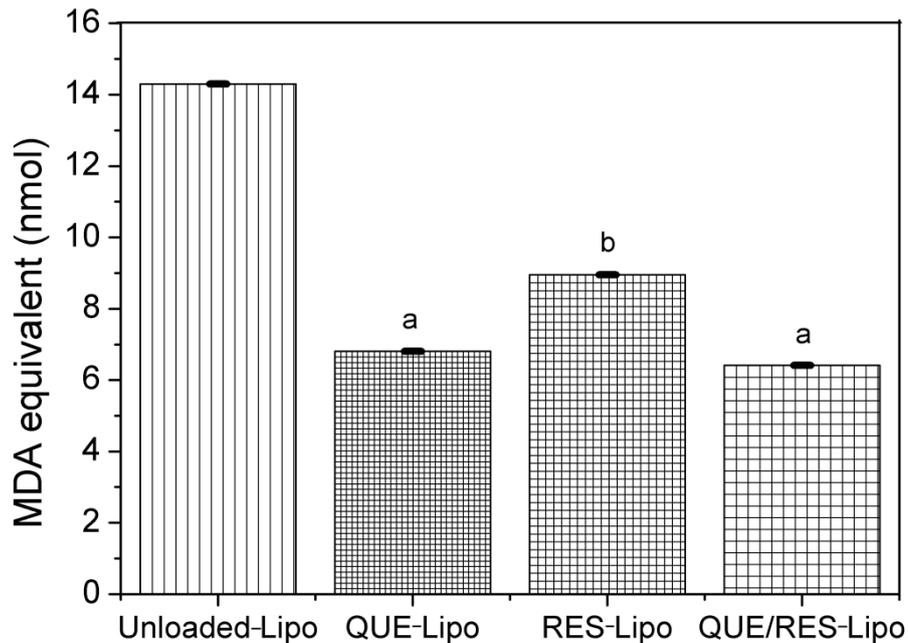


Fonte: PEREIRA, M.A., 2014.

#### 5.4. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS CONTENDO QUE/RES ENCAPSULADOS

Para a quantificação do teor de peroxidação lipídica, utilizou-se o método da espécie reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os níveis de peroxidação lipídica das formulações lipossomais testadas são mostrados na Figura 18. Todas as formulações exibiram potencial protetor para a peroxidação lipídica de fosfolipídios que constitui os lipossomas, com uma diminuição significativa com os níveis de MDA equivalente em relação ao lipossoma vazio.

Figura 18: Peroxidação lipídica de formulações lipossomais. O teor de peroxidação lipídica foi avaliado utilizando o método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com valores expressos em equivalentes de MDA (nmol).



Fonte: PEREIRA, M.A., 2014.

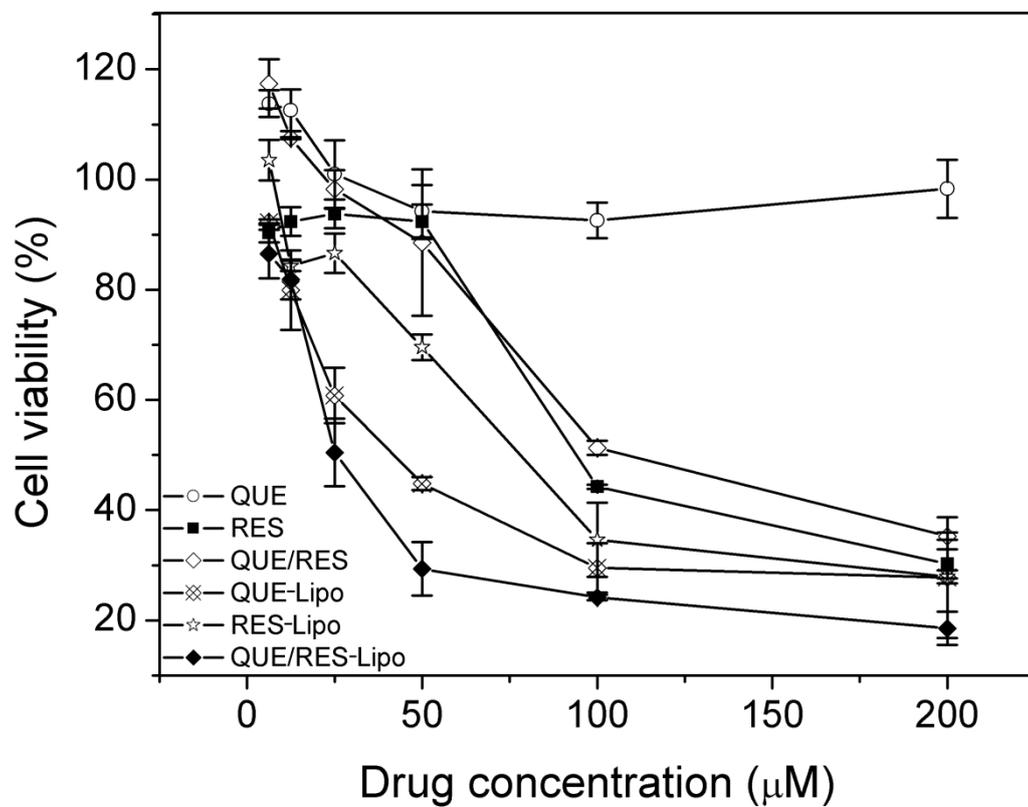
QUE e RES diminuíram os níveis de peroxidação lipídica com  $14,3 \pm (9,2 \times 10^{-5})$  para lipossomas vazios  $8,9 \pm (1,0 \times 10^{-4})$  para QUE-Lipo,  $6,8 \pm (1,6 \times 10^{-4})$  para RES-Lipo e  $6,4 \pm (1,0 \times 10^{-4})$  MDA equivalente nmol para QUE / RES-Lipo. A quercetina reduziu a peroxidação lipídica em 53%, RES em 38% e sua combinação reduziu a peroxidação lipídica em 56%.

### 5.5. CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

QUE em concentrações mais baixas aumentou a viabilidade celular em 13%, mostrando efeito proliferativo nas células HL-60 (Fig. 19). No entanto, em concentrações mais elevadas, QUE foi capaz de reduzir a viabilidade celular, com uma  $IC_{50}$  de  $811 \mu\text{M}$ . QUE-Lipo também exibe atividade antiproliferativa, mas de forma mais efetiva, com uma  $IC_{50}$  de  $85,43 \mu\text{M}$ . Tanto RES como RES-Lipo exibiram atividade antiproliferativa com  $IC_{50}$  de  $131,7$  e  $113 \mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 3). A co-encapsulação de QUE e RES em lipossomas melhorou o

efeito antiproliferativo desses compostos com uma  $IC_{50}$  de  $60,71 \mu\text{M}$ , o que corresponde a uma diminuição de 57,84% ( $IC_{50}$  de QUE / RES =  $144,23 \mu\text{M}$ ).

Figura 19 - Viabilidade de células HL-60 tratadas com QUE e RES, como compostos individuais ou carregadas em lipossomas. As células foram incubadas com compostos em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) durante 72 h. A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico MTT.



Fonte: PEREIRA, M.A., 2014.

Tabela 3 - A atividade antiproliferativa, expressa como IC<sub>50</sub>, de QUE / RES-lipossomas em células HL-60 em comparação com compostos puros.

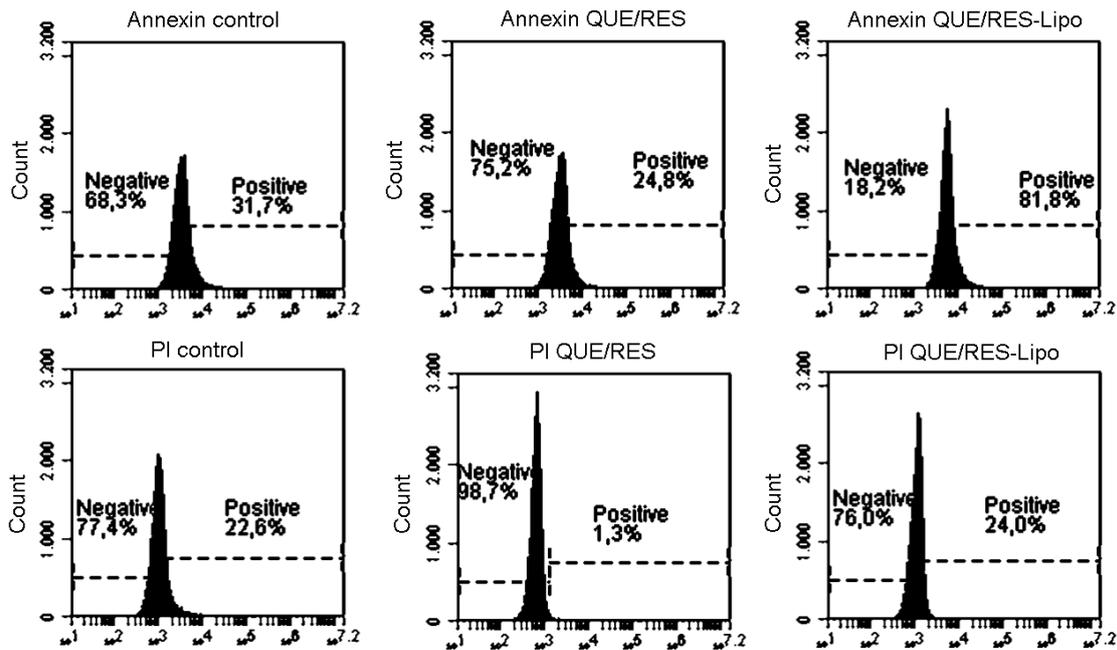
<b>Test compounds</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
QUE	811.94
RES	131.70
QUE/RES	144.23
QUE-Lipo	85.43
RES-Lipo	113
QUE/RES-Lipo	60.71

#### 5.6. MECANISMO DE MORTE CELULAR

A análise das populações de células mostrou diferentes conjuntos de populações, em que a anexina V-FITC-/PI + foi designada como controle, a anexina V-FITC+/PI- foi designada como apoptótica precoce, a anexina V-FITC+/PI + foi designada como apoptótica tardia e a anexina V-FITC-/PI+ foi designada como necrótica. Quando avaliamos o mecanismo de morte celular por apoptose (coloração de anexina) em células HL-60, QUE/RES-Lipo teve atividade apoptótica mais eficiente, com 81,8% de morte celular, do que QUE/RES que tinha 25,8% para esse mecanismo. No entanto, no mecanismo de necrose (coloração PI), as células de controle apresentaram uma porcentagem baixa de cerca de 22,6% das células marcadas que era semelhante à das células tratadas com QUE/RES-Lipo, que era cerca de 24,0% das células marcadas (Figura 20).

Portanto, os resultados indicam que o tratamento com QUE/RES e QUE/RES-Lipo diminuiu o número de células vivas e o mecanismo de morte celular foi induzido por apoptose predominantemente. Além disso, a quercetina e o resveratrol carregados em lipossomas tiveram atividade antiproliferativa mais efetiva, aumentando a morte celular por apoptose em 60%, comparando-se no QUE/RES livre.

Figura 20 - Apoptose e necrose induzidas por QUE e RES, livres ou carregadas em lipossomas elásticos em células de leucemia HL-60 usando análise citotrométrica de fluxo de anexina V-FITC e IP coradas. Células não tratadas (controle) ou tratadas com QUE/RES e QUE/RES-Lipo na concentração de 200  $\mu$ M. A porcentagem de células apoptóticas foi calculada pelo software BD Accuri C6.



Fonte: PEREIRA, M.A., 2014.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisamos a estabilidade, a atividade antioxidante e o efeito da quercetina e do resveratrol encapsulados em lipossomas elásticos na proliferação de células HL-60 e avaliamos se o encapsulamento em lipossomas pode aumentar a atividade antiproliferativa desses compostos.

De acordo com a estabilidade do armazenamento, o QUE / RES-Lipo liofilizado manteve-se estável durante 300 dias, sem variação significativa da eficiência de encapsulamento do fármaco, PDI e tamanho de partícula. Após 180 dias, o QUE / RES-Lipo liofilizado mostrou tamanho de partícula superior a 200 nm. Anteriormente, Harashima et al. (1994) descobriram que a opsonização de lipossomas por macrófagos é reduzida com a diminuição do tamanho de partícula dos lipossomas (de 800 a 200 nm). Opsonins liga-se aos

lipossomas dependendo do seu tamanho de partícula e as células fagocíticas absorvem lipossomas proporcionalmente à extensão da opsonização. Com tamanho de partícula de 200 nm, não foi observado aumento na absorção de lipossomas.

Após 280 dias, QUE / RES-Lipo permaneceu com maior EE% (> 87%), com perda de drogas de 6,33%. Estes resultados sugerem que a liofilização aumenta a vida útil da formulação lipossomal e a conserva em forma seca para reconstituir com água antes da administração (Ghanbarzadeh et al., 2013).

Vale ressaltar que a estabilidade de armazenamento foi realizada para simular as condições de armazenamento disponíveis aos pacientes em sua casa, com presença de umidade, variação de temperatura de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  e falta de proteção da luz, o que não se encaixa em condições de armazenamento padrão de produtos liofilizados (Glavas-Dodov et al., 2005).

A curva de titulação foi desenvolvida para analisar os efeitos da variação do pH na carga superficial dos lipossomas elásticos e avaliar a estabilidade dessas vesículas contra os limites dos valores de pH. Conforme mostrado na curva de titulação, os potenciais zeta das formulações lipossômicas foram gradualmente aumentados com a diminuição do pH de 8,0 para 3,0. Esse fato pode ser explicado pela neutralização ácida do grupo de fosfatidilcolina de fosfato polar que pode ocorrer na presença de íons  $\text{H}^+$  (Channarong et al., 2010). Por outro lado, pode ocorrer a neutralização por íons  $\text{H}^+$  de drogas ionizadas presentes no lado externo da bicamada de lipossomas fosfolipídicos (Terao et al., 1994).

Outro ponto importante que deve ser levado em consideração é a presença de diferentes valores do ponto isoelétrico (pI) para cada formulação lipossômica testada. O valor para lipossomas elásticos foi encontrado na faixa de 4,41 a 4,67. Estes resultados sugerem que os lipossomas em pH 7,4 terão carga superficial superior a - 29 mV. Os lipossomas são usados como modelo para células artificiais e pI é importante porque neste valor de pH a passagem de fármacos através da membrana é facilitada pela anulação de cargas (Englund e Lundahl, 1991).

Numerosos estudos visaram investigar a atividade antioxidante dos flavonóides e tentaram estabelecer a relação entre a estrutura dos flavonóides e a atividade de eliminação radical. Esta atividade depende principalmente do padrão de substituição dos grupos hidroxilo, isto é, na disponibilidade de hidrogênio fenólico e na possibilidade de estabilizar os radicais fenoxil flavonóides resultantes (Amic e Lucic, 2010).

A atividade antioxidante de QUE e RES, como compostos individuais e encapsulados em lipossomas elásticos, foi quantificada usando o método ABTS. Este ensaio é frequentemente usado para avaliar a atividade antioxidante e desenvolver relacionamentos estrutura-atividade (SARs) de flavonóides e é baseado na eliminação do radical ABTS e convertê-lo em um produto incolor (Re et al., 1999). A atividade antioxidante é expressa como TEAC, que é definida como a concentração milimolar de uma solução de Trolox com a mesma atividade antioxidante que uma concentração 1,0 mM do número de grupos hidroxilo (Arnao et al., 1999).

Estudos relataram que a quercetina e o resveratrol são importantes antioxidantes. De acordo com Iacopini et al. (2008), a quercetina possui maior atividade de eliminação de radicais do que o resveratrol, com uma concentração que inibe 50% da reação de oxidação (IC50) 20% menor. Os resultados experimentais deste estudo mostraram que, com a mesma concentração, a atividade da quercetina (TEAC de  $1091,93 \pm 15,4 \mu\text{M}$ ) de radical livre ABTS eliminando a atividade do resveratrol (TEAC de  $867,98 \pm 31,75 \mu\text{M}$ ). A quercetina apresentou uma diminuição de 21% no IC50, comparando com o resveratrol, de acordo com o estudo descrito acima. Para avaliar se a atividade antioxidante da quercetina e do resveratrol permanece o mesmo quando aprisionados em lipossomas, foram testadas formulações lipossômicas diferentes. A atividade antioxidante de QUE e RES permaneceu apresentada quando aprisionada em lipossomas elásticos e 12% superior a QUE e RES como compostos individuais com TEAC de  $1117,69 \pm 60,93 \mu\text{M}$ . O QUE / RES-Lipo liofilizado, com 550 dias de armazenamento, manteve-se com uma atividade antioxidante notável, diminuindo apenas 20%.

Outra consequência da atividade antioxidante de QUE e RES é sua capacidade de prevenir ou diminuir a peroxidação lipídica em bicamadas de fosfolípidos quando são carregadas em lipossomas. A peroxidação lipídica é o processo de reação em cadeia da oxidação / degradação do ácido gordo insaturado. No processo extensional de peroxidação lipídica, gerará diferentes tipos de radicais livres, como radicais livres de oxigênio, radicais livres de gordura e oxigênio e radicais livres de gordura (Reis e Spickett, 2012). Na fase final, serão geradas pequenas moléculas, como o malondialdeído (MDA). O MDA é o produto estável mais importante da peroxidação lipídica. Os produtos podem prejudicar várias funções celulares. Existe uma estreita relação entre o dano celular e muitos tipos de doenças (Fabris et al., 2008). Pode ser benéfico melhorar produtos adequadamente antioxidantes para melhorar a estabilidade das formulações lipossômicas e prevenir doenças.

A substância reactiva do ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o produto da reacção de cor entre MDA e ácido tiobarbitúrico (TBA). Ao medir o conteúdo dos TBARS produzidos, o estudo indicará a extensão da peroxidação lipídica e confirmará se QUE e RES são capazes de prevenir a peroxidação de fosfolípidos e corroboram a estabilidade da formulação lipossomal. Gordon e Roedig-Penman (1998) descobriram que a atividade antioxidante da quercetina era capaz de aumentar a estabilidade dos lipossomas a pH 7,4, reduzindo a peroxidação lipídica e esta formulação lipossomal (com QUE como composto individual) manteve-se estável durante 2000 h.

No presente estudo, descobrimos que o potencial antioxidante de QUE e RES foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica de lipossomas elásticos cerca de 53% para lipossomas elásticos com QUE aprisionados, 38% para lipossomas com RES e 56% para lipossomas elásticos contendo a associação de lipossomas Ambos (QUE / RES). Todos esses achados provam que a associação da quercetina com o resveratrol carregado em lipossomas é mais efetiva no aprimoramento da estabilidade das formulações lipossômicas.

Com base na capacidade radical de eliminação de flavonóides e polifenóis, Hsu & Yen (2006) estabeleceram uma relação entre a atividade antioxidante eo potencial indutor de apoptose de flavonóides e compostos polifenólicos. Eles encontraram uma correlação significativa entre a influência dos flavonóides no crescimento da população celular e seu valor TEAC. Esses resultados sugerem que os flavonóides testados no crescimento da população celular estavam bem correlacionados com sua atividade antioxidante. Depois, eles investigaram o mecanismo de morte celular usando citometria de fluxo com coloração de Annexin-V e PI e descobriram que esses flavonóides causam 31% da morte celular por apoptose.

Os efeitos dos flavonóides na integridade e na função celular variaram de citoproteção a citotoxicidade. Recentemente, a citotoxicidade dos flavonóides e dos compostos polifenólicos, incluindo o apigenina, o eriodictilol, a 3-hidroxiavona, o keempherol, a luteolina, a naringenina, a taxercina quercetina, a rutina e o resveratrol para as células normais cultivadas e as linhas das células tumorais, incluindo as células HL-60, tem sido amplamente investigado (Akbas et al., 2005 e Matsuo et al., 2005). Um estudo desenvolvido por Araújo et al. (2013) relataram que o tratamento de células HL-60 com quercetina reduziu a viabilidade celular em 50%, a 14 mg / mL, após 24 h. Surh et al. (1999) demonstram que o tratamento de células HL-60 com resveratrol reduziu a viabilidade celular e induziu a morte celular por apoptose.

Attar et al. (1999) descobriram que a associação de resveratrol (50 mM) e quercetina (10-50 mM) provocou uma resposta mais que aditiva na redução da proliferação de células de carcinoma escamoso oral, reduzindo a viabilidade celular em 50%. Mertens-Talcott e Percival (2005) também descobriram que células HL-60 tratadas com resveratrol e quercetina como compostos isolados apresentaram viabilidade celular reduzida. A quercetina foi mais eficaz do que o resveratrol, reduzindo o número total de células para 48% das células de controle, enquanto o resveratrol reduziu o número de células para 72%. Os efeitos causados pela combinação de quercetina com resveratrol demonstraram uma interação aditiva desses compostos.

Para afirmar QUE e RES capacidade de causar morte celular pela apoptose está relacionada à sua atividade antioxidante, um teste de viabilidade celular foi realizado em células HL-60. O tratamento de células HL-60 com quercetina e resveratrol como compostos individuais reduziu a viabilidade celular com IC50 de 811,94  $\mu\text{M}$  para QUE, 131,7  $\mu\text{M}$  para RES, 144,23  $\mu\text{M}$  para a associação de QUE / RES. Nosso estudo corroborou com os estudos descritos acima.

Para avaliar se a atividade antiproliferativa da quercetina e do resveratrol pode melhorar com o encapsulamento desses flavonóides em lipossomas, o QUE-Lipo, RES-Lipo e QUE / RES-Lipo foram testados. QUE e RES travados em lipossomas elásticos apresentaram a melhor atividade antiproliferativa em células vivas HL-60, com IC50 inferior, cerca de 60,71  $\mu\text{M}$  contra 85,43  $\mu\text{M}$  para QUE-Lipo e 113  $\mu\text{M}$  para RES-Lipo. Esses resultados sugerem que a associação da quercetina e do resveratrol preso em lipossomas pode aumentar a atividade antiproliferativa e reduzir a IC50 em 25%, comparando com QUE e RES encapsulados como compostos individuais.

Nós também investigamos o mecanismo de morte celular de QUE livre e RES em associação ou aprisionados em lipossomas. Nosso estudo mostrou que a quercetina e o resveratrol encapsulados em lipossomas aumentaram a morte celular por apoptose cerca de 60%, comparando com a associação de QUE e RES como compostos individuais, com 81,8% de morte celular causada pela apoptose para QUE / RES-Lipo e 24,8% Grátis QUE / RES. Esses resultados sugerem um perfil controlado e controlado de QUE / RES de lipossomas como relatado anteriormente por Cadena et al. (2013), que contribui para o efeito antiproliferativo de QUE e RES, sendo mais eficiente na indução de morte celular HL-60 do que livre QUE e RES em associação.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com a estabilidade de armazenamento, o lífilo da formulação QUE/RES-Lipo permaneceu estável durante 300 dias, sem variação significativa de tamanho, PDI e eficiência de encapsulação ( $EE\% > 87\%$ , com perda de apenas 6,33%). Estes resultados sugerem que a liofilização aumentou a vida útil da formulação lipossomal.

Com a curva de titulação, podemos concluir que o potencial zeta das formulações lipossomais aumentaram gradualmente com a diminuição do pH no intervalo 8,0-3,0. O valor do ponto isoelétrico dos lipossomas elásticos foi encontrado na faixa de 4,41 a 4,67. Estes resultados sugerem que os lipossomas, em pH 7,4, terão o perfil de liberação controlada, com carga de superfície de superior  $-29$  mV.

Quanto à atividade antioxidante, os estudos mostraram que, com a mesma concentração, a atividade antioxidante de quercetina (TEAC  $1091.93 \pm 15,4 \mu\text{M}$ ) foi maior do que a do resveratrol (TEAC  $867.98 \pm 31.75 \mu\text{M}$ ), com uma diminuição de 21% na IC<sub>50</sub>. A atividade antioxidante dos lipossomas elásticos contendo QUE e RES foi 12% maior em relação aos fármacos livres, com TEAC  $1117.69 \pm 60.93 \mu\text{M}$ . O lífilo de QUE/RES-Lipo, com 550 dias de armazenamento teve apenas uma redução de 20% em sua atividade.

Levando em consideração os estudos de peroxidação lipídica, podemos verificar que QUE e RES foram capazes de reduzir os níveis de peroxidação lipídica dos lipossomas elásticos em 53% contendo QUE, 38% contendo RES e 56% contendo a associação de QUE e RES. Estes resultados comprovam que a associação de quercetina e resveratrol nanoencapsulados em lipossomas elásticos foi mais eficaz que os fármacos nanoencapsulados individualmente.

O tratamento de células HL-60 com QUE e RES como compostos individuais reduziu a viabilidade celular com IC<sub>50</sub> de  $811.94 \mu\text{M}$  para QUE,  $131.7 \mu\text{M}$  para RES,  $144.23 \mu\text{M}$  para a associação de QUE e RES, respectivamente. Lipossomas contendo QUE e RES nanoencapsulados apresentaram a melhor atividade antiproliferativa, com a menor IC<sub>50</sub> de  $60.71 \mu\text{M}$  contra  $85.43 \mu\text{M}$  para lipossomas elásticos contendo QUE e  $113 \mu\text{M}$  para lipossomas elásticos contendo RES. Estes resultados sugerem que a associação de QUE e RES em lipossomas elásticos pode aumentar a atividade antiproliferativa destes compostos e reduzir a IC<sub>50</sub> em 25%, comparando com estes fármacos livres e encapsulados em lipossomas elásticos individualmente.

Além disso, nosso estudo concluiu que QUE e RES encapsulados em lipossomas elásticos apresentou morte celular por apoptose de 81,8% e de 24,8% para QUE/RES livre com aumento de 60% comparando com a associação de QUE e RES como compostos individuais.

Desta forma, baseado nos resultados, podemos concluir que a formulação lipossomal elástica contendo QUE e RES nanoencapsulados teve boa atividade contra a linhagem HL-60. Atualmente, outros estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados para melhorar a eficácia e atividade da formulação.

## 8. REFERÊNCIAS

AFANAS'EV I.B, DOROZHKO AI, BRODSKII AV, KOSTYUK VA, POTAPOVITCH AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* v.11, p. 1763-9, 1989.

AGGARWAL, B. B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research.* v.24, p. 2783–2840, 2004.

AHLENSTIEL T, BURKHARDT G, KÖHLER H, KUHLMANN MK. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney Int.* v.2, p. 554-63, 2003.

AHSAN, F.; RIVAS, I. P.; KHAN, M.A.; TORRES SUAREZ, A.I. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release,* v.79, p.29-40, 2002.

ALLAN, K. E. et al. UV light stability of  $\alpha$ -cyclodextrin/resveratrol host-guest complexes and isomer stability at varying pH. *Australian Journal of Chemistry.* v. 62, n. 8, p. 921-926, 2009.

ANGELIS, Rebeca Carlota de; *A Importância dos Alimentos Vegetais na Prevenção da Saúde: Fisiologia da Nutrição Protetora e Preventiva de Enfermidades Degenerativas; 2ª Edição; São Paulo; Ed. Atheneu; 2005.*

ARSHAD, N. et al. Electrochemical investigations of antioxidant interactions with radical anion and dianion of 1,3-dinitrobenzene. *Electrochimica Acta,* v. 54, n. 26, p. 6184-6189, 2009.

ASHKENAZI A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* v.6, p. 420-30, 2002.

ATHAR, M., BACK J.H., TANG, X., KIMB, K.H., KOPELOVICH, L., BICKERS A D.R., KIM, A.L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology.* v.224, p. 274–283, 2007.

ATTEN, M.J., GODOY-ROMERO, E., ATTAR, B.M., MILSON, T., ZOPEL, M., HOLIAN, O. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest. New Drugs.* v. 23, p. 111–119, 2005.

AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia. (Instituto de Química - LQES) - Universidade de Campinas, 2002.

BANGHAM, A. D., Liposome Letters, Academic Press, ed. (1983).

BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Liposomes and their therapeutic: State of art applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BAUR, J.A. SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, London. v. 5, p. 493-506, 2006.

BECHMANN, L. P. et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells. *Hepatology Research*, v. 39, n. 6, p. 601-608, 2009.

BELGUENDOUZ, L.; FREMONT, L.; GOZZELINO, M.T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*. v. 55, p. 811– 816, 1998.

BERTELLI, A. A. et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal on Tissue Reactions*. v. 17, p. 1–3, 1995.

BOOTS A. W., HAENEN G.R., BAST A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*; v.585, p. 325–37, 2008.

BRAGANHOL, E., ZAMIN, L.L., CANEDO, A.D., HORN, F., TAMAJUSUKU, A.S., WINK, M.R., SALBEGO, C., BATTASTINI, A.M., Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* v.17, p. 663–671, 2006.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Arlington, v.54, p.631-651, 2002.

BUDAVARI, S. (Ed.). The Merck Index. 12th ed. White House Station: Merck, 1996

CADDEO, C.; TESKAC, K.; SINICO, C.; KRISTL, J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*. v.363, p. 183-191, 2008.

CHEN, Y.; TSENG, S.H.; LAI, H.S.; CHEN, W.J. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery*. v. 156, p. 57-66, 2004.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry*. v.90, n. 1-2, p. 17-21, 2005.

CHOI, E., BAE, S.M., AHN, W.S., Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB- 453 cells. *Archives of Pharmacal Research* v.31, p. 1281–1285, 2008.

COOK, N. C. and SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* v.7, p. 66-76, 1996.

DAJAS F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.143, p. 383–396, 2012.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, New York, v. 55, p. 396-398, 1997.

DAS, D.K. et al. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart Failure Review*.v. 15, P. 467-477, 2010.

ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. v.4, p. 495-516, 2007.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, v.24, p. 851-874, 2004.

FERRY, D.R.; SMITH, A.; MALKHANDI, J.; et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*, v.2, p. 659-668, 2002.

FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R. S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v.14, n.5, p.419-427, 1995.

FORMICA JV. REGELSON W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. v.33, p.1061-80, 1995.

FRANZ, H.; Injection Lipolysis for Effective Reduction of Localized Fat in Place of Minor Surgical Lipoplasty. *Aesthetic Surgery Journal* 2006; v. 26:1; p. 25-130, 2006.

FREGONI, M. *Viticultora di qualità. 2.ed. Verona: Agrário, 1999.*

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F., DEMICHELI, C. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Research*. v. 64, p. 337–346, 2004.

GAO, S., LIU, G.Z., WANG, Z., Modulation of androgen receptor-dependent transcription by resveratrol and genistein in prostate cancer cells. *Prostate* v.59, p. 214–225, 2004.

GREGORIADIS, G., SENIOR, J., WOLFF, B., KIRBY, C. Targeting of Liposomes to Accessible Cells In Vivo. *Macromolecules as Drugs and as Carriers for Biologically Active Materials* pages v. 446, p. 319–339, 1985.

HARWOOD M, DANIELEWSKA-NIKIEL B, BORZELLECA J. F, FLAMM G. W, WILLIAMS G. M, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*, v. 45, p. 2179–205, 2007.

HERTOG M. G., KROMHOUT D., ARAVANIS C., BLACKBURN H., BUZINA R., FIDANZA F., et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, v.155, p. 381–6, 1997.

HSIEH, T.-C., WANG, Z., HAMBY, C.V., WU, J.M., Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 334, p. 223–230, 2005.

HSIEH, T.C., WU, J.M., Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Research* v. 29, p. 4025–4032, 2009.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. v. 275, p. 218–220, 1997.

JULLIAN, C; MOYANO L; YAÑEZ C; OLEA-AZAR C. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* v. 67, p. 230-4. 2007.

KANG, J.W., KIM, J.H., SONG, K., KIM, S.H., YOON, J.H., KIM, K.S., Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGb761), induce caspase-3- dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytotherapy Research*, v. 24, p. S77–S82, 2010.

KEREM, Z. et al. Protection of lipids from oxidation by epicatechin, trans-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 26, p. 10288-10293, 2006.

KIJHNAU, J. The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet*. v. 24, p. 117-191, 1976.

KIMURA, Y., OKUDA, H., Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.* v. 131, p. 1844–1849, 2001.

KING, R. E.; BOMSER, J.A.; MIN, D.B. Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive. Reviews and Food Science and Food Safety*. v.5, p. 65-69, 2006.

KLIONSKY DJ, EMR SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. v. 290, p. 1717-21, 2000.

KO, M. J., CHEIGH, C. I., CHUNG, M. S. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chemistry*. v. 143, p. 147–155, 2014.

KNEKT, P., KUMPULAINEN, J., JÄRVINEN, R., RISSANEN, H., HELIÖVAARA, M., REUNANEN, A., HAKULINEN, T., AROMAA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* v. 76, p. 560–8, 2002.

KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, ABRAMS J, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, GREEN DR, HENGARTNER M, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, MALORNI W, NUÑEZ G,

PETER ME, TSCHOPP J, YUAN J, PIACENTINI M, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* v. 16, p. 3-11, 2009.

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* v. 24, p. 117-91, 1976.

LALIC-POPOVIC, M.; VASOVIC, V.; MILIJAŠEVIC, B.; GOLOIORBIN-KON, S.; AL-SALAMI, H.; MIKOV, M. Deoxycholic Acid as a Modifier of the Permeation of Gliclazide through the Blood Brain Barrier of a Rat. *Journal of Diabetes Research*, v. 2013, 2013.

LEOPOLDINI, M; RUSSO, N; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, v. 125 (2), p. 288-306, 2011.

LINK, A; BALAGUER, F; GOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, v. 80 (12), p. 1771 – 1792, 2010.

LÓPEZ-LÁZARO, M., GÁLVEZ, M., MARTÍN-CORDERO, C., AYUSO, M.J. Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines. Structure-activity relationship. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 27, Part H, p. 891-932, 2002.

LOW, K. H. et al. Characterization of SLS parts for drug delivery devices. *Rapid prototype journal*, v. 7, n. 5, p. 262-267, 2001.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; v. 79, p. 727–47, 2004.

MANDAL, T.K.; BOSTANIAN, L.A.; GRAVES, R.A.; CHAPMAN, S.R.; IDODO, T.U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Amsterdam, v.52, p.91-96, 2001.

MARTENS, S., PREUß, A., MATERN, U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, v. 71, Issue 10, p. 1040-1049, 2010.

MATARASSO, A.; PFEIFER, T. M. Mesotherapy and Injection Lipolysis. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 36, n. 2, p. 181-192, 2009.

MCHUGH P., TURINA M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. *Surg Infect (Larchmt)*. v. 7(1), p. 53-68, 2006.

MENG, X.; MALIAKAL, P.; LU, H.; LEE, M.; YANG, C. S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. v.52, p. 935-942, 2004.

METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 41, p. 1067-75, 1997.

MICHELS, G., WATJEN, W., WEBER, N., et al., Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology*, v. 225, p. 173–182, 2006.

MIDDLETON, E. Jr. and KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research, Since 1986*. (J.B. Harborne, ed.), p. 619--652, 1993.

MOMIC T., J. SAVIC, U. CERNIGOJ, P. TREBSE & V. VASIC [Protolytic Equilibria and Photodegradation of Quercetin in Aqueous Solution](#). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. v. 72(11), p. 1447-1460, 2007.

MORIDANI, M. Y. et al. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 139, n. 3, p. 251-264, 2002.

MOT, A. C., COMANA, C., MRONA, C., DAMIANB, G., SARBUA, C., SILAGHI-DUMITRESCU, R. An assay for pro-oxidant reactivity based on phenoxyl radicals generated by laccase. *Food Chemistry*, v. 143, p. 214–222, 2014.

MOURIA, M., GUKOVSKAYA, A.S., JUNG, Y., BUECHLER, P., HINES, O.J., REBER, H.A., PANDOL, S.J., Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *Int. J. Cancer*, v. 98, p. 761–769, 2002.

MOUSA, S.S., MOUSA, S.A., Effect of resveratrol on angiogenesis and platelet/fibrin-accelerated tumor growth in the chick chorioallantoic membrane model. *Nutr. Cancer*, v. 52, p. 59–65, 2005.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74(4), p. 418-25, 2001.

O'NEIL, M. J. et al. The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14. ed. Whitehouse Station (NJ): John Wiley & Sons, 2006.

PARK, H. J.; YANG, J. Y.; AMBATI, S.; DELLA-FERA, M. A.; HAUSMAN, D. B.; RAYALAM, S.; BAILE, C. A. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Medicinal Food*, v. 11, n. 4, p. 773-783, 2008.

PIETTA, P., SIMONETTI, P., GARDANA, C., MAURI, P. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, Issue 1, p. 223-226, 2000.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Application of pharmaceutical nanotechnology to the treatment of malaria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PRIPREM, A.; WATANATORN, J.; SUTTHIPARINYANONT, S.; PHACHONPAI, W.; MUCHIMAPURA, S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 4, n. 1, p. 70-78, 2008.

RAYALAM, S. et al. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 19, n. 11, p. 717-726, 2008.

RENAUD, S.; GUEGUEN, R. The French paradox and wine drinking. *Novartis Found.* v. 216, p. 208-217, 1998.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; PEREIRA, E.C.G.; ALVES, J.A.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S. C.; HONDA, N.K.; SILVA, N.H.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation*, London, v.21, p.371-384, 2004.

ROTUNDA, A. M. et al. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatologic Surgery*, v. 30, n. 7, p. 1001-1008, 2004.

ROTUNDA, A. M.; KOLODNEY, M. S. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections: Historical clarification and review. *Dermatologic Surgery*, v. 32, n. 4, p. 465-480, 2006.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research*.v. 658, p. 68–94, 2008.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.A.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J. Drug Del. Sci. Tech., Paris*, v.15, p.355-361, 2005.

SCARLATTI, F., SALA, G., SOMENZI, G., SIGNORELLI, P., SACCHI, N., GHIDONI, R., Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. v. 03-0292 fje, 2003.

SHOSKES, D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. *Transplantation*, Baltimore, v. 66, n.2, p. 147-152, 1998.

SCHULTZ D.R., HARRINGTON W.J.Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. v. 32(6), p. 345-69, 2003.

SHARMA, A.; SHARMA, U. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*.v. 154, p. 123–140, 1997.

SHIH, A. et al. Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- $\alpha$ . *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 11, p. 1355-1366, 2004.

SILVA, G.A. Introduction to Nanotechnology and Its Applications to Medicine. *Surgical Neurology*. v. 61, p. 216-220, 2004.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*, v. 635, n. 1-3, p. 1-8, 2010.

SU, J.F. et al. Protection againts hepatic ischemiareperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 16, p. 1-8, 2003.

TAN WF, LIN LP, LI MH, ZHANG YX, TONG YG, XIAO D, DING J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur J Pharmacol.* v. 17;459(2-3), p. 255-62, 2003.

TIMBOLA, A. K.; DE SOUZA, C. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* v. 17, p. 139, 2006.

TORCHILIN V.P. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers: Promises and Problems. *Nanotechnologies for the Life Sciences*, 2012.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews.* v. 4, p. 145-160, 2005.

TREVISAN, V. Influência do tempo de maceração na extração de compostos fenólicos e determinação do *trans*-resveratrol em vinhos brasileiros. *Caxias do Sul: UCS*, p. 92, 2003.

VANDENBERG, G.W.; DROLET, C.; SCOTT S.L.; DE LANOUE, J. Factors affecting protein release from alginatechitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. *Journal of Controlled Release, Amsterdam*, v.77, p.297-307, 2001.

VIDYAPRIYADARSINI,R.,SENTHILMURUGAN,R.,MAITREYI,S.,RAMALINGAM,K., KARUNAGARAN, D.,NAGINI,S., The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kB inhibition. *European Journal of Pharmacology*, v. 649, p. 84–89, 2010.

WEIJ, N.L.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. *Cancer Treatments Review.*, London, v. 23, p. 209-240,1997.

WU, H.Q., XIAO, G.H., LEI, X.D., PROUGH R.A. P2A37 - Effect of glyphosate on microsomal cytochrome P450 gene expression in rat. *Toxicology Letters*, v. 95, p. 102, 1998.

XIE, X., YIN, J., JIA, Q., WANG, J., ZOU, C., BREWER, K.J., COLOMBO, C., WANG, Y., HUANG, G., SHEN, J., Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt. *Oncology Reports*, v. 26, p. 687–693, 2010.

YAKOVLEV, A.G., FADEN, A.I. Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. *NeuroRx.* v. 1(1), p. 5–16, 2004.

YANG, J.-Y.; DELLA-FERA, M. A.; RAYALAM, S.; AMBATI, S.; HARTZELL, D. L.; PARK, H. J.; BAILE, C. A. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sciences*, v. 82, n. 19-20, p. 1032-1039, 2008.

YOUAN, B. B. C. ; JACKSON, T. L. ; DI CKENS, L. ; HERMANDEZ, C.; OWUSUBIOABA, G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oil core. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v.76, p.313-326, 2001.

YOUNG, V. L.; Lipostabil: The Effect of Phosphatidylcholine on Subcutaneous Fat. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 23, p. 413, 2003.

ZHANG, P. et al. c-Mycdownregulation: a critical molecular event in resveratrol-induced cell cycle arrest and apoptosis of human medulloblastoma cells. *J. Neuro oncol.* v. 80. p. 123-131, 2006.

ZIEGLER, R.G.; MAYNE, S.T.; SWANSON, C.A. Nutrition and lung cancer. *Cancer Cause. Control.*, v.7, n.1, p.157-177, 1996.

ZUANAZZI, J. MONTANHA, J. Flavonóides. In: SIMÕES, C., et al. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. Ed.. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade da UFRGS/Editora da UFSC, Cap. 23, p.577-614, 2003.

APÊNDICE A: ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL  
OF PHARMACEUTICS

Qualis CAPES: A1, I.F. 3.991

**Antiproliferative effect of co-encapsulated quercetin and resveratrol into liposomes on  
HL-60 cells**

Marcela A. Pereira<sup>a</sup>, Milena S. Ferraz<sup>a</sup>, Rafaela S. Ferraz<sup>a</sup>, Roberto A. Lima<sup>a</sup>, André M.  
Galvão<sup>a</sup>, Paulo E. Cabral Filho<sup>b</sup>, Jaciana S. Aguiar<sup>c</sup>, Teresinha G. Silva<sup>c</sup>, Adriana Fontes<sup>b</sup>,  
Pabyton G. Cadena<sup>a,d</sup>, Nereide S. Santos-Magalhães<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N, 50670-901, Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil;

<sup>d</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil.

\*Corresponding author

Prof. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

Phone: + 55 81 21268587; fax: +55 81 21268485

E-mail: [nssm@ufpe.br](mailto:nssm@ufpe.br)

## ABSTRACT

Anticarcinogenic effects of bioactive compounds such as polyphenols, present in fruits and vegetables, are well established. Although polyphenols naturally occur as associations, little is known about their possible synergic or antagonist biochemical interactions. Identifying potential interactions between polyphenols may provide information regarding the efficiency of polyphenol-containing foods in cancer prevention. In the present study, we investigate the stability, the antioxidant activity by ABTS method, lipid peroxidation index by TBARS assay, the antiproliferative activity by MTT assay and the mechanism of cell death of liposomal formulations on HL-60 cells. Results showed a synergic effect of the combination of quercetin and resveratrol, and an additive effect these drugs entrapped in elastic liposomes. QUE/RES-Lipo presented 12% more antioxidant activity than QUE/RES as pure compounds, reduced lipid peroxidation in 56 % comparing to unloaded liposomes and reduced about 81 % the cell viability, with 81.8 % of cell death caused by apoptosis. All these findings indicate the synergic antiproliferative activity of quercetin and resveratrol co-encapsulated into liposomes, which allow further in vivo studies.

*Keywords: Quercetin, resveratrol, elastic liposomes, HL-60 cells, antiproliferative activity, apoptosis.*

## 1. INTRODUCTION

Medicinal plants and plant extracts are the oldest and most widespread form of medication. One of these groups of plants is phytochemicals that is known to exert anticancer activities, partially based on their antioxidant activity (Rafter, 2002). Phytochemicals may also interfere with intracellular signaling pathways, such as those which regulate proliferation, induction of apoptosis, and response to oxidative stress (Roy et al., 2003). An important bioactive compound quite widespread in the human diet is quercetin (7,3,5,3',4'-pentahydroxyflavone) (QUE), a flavonoid found in vegetables, fruits, and plants that has numerous biological activities due to its ability to inhibit the enzymes, which act as antioxidants, and regulate the immune response (Wang, 2013).

Numerous studies have reported the antiproliferative effects of quercetin in a variety of cancer cell lines, including glioma (Braganhol et al., 2006); osteosarcoma (Xie et al., 2010); cervical cancer (Vidya Priyadarsini et al., 2010); prostate cancer (Hsieh and Wu, 2009); breast cancer (Choi et al., 2008); colorectal xenografts (Priego et al., 2008); myeloid leukemia (Duraj et al., 2005) and andoral cavity cancer (Kang et al., 2010).

Other bioactive compound widely recognized for their pharmacological activities is resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) (RES), a phytoalexin found in various fruits that have been associated with anticarcinogenic effects. The cytotoxicity of resveratrol is also related to its antioxidant activity (Athar et al., 2007). Resveratrol can inhibit growth and induce apoptosis in melanoma cell lines (Hsieh et al., 2005); breast cancer (Scarlatti et al., 2003); gastric cancer (Atten et al., 2005); lung cancer (Kimura and Okuda, 2001); prostate cancer (Gao et al., 2004); neuroblastoma (Nicolini et al., 2003); hepatoma (Michels et al., 2006); fibrosarcoma (Mousa et al., 2005); pancreatic cancer (Mouria et al., 2002) and leukemia (Su et al., 2005).

Mertens-Talcott and Percival (2005) verified that the synergism of quercetin and resveratrol induced effect in cell cycle with higher percentage of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase at 12 h and in an S phase arrest after 24 h and enhanced apoptosis mediated by caspase-3 activity in leukemia cells. Despite its clinical potential, the use of QUE and RES in pharmaceutical therapy still restricted due to low water solubility and bioavailability (Li et al., 2013).

In this framework, an approach to overcome these limitations is the use of nanostructured drug delivery systems, such as liposomes, which are biocompatible and versatile vesicles, composed of a bilayer of phospholipids that can encapsulate hydrophilic drugs and hydrophobic. Among them, we have the elastic liposomes, which are vesicles with a greater ability to deformation. Compounds that may confer upon elasticity to conventional liposomes are surfactants, such as sodium desoxycholate (SDC) (Cevc and Blume, 2001). SDC is a bile salt extensively studied as a permeation enhancer of biological membranes (Paul et al., 1998).

Our previous study established stable formulations of SDC-elastic nanoliposomes containing QUE and RES entrapped in the phospholipid bilayer (Cadena et al., 2013). In the present study, we evaluate the stability of liposomes taking the storage stability, antioxidant activity and lipid peroxidation levels in consideration. The antiproliferative mechanism on human promyelocytic leukemia cells (HL-60 cells) was investigated by flow cytometry. We aim to evaluate if the association of QUE and RES, as individual compounds or loaded into elastic liposomes, can be more effective in antiproliferative activity than these flavonoids as individual compounds.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Materials**

Quercetin (QUE), resveratrol (RES), sodium deoxycholate (SDC), cholesterol (CH), ABTS, trichloroacetic acid, thiobarbituric acid (TBA), MTT, trehalose and Annexin-V-FITC/PI

were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Soybean phosphatidylcholine (PC) (98% Epikuron 200) was obtained from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

## **2.2. Methods**

### **2.2.1. Preparation of QUE/RES-liposomes**

SDC elastic liposomes containing QUE and RES entrapped in their phospholipid bilayer (Unloaded Lipo, QUE-Lipo, RES-Lipo and QUE/RES-Lipo) were prepared using the thin lipid film method previously described by [Cadena et al. \(2013\)](#). For long-term stability studies, lyophilized liposomes were obtained using threalose (10% w/v) as cryoprotectant. After preparation, liposomes were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and submitted to lyophilization (EZ-DRY, FTSS System, New York, USA) at 200 bars for 48 h.

### **2.2.2. Long-term stability of QUE/RES-liposomes**

The stability of lyophilized liposomes in storage in presence of humidity, luminosity and temperature variation ( $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) was evaluated. After reconstitution with deionized water, samples were analyzed by particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential ( $\zeta$  mV) and drug encapsulation efficiency (EE %) measurements during 300 days of storage. The particle size and PDI of liposomes were determined by standard photon correlation spectroscopy (Delsa™ NanoS Particle analyser, Beckman-Coulter). The zeta potential of liposomes was measured using Malvern 3000HSA zetasizer. Drug encapsulation efficiency was determined through the ultrafiltration/ultracentrifugation technique using Ultrafree® units (Millipore, USA, MW cut-off = 10,000 Da). After centrifugation of the samples (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8776 *g* for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , the contents of QUE and RES in the supernatant were measured according to [Cadena et al. \(2013\)](#).

### **2.2.3. Effect of pH on surface charge of QUE/RES-liposomes**

Titration of liposomal formulations was carried out at pH ranging from 8.0 to 3.0 using a Malvern 3000HSA zetasizer associated with MPT-1 autotitrator. Samples of liposomes (200  $\mu\text{L}$ ) were diluted with 10 ml of deionized water and the pH was automatically adjusted by titration with 1M HCl, 0.25M HCl and 0.25M NaOH. At predefined pH values ranging from 8.0 to 3.0, the zeta potential of liposomes was measured.

### **2.2.4. Lipid peroxidation of QUE/RES-liposomes**

The lipid peroxidation of liposomes was evaluated using thiobarbituric acid reactive species (TBARS) method as previously described ([Draper & Handley, 1990](#)). Briefly, an aliquot of liposomal formulations (400  $\mu\text{L}$ ) was mixed with thiobarbituric acid 0.67%, w/v and was heated in a boiling water bath for 1 h. TBARS were determined at 532 nm and the amount of MDA equivalent (nmol) was calculated using a standard curve of tetramethoxypropane (TMP) ranging from 0.2 to 0.7 nmol.

### 2.2.5. Antioxidant activity of QUE/RES-Liposomes

The antioxidant activity of QUE, RES, their combination (QUE/RES) and all liposomal formulations (Unloaded Lipo, QUE-Lipo, RES-Lipo and QUE/RES-Lipo) was determined by using ABTS\* radical cation. The method is based on the ability of an antioxidant to reduce ABTS\* into its colorless form (Lucas-Abellán et al., 2011). For ABTS\* generation from ABTS salt, 3 mM of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> was reacted with 8 mM ABTS salt in distilled water, for 16 h at room temperature in the dark. The ABTS\* solution was then diluted with ethanol to obtain an initial absorbance of 0.7 at 734 nm, using an Ultrospec 3000 pro UV-Vis spectrophotometer. Fresh ABTS\* solution was prepared every day. The antioxidant abilities were expressed as μM Trolox equivalents by using a Trolox calibration curve prepared for a concentration range of 100 - 2000 μM. Each sample was analyzed in triplicate.

### 2.2.6. Cell viability assay

The cytotoxicity of QUE/RES-liposomes was evaluated on HL-60 cells using the MTT method. The cells were seeded (10<sup>5</sup> cells/well) and plated in 96-well microplates. The test compounds (6.25 – 200 μM) dissolved in DMSO was added to each well and incubated for 72 h at 37 °C. Then, MTT (5.0 mg/mL) was added to the plate and the cytotoxicity of the test compounds was estimated by the ability of living cells to reduce the yellow tetrazolium to a blue formazan product (Nunes et al., 2012). After 3 h, the formazan product was dissolved in DMSO and absorbance was measured using a multi-plate reader. The antiproliferative effect of the test compounds was quantified as the percentage of control absorbance of reduced dye at 560 nm.

### 2.2.7. Cytotoxicity mechanisms

The mechanism of antiproliferative effect of QUE/RES-liposomes on HL-60 cells was evaluated by flow cytometry using annexin V-FITC and PI. HL-60 cells were cultured in 6-well plates. Then were treated with QUE/RES free or encapsulated in elastic liposomes (200  $\mu$ M) for 24 h. Flow cytometric analysis with Annexin V-FITC was done according to the manufacturer's instructions. Cells were trypsinized, centrifuged and washed twice with PBS. Then, cells were resuspended in binding buffer and stained with 5  $\mu$ l of annexin V-FITC at room temperature for 5 min in the dark, followed by the addition of 5  $\mu$ l of PI for another 10 min. AnnexinV-FITC and Propidium iodide (PI) fluorescence were detected by a BD Accury C6 flow cytometer (Becton Dickinson), around 20,000 events (in gated) were acquired. The fluorescence was excited at 488 nm and measured with FL1 filter (530 nm/15 nm) or FL2 filter (585 nm/21 nm) for Annexin V-FITC and PI, respectively. The percentages of distribution of normal cells, cells in early apoptosis, and cells in late apoptosis or necrosis were calculated using BD Accury C6 software (Becton Dickinson).

## 3. Results

### 3.1. Long-term stability of QUE/RES-liposomes

The Figure 1 shows the storage stability of lyophilized QUE/RES-Lipo according to their physicochemical properties. According to Figure 1a, the mean size of vesicles of lyophilized QUE/RES-lipo increased from 138.4 nm (after fabrication, on day 0) to 331.33 nm (300 days of storage) with unvaried PDI values, except at 180<sup>th</sup> day (Fig 1b). The drug encapsulation efficiency remained constant for a year of liposome storage with 87.6 % of quercetin and 92.9 % of resveratrol, with a drug loss of 3.43 % and 6.33 %, respectively (Fig. 1c). Moreover, about 70% of QUE and RES content (%) remained in their non-oxidized forms after hydration of lyophilized liposomes at one year of storage exposed to light (Fig. 1d).

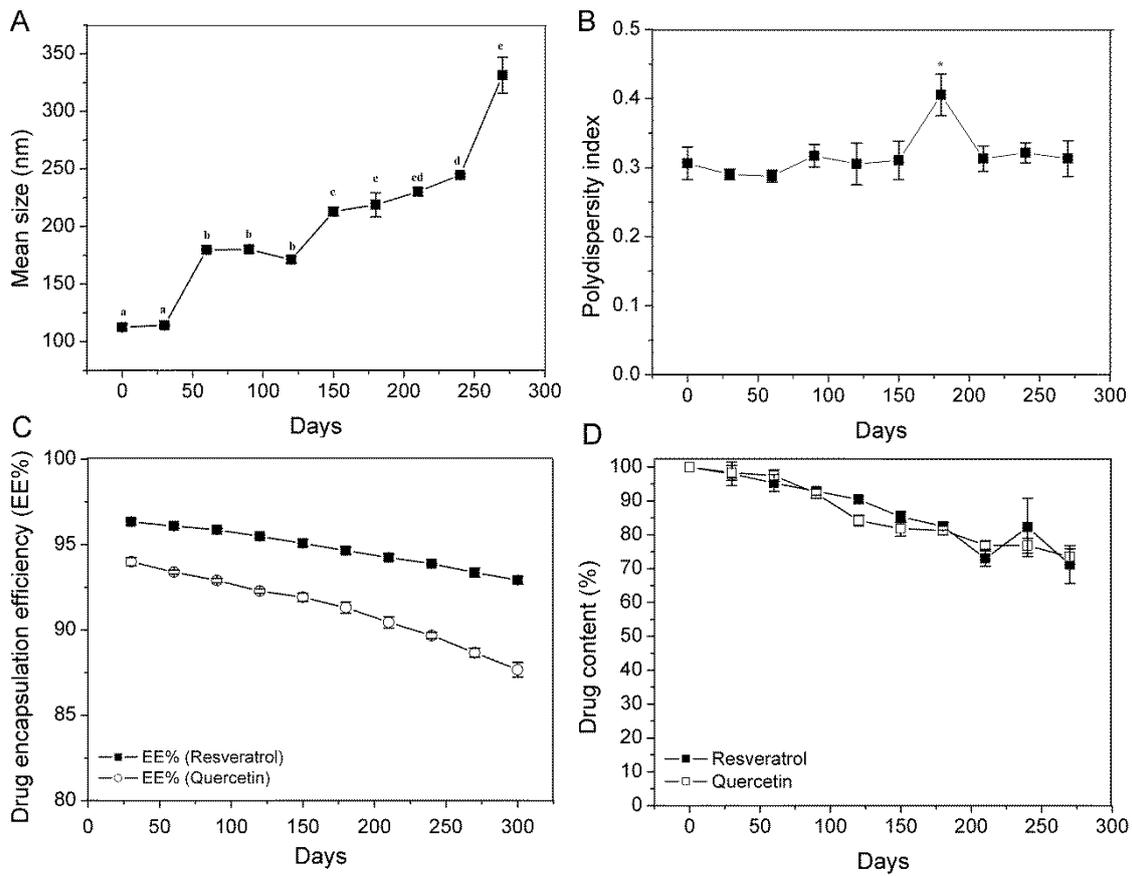


Figure 1. Physicochemical properties of lyophilized QUE/RES-Lipo in storage at  $25 \pm 5$  °C in the presence of humidity and light for 300 days: A. Mean vesicle size (nm); B. Polydispersity index; C. Drug content (%); D. Drug encapsulation efficiency (%).

### 3.2. Effect of pH on surface charge of QUE/RES-liposomes

After titration of liposomes from pH 8.0 to 3.0, the zeta potential gradually increased to 4.83 mV, 6.53 mV and 5.8 mV for QUE/RES-lipo, QUE-lipo and RES-lipo, respectively. No variation of zeta potential was found at pH = 8.0 for all liposomal formulations.

The isoelectric points (pI) of liposomal formulations were 5.02 for unloaded lipo, 4.41 for QUE-Lipo, 4.57 for RES-Lipo and 4.67 for QUE/RES-Lipo.

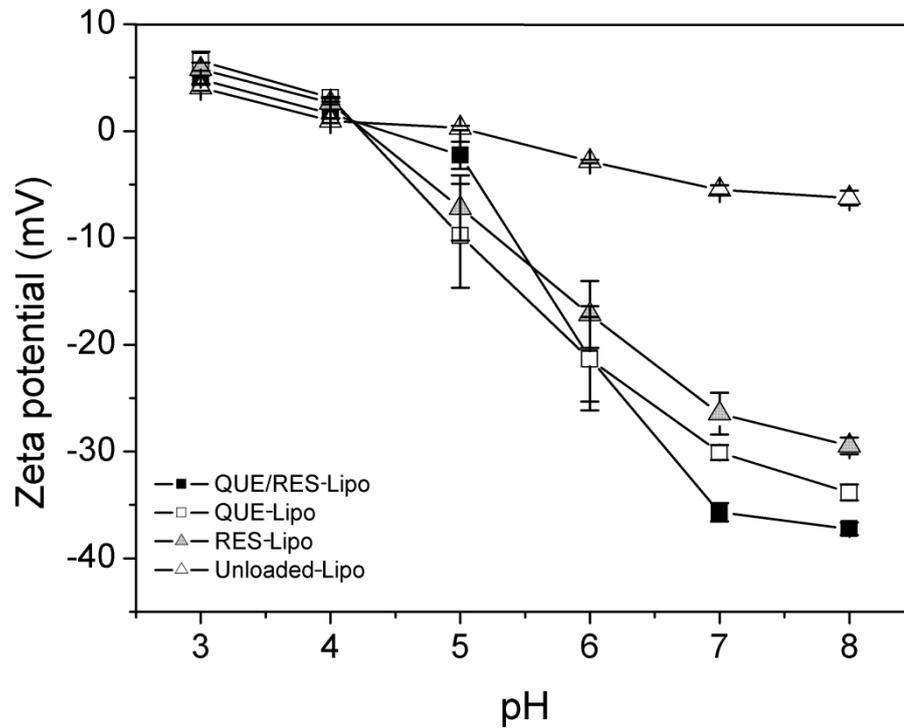


Figure 2. The effect of pH on surface charge (zeta potential) of liposomes.

## 2.2. Antioxidant activity of QUE and RES

The analytical curve of trolox (Fig. 3a) for the linearity assays were plotted with five concentrations allowing the derivation of the following linear fit equation:  $AU = 0.682 (\pm 0.003) - 0.0003 (\pm 0.000001) [\text{Trolox}_{\mu\text{M}}]$ . The analytical curve was validated by the least squares method showing correlation coefficients higher than 0.9999 and the one-way analysis of variance (ANOVA) showing F and p values of 18,999.59 and  $< 0.001$ , respectively. The curve in Fig. 3b show the linear response between QUE and RES concentrations and the  $\mu\text{M}$  Trolox equivalent, with  $IC_{50}$  of  $880 \mu\text{M}$  for QUE and  $1,117.24 \mu\text{M}$  for RES.

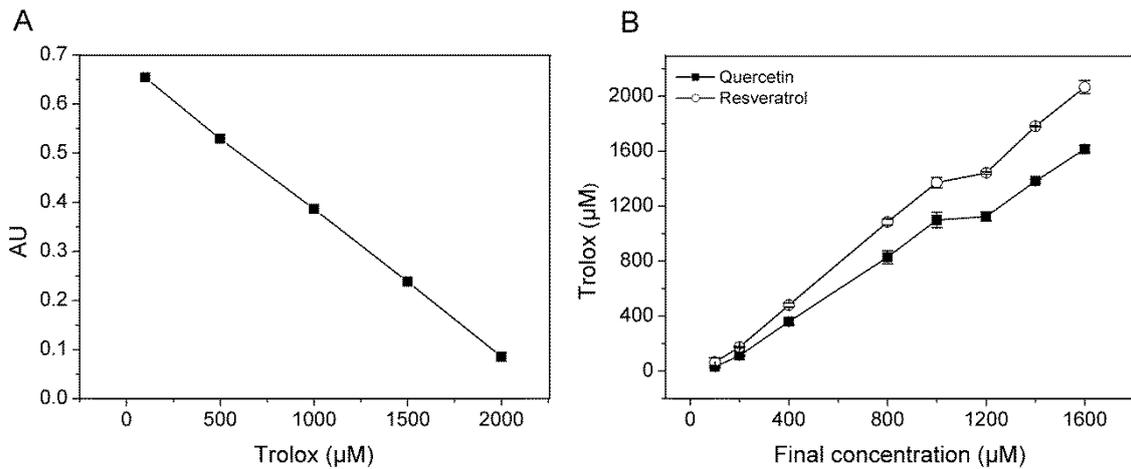


Figure 3. Trolox standard curve (A) and trolox equivalent ( $\mu\text{M}$ ) of quercetin and resveratrol curves (B) at different concentrations using ABTS method.

Figure 4 shows that QUE and RES had antioxidant activity, both free drug and entrapped into elastic liposomes. At a concentration of  $800 \mu\text{M}$ , QUE exhibited higher antioxidant activity than RES (21% higher), with a TEAC value of  $1091.93 \pm 15.4 \mu\text{M}$  Trolox and TEAC of  $867.98 \pm 31.75 \mu\text{M}$  Trolox, respectively. It is important to highlight that the encapsulation of QUE and RES in liposomes attenuate the antioxidant activity and protects the substances from oxidation. The antioxidant activity of QUE/RES-Lipo was 12% higher than QUE/RES, with TEAC of  $1117.69 \pm 60.93 \mu\text{M}$  Trolox. Lyophilized QUE/RES-Lipo showed TEAC of  $639.5442 \pm 15.14 \mu\text{M}$  and antioxidant activity of 29.7%, with loss of only 20% in about 550 days of storage.

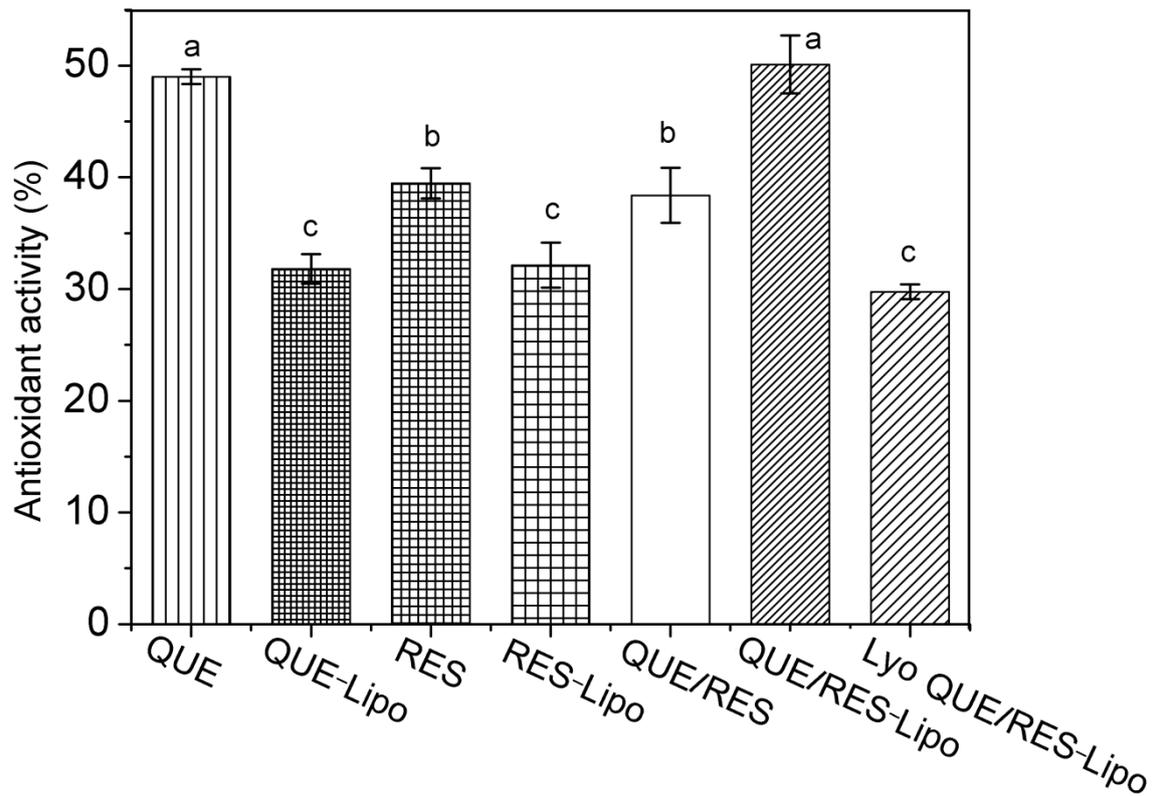


Figure 4. Antioxidant activity of QUE and RES pure and encapsulated into liposomes. Lyophilized QUE/RES-Lipo (Lyo QUE/RES-Lipo) at storage for 550 days was used after redispersion in deionized water.

### 2.3. Lipid peroxidation of liposomes

For quantification of lipid peroxidation content the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) method was used. The lipid peroxidation levels of liposomal formulations tested are shown in Figure 5. All formulations exhibited protective potential for lipid peroxidation of phospholipids that constitutes the liposomes, with a significant decrease with the levels of MDA equivalent relative to unloaded lipo.

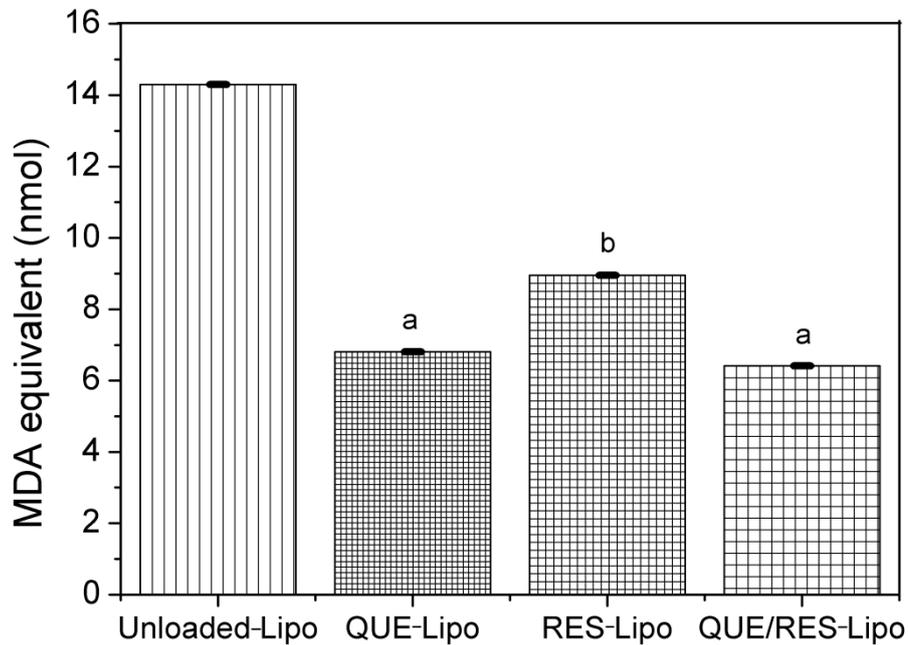


Figure 5: Lipid peroxidation of liposomal formulations. The lipid peroxidation content of was evaluated using thiobarbituric acid reactive species (TBARS) method, with values expressed in MDA equivalent (nmol).

QUE and RES decreased lipid peroxidation levels with  $14.3 \pm (9.2 \times 10^{-5})$  for unloaded liposomes  $8.9 \pm (1.0 \times 10^{-4})$  for QUE-Lipo,  $6.8 \pm (1.6 \times 10^{-4})$  for RES-Lipo and  $6.4 \pm (1.0 \times 10^{-4})$  MDA equivalent nmol for QUE/RES-Lipo. Quercetin reduced lipid peroxidation in 53 %, RES in 38 % and their combination reduced lipid peroxidation in 56 %.

#### 2.4. Cell viability

QUE at lower concentrations increased cell viability in 13%, showing a proliferative effect on HL-60 cells (Fig. 6). However, at higher concentrations, QUE was capable to reduce the cell viability, with an  $IC_{50}$  of 811  $\mu$ M. QUE-Lipo also exhibit antiproliferative activity, but in a more effective way, with an  $IC_{50}$  of 85.43  $\mu$ M. Both RES and RES-Lipo exhibited antiproliferative activity with  $IC_{50}$  of 131.7 and 113  $\mu$ M, respectively (Table 1). The co-

encapsulation of QUE and RES in liposomes improved the antiproliferative effect of these compounds with an  $IC_{50}$  of  $60.71 \mu\text{M}$ , which corresponds to a decrease of 57.84% ( $IC_{50}$  of QUE/RES=  $144.23\mu\text{M}$ ).

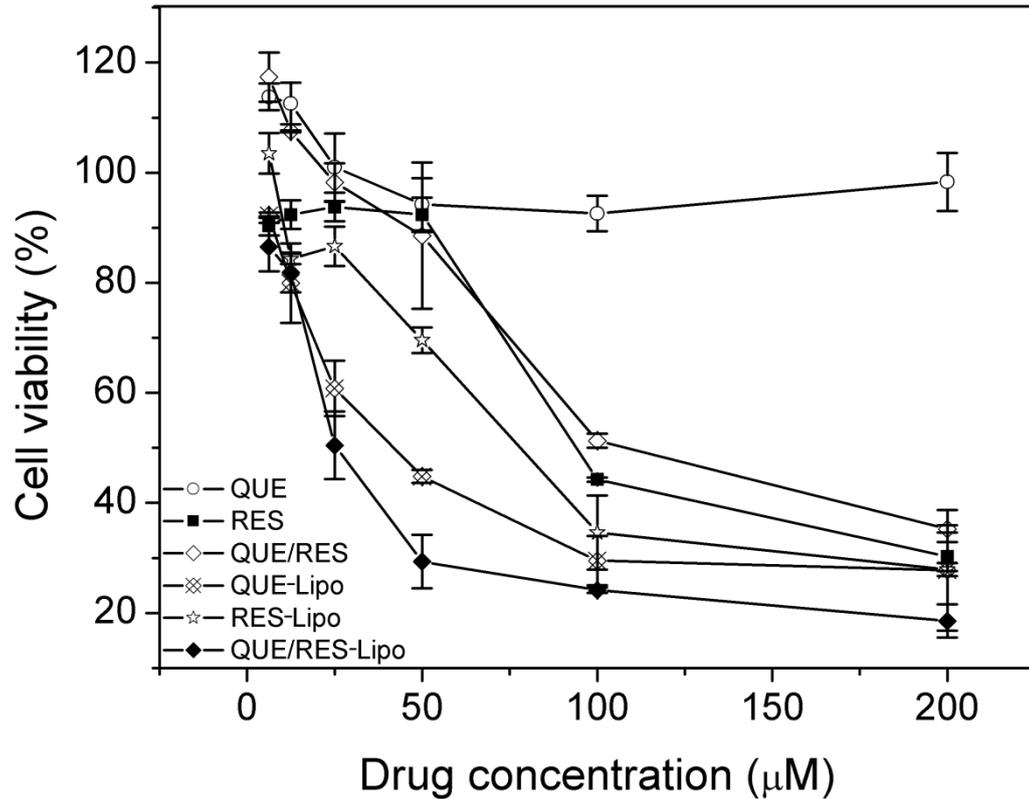


Figure 6. Viability of HL-60 cells treated with QUE and RES, as individual compounds or loaded into liposomes. Cells were incubated with compounds at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$ ) for 72 h. Cell viability was determined using the MTT colorimetric assay.

Table 1. The antiproliferative activity, expressed as IC<sub>50</sub>, of QUE/RES-liposomes on HL-60 cells in comparison with pure compounds.

Test compounds	IC <sub>50</sub> (μM)
QUE	811.94
RES	131.70
QUE/RES	144.23
QUE-Lipo	85.43
RES-Lipo	113
QUE/RES-Lipo	60.71

## 2.5. Cytotoxicity mechanisms

Analysis of the cell populations showed different sets of populations, wherein Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> was designated as control, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> were designated as early apoptotic, Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> were designated as late apoptotic, and Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> were designated as necrotic. When we evaluated the cell death mechanism by apoptosis (annexin staining) in HL-60 cells, QUE/RES-Lipo had more efficient apoptotic activity, with 81.8% of cell death, than QUE/RES that had 25.8 % for this mechanism. However, at the necrosis mechanism (PI staining) the control cells showed a low percentage about 22.6% of cells labeled that was similar to that of cells treated with QUE/RES-Lipo, which was about 24.0% cells labeled (Figure 7).

Therefore, the results indicate that the treatment with QUE/RES and QUE/RES-Lipo decreased the number of living cells and cell death mechanism was induced by apoptosis predominately. Moreover, quercetin and resveratrol loaded in liposomes had more effective antiproliferative activity, enhancing the cell death by apoptosis in 60%, comparing at free QUE/RES.

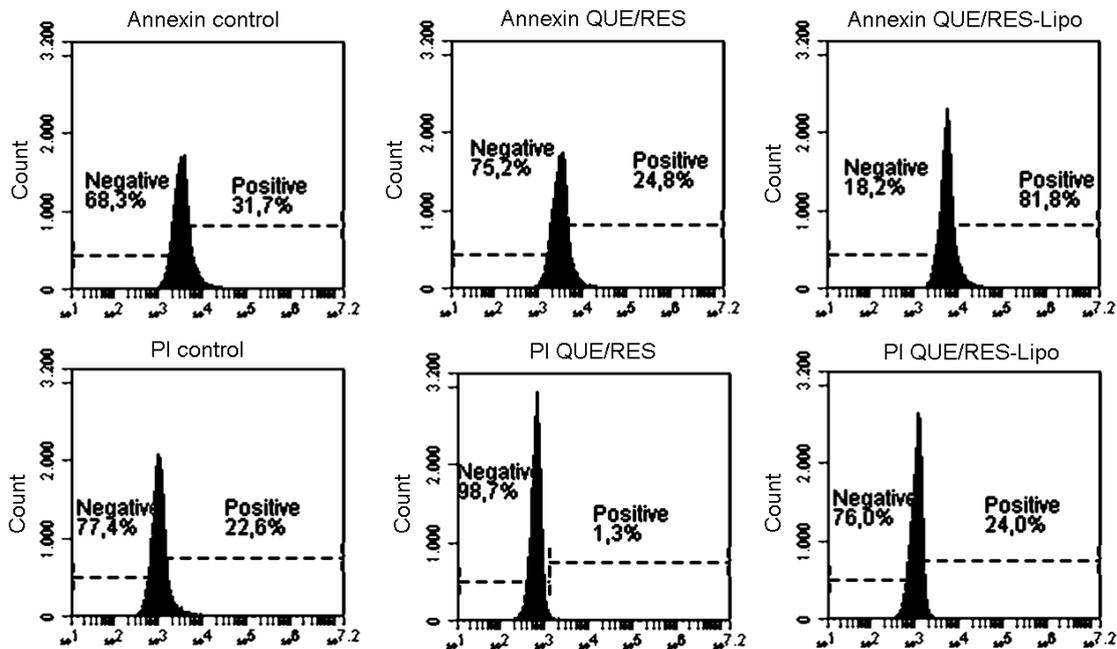


Figure 7: Apoptosis and necrosis induced by QUE and RES, free or loaded in elastic liposomes in HL-60 leukemia cells using flow cytometric analysis of Annexin V-FITC and PI stained. Cells untreated (control) or treated with QUE/RES and QUE/RES-Lipo at the concentration of 200  $\mu$ M. The % of apoptotic cells was calculated by BD Accuri C6 software.

### 3. DISCUSSION

In this paper, we analyzed the stability, antioxidant activity and the effect of quercetin and resveratrol encapsulated in elastic liposomes on HL-60 cells proliferation, and evaluated if their encapsulation in liposomes can enhance the antiproliferative activity of these compounds.

According to the storage stability, lyophilized QUE/RES-Lipo remained stable for 300 days, with no significant variation of drug encapsulation efficiency, PDI and particle size. After 180 days, the lyophilized QUE/RES-Lipo showed particle size higher than 200 nm. Previously, [Harashima et al. \(1994\)](#) found that the opsonization of liposomes by macrophages is reduced with the decrease of liposomes particle size (from 800 to 200 nm). Opsonins bind to liposomes depending on their particle size and phagocytic cells take up liposomes in proportion to the extent of opsonization. With particle size of 200 nm, no enhance in liposomes uptake was observed.

After 280 days, QUE/RES-Lipo remained with a higher EE % (> 87 %), with drug loss of 6.33 %. These results suggest that lyophilization increases the shelf-life of liposomal formulation and preserves it in dried form to be reconstituted with water prior to administration ([Ghanbarzadeh et al., 2013](#)).

It is worth mentioning that the storage stability was conducted to simulate the storage conditions that are available to patients in their home, with presence of humidity, temperature variation of  $\pm 5$  °C and lack protection of light, which does not fit in standard storage conditions of lyophilised products ([Glavas-Dodov et al., 2005](#)).

The titration curve was developed to analyze the effects of pH variation in surface charge of elastic liposomes and evaluate the stability of these vesicles against the limits of pH values. As shown in the titration curve, the zeta potentials of liposomal formulations were gradually increased with the decrease of pH from 8.0 to 3.0. This fact can be explained by the acid neutralization of phosphate polar head group of phosphatidylcholine that may occur in presence of H<sup>+</sup> ions ([Channarong et al., 2010](#)). On the other hand, the neutralization by H<sup>+</sup> ions of ionized drugs present on the outer side of the phospholipid bilayer of liposomes ([Terao et al., 1994](#)) may occur.

Another important point that should be taken into consideration is the presence of different values of isoelectric point (pI) for each liposomal formulation tested. The value for elastic liposomes was found in the range from 4.41 to 4.67. These results suggest that liposomes in pH 7.4 will have surface charge higher than -29 mV. Liposomes are used as a model for artificial cells and pI is important because in this pH value the passage of drugs through membrane is facilitated by the annulment of charges ([Englund and Lundahl, 1991](#)).

Numerous studies aimed to investigate the antioxidant activity of flavonoids, and tried to establish the relationship between flavonoid structure and their radical scavenging activity. This activity depends mainly on the substitution pattern of the hydroxyl groups, that is, on the availability of phenolic hydrogens and on the possibility of stabilizing the resulting flavonoid phenoxyl radicals ([Amic and Lucic, 2010](#)).

The antioxidant activity of QUE and RES, as individual compounds and encapsulated in elastic liposomes was quantified using the ABTS method. This assay is frequently used for assessing antioxidant activity and developing structure–activity relationships (SARs) of flavonoids and is based on the scavenging of the ABTS radical and converting it into a colorless product (Re et al., 1999). The antioxidant activity is expressed as TEAC, which is defined as the millimolar concentration of a Trolox solution with the same antioxidant activity as a 1.0 mM concentration of the number of hydroxyl groups (Arnao et al., 1999).

Studies reported that quercetin and resveratrol are important antioxidants. According to Iacopini et al. (2008), quercetin has higher radical scavenging activity than resveratrol, with concentration that inhibits 50 % of oxidation reaction ( $IC_{50}$ ) 20 % lower. The experimental results of this study showed that with the same concentration, the activity of quercetin (TEAC of  $1091.93 \pm 15.4 \mu\text{M}$ ) of scavenging ABTS free radical was stronger than the activity of resveratrol (TEAC of  $867.98 \pm 31.75 \mu\text{M}$ ). Quercetin had a decreased of 21 % in  $IC_{50}$ , comparing with resveratrol, according to study described above. In order to evaluate if the antioxidant activity of quercetin and resveratrol remains the same when entrapped in liposomes, different liposomal formulations were tested. The antioxidant activity of QUE and RES remained presented when entrapped into elastic liposomes and were 12 % higher than QUE and RES as individual compounds with TEAC of  $1117.69 \pm 60.93 \mu\text{M}$ . The lyophilized QUE/RES-Lipo, with 550 days of storage, remained with a notable antioxidant activity, decreasing only 20%.

Another consequence of the antioxidant activity of QUE and RES is their ability to prevent or decrease the lipid peroxidation in phospholipid bilayers when they are loaded in liposomes. Lipid peroxidation is the oxidation/degradation chain reaction process of the unsaturated fatty acid. In the extensional process of lipid peroxidation, there will generate different types of free radicals, such as oxygen free radicals, fat-oxygen free radical and fat free

radicals (Reis and Spickett, 2012). In the final stage, small molecules will be generated, such as the malondialdehyde (MDA). MDA is the most important stable product of lipid peroxidation. The products can do harm to several cell functions. There is a close relationship between the cell damage and many kinds of diseases (Fabris et al., 2008). It may be beneficial to enhance properly antioxidation products to improve the stability of liposomal formulations and prevent diseases.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) is the product of color reaction between MDA and thiobarbituric acid (TBA). By measuring the content of the produced TBARS, the study will indicate the extent of the lipid peroxidation and confirm if QUE and RES are capable to prevent phospholipid peroxidation and corroborate to the stability of liposomal formulation. Gordon and Roedig-Penman (1998) found that the antioxidant activity of quercetin was capable to enhance the stability of liposomes at pH 7.4, by reducing the lipid peroxidation and this liposomal formulation (with QUE as individual compound) remained stable for 2000 h.

In the present study we found that the antioxidant potential of QUE and RES was capable to decrease the lipid peroxidation of elastic liposomes about 53% for elastic liposomes with QUE entrapped, 38% for liposomes with RES and 56% for elastic liposomes containing the association of both (QUE/RES). All these findings prove that the association of quercetin and resveratrol loaded in liposomes is more effective in the enhancement of the stability of liposomal formulations.

Based on radical scavenging ability of flavonoids and polyphenols, Hsu & Yen (2006) established a relationship between antioxidant activity and apoptosis-inducing potential of flavonoids and polyphenolic compounds. They found a significant correlation between the influence of flavonoids on cell population growth and their TEAC value. These results suggest that flavonoids tested on cell population growth were well correlated with their antioxidant activity. After, they investigate the mechanism of cell death using flow cytometry with Annexin-V and PI staining, and found that these flavonoids cause 31% of cell death by apoptosis.

The effects of flavonoids on integrity and cell function varied from cytoprotection to cytotoxicity. Recently, the cytotoxicity of flavonoids and polyphenolic compounds, including apigenin, eriodictyol, 3-hydroxyflavone, kaempferol, luteolin, naringenin, taxifolin quercetin, rutin, and resveratrol toward cultured normal cells and tumor cells lines, including HL-60 cells, has been widely investigated (Akbas et al., 2005 and Matsuo et al., 2005). A study developed by Araújo et al. (2013) reported that the treatment of HL-60 cells with quercetin reduced cell viability in 50%, at 14 mg/mL, after 24 h. Surh et al. (1999) demonstrates that the treatment of HL-60 cells with resveratrol reduced the cell viability and induced cell death by apoptosis.

Attar et al. (1999) found that the association of resveratrol (50 mM) and quercetin (10–50 mM) elicited a more than additive response in the reduction of proliferation of oral squamous carcinoma cell, reducing cell viability in 50%. Mertens-Talcott and Percival (2005) also found that HL-60 cells treated with resveratrol and quercetin as single compounds showed reduced cell viability. Quercetin was more effective than resveratrol, lowering total cell number to 48% of control cells, whereas resveratrol lowered cell number to 72%. The effects caused by the combination of quercetin with resveratrol demonstrated an additive interaction of these compounds.

To affirm QUE and RES ability to cause cell death by apoptosis is related to their antioxidant activity, a cell viability assay was performed on HL-60 cells. The treatment of HL-60 cells with quercetin and resveratrol as individual compounds reduced the cell viability with  $IC_{50}$  of 811.94  $\mu$ M for QUE, 131.7  $\mu$ M for RES, 144.23  $\mu$ M for the association of QUE/RES. Our study corroborate with studies described above.

To evaluate if the antiproliferative activity of quercetin and resveratrol can enhance with the encapsulation of these flavonoids in liposomes, QUE-Lipo, RES-Lipo and QUE/RES-Lipo was tested. QUE and RES entrapped in elastic liposomes presented the best antiproliferative activity in HL-60 living cells, with the lower  $IC_{50}$ , about 60.71  $\mu$ M against 85.43  $\mu$ M for QUE-Lipo and 113  $\mu$ M for RES-Lipo. These results suggest that the association of quercetin and resveratrol entrapped in liposomes can enhance the antiproliferative activity in and reduce the  $IC_{50}$  in 25%, comparing with QUE and RES encapsulated as individual compounds.

We also investigated the mechanism of cell death of free QUE and RES in association or entrapped into liposomes. Our study showed that quercetin and resveratrol encapsulated into liposomes increased the cell death by apoptosis about 60%, comparing with the association of QUE and RES as individual compounds, with 81.8% of cell death caused by apoptosis for QUE/RES-Lipo and 24.8% for free QUE/RES. These results suggest a controlled released profile of QUE/RES from liposomes as previously reported by [Cadena et al. \(2013\)](#), which contributes to the antiproliferative effect of QUE and RES, being more efficient in inducing HL-60 cell death than free QUE and RES in association.

#### **4. CONCLUSIONS**

In this study we have shown that quercetin and resveratrol, as individual compounds or in association, free or loaded in elastic liposomes, had antioxidant activity, preventing the lipid peroxidation of liposomes. This ability as radical scavenging is very important because can enhance the stability of the liposomal formulations. We also conclude that the combination of QUE/RES causes the enhancement of antioxidant and antiproliferative activities. However, quercetin and resveratrol loaded in elastic liposomes were more efficient and had the best antioxidant activity, lower lipid peroxidation value and higher antiproliferative effect, with 81.8% of cell death caused by apoptosis. In this way, this liposomal formulation can be tested as an approach tool to the treatment of leukemia. Currently, more *in vitro* and *in vivo* studies are being conducted to improve the efficacy of this formulation to be used in treatment of cancer.

#### **LIST OF ABBREVIATIONS**

QUE - Quercetin

RES - Resveratrol

SDC – Sodium deoxycholate

QUE-Lipo – Elastic liposomes with quercetin entrapped

RES-Lipo – Elastic liposomes with resveratrol entrapped

QUE/RES-Lipo – Elastic liposomes with quercetin and resveratrol entrapped

## ACKNOWLEDGMENTS

The first author is grateful to the Foundation for science and technology development of the Pernambuco state of Brazil — FACEPE for a Msc. scholarship. The authors thank the Brazilian council for research and technological development, CNPq (grant# 477463) and FACEPE (grant # APQ0676-4.03/10) for financial support.

## REFERENCES

Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J., Ha, T. (2008) The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 545–549.

Akbas, S.H., Timur, M., Ozben, T., (2005) The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J. Surg. Res.* 125 (1), 49–55.

Allan K. E. et al. (2009) UV light stability of  $\alpha$ -cyclodextrin/resveratrol host-guest complexes and isomer stability at varying pH. *Australian Journal of Chemistry.* v. 62, n. 8, p. 921-926.

Amic, D., Lucic, B. (2005) Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 28–35.

Araújo, K.C.F., Costa, E.M.M.B., Pazini, F., Valadares, M.C., Oliveira, V. (2013) Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. *Food and Chemical Toxicology* 51, 93–96.

Arnao M.B., Cano A., Acosta M., (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.*, 31, 589-596.

Arshad N. et al. (2009) Electrochemical investigations of antioxidant interactions with radical anion and dianion of 1,3-dinitrobenzene. *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 26, p. 6184-6189,

Athar M., Back J. H., Tang X., Kim K. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L. (2007) Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224, 274–283.

Atten, M.J., Godoy-Romero, E., Attar, B.M., Milson, T., Zopel, M., Holian, O., (2005) Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest. New Drugs* 23, 111–119.

Braganhol, E., Zamin, L.L., Canedo, A.D., Horn, F., Tamajusuku, A.S., Wink, M.R., Salbego, C., Battastini, A.M., (2006) Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs* 17, 663–671.

Cadena, P. G., Pereira, M. A., Cordeiro, R. B. S., Cavalcanti, I. M. F., Barros-Neto, B., Pimentel, M. C. C. B., Lima-Filho, J. L., Silva, V. L., Santos-Magalhães, N. S. (2013)

Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 309–316.

Cevc, G. and Blume, G. (2001) New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1514, 191-205.

Channarong, S., Chaicumpa, W., Sinchaipanid, N., Mitrevej, A. (2010) Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral dna vaccine: the improvement of peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. *AAPS PharmSciTech*, Vol. 12, No. 1, March 2011.

Chen, S., Xiao, X., Feng, X., Lia, W., Zhou, N., Zheng, L., Sun, Y., Zhang, Z., Zhu, W. (2012) Resveratrol induces Sirt1-dependent apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK and suppressing AKT activity and survivin expression. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 1100–1112.

Choi, E., Bae, S. M., Ahn, W. S., (2008) Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Archives of Pharmacal Research* 31, 1281–1285.

Duraj, J., Zazrivcova, K., Bodo, J., Sulikova, M., Sedlak, J., (2005) Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma* 52, 273–279.

Draper, H. H., Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* ;186:421-31.

Englund A. K., Lundahl P. (1991) The isoelectric point of the human red cell glucose transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1065, 185-194.

Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., Stevanato, R. (2008) Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry* 135, 76–83.

Fahlman M. B., and Krol E. S. (2009) Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (12), 5301-5305.

Galati G., Sabzevari O., Wilson J. X., O'Brien P. J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177, 91–104.

Gao, S., Liu, G.Z., Wang, Z., (2004) Modulation of androgen receptor-dependent transcription by resveratrol and genistein in prostate cancer cells. *Prostate* 59, 214–225.

Ghanbarzadeh, S., Valizadeh, H., Zakeri-Milani, P. (2013) The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 25-29

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzia E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S., Hincal, A.A. (2005) The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics* 291, 79–86.

Gordon, M.H., Roedig-Penman, A. (1998) Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 97, 79–85.

Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H. (1994) Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical research*, vol. 11, N° 3.

Hidalgo-Rodríguez M., Fuguet E., Ràfols C., Rosés M. (2010) Solute–solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography: VII. Characterization of sodium cholate–sodium deoxycholate mixed-micellar systems. *Journal of Chromatography A*, 1217 1701–1708.

Honda, T., Ishii, A., Inui, M. (2013) Regulation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by PDZRN3. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C1091-C1097.

Hsieh, T. C., Wang, Z., Hamby, C.V., Wu, J.M., (2005) Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 223–230.

Hsieh, T. C., Wu, J. M., (2009) Targeting CWR22 Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Research* 29, 4025–4032.

Hsu, C., Yen, G. (2006) Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 1072 – 1079.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. (2008) Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 21 589– 598.

Kang, J. W., Kim, J. H., Song, K., Kim, S. H., Yoon, J. H., Kim, K. S., (2010) Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGb761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytotherapy Research* 24, S77–S82.

Kimura, Y., Okuda, H., (2001) Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J. Nutr.* 131, 1844–1849.

Lasic, D.D. (1998) Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol.* 16 307–321.

Li, B., Konecna, S., Harich, K., Wegiel, L., Taylor, L. S., Edgar, K. J. (2013) Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. *Carbohydrate Polymers* 92 2033–2040.

Liu R., Li D., He B., Xu X., Sheng M., Lai Y., Wang G., Gu Z. (2011) Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly(L-histidine)-poly(L-lactide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 152, 49–56.

Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. (2013) Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology* 49 1255–1260.

Martini, C. N., Gabrielli, M., Vila, M. C. (2012) A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology in Vitro* 26 1007–1013.

Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., Kaneko, T., (2005) Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2), 253–259.

Michels, G., Watjen, W., Weber, N., et al., (2006) Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology* 225, 173–182.

Moon, J., Do, H., Kim, O. Y., Shin, M. (2013) Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food and Chemical Toxicology* 58, 347–354.

Mertens-Talcott, S. U., Percival S. S. (2005) Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters* 218, 141–151.

Mousa, S.S., Mousa, S.S., Mousa, S.A., (2005) Effect of resveratrol on angiogenesis and platelet/fibrin-accelerated tumor growth in the chick chorioallantoic membrane model. *Nutr. Cancer* 52, 59–65.

Mouria, M., Gukovskaya, A.S., Jung, Y., Buechler, P., Hines, O.J., Reber, H.A., Pandol, S.J., (2002) Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *Int. J. Cancer* 98, 761–769.

Nicholls, S. G. (2013) Standards and classification: A perspective on the ‘obesity epidemic’. *Social Science & Medicine* 87 9-15.

Nicolini, G., Rigolio, R., Miloso, M., Bertelli, A.A., Tredici, G., (2001) Antiapoptotic effect of trans-resveratrol on paclitaxel-induced apoptosis in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Neurosci. Lett.* 302, 41–44.

Nunes, E. S., Souza, M. A. A., Vaz, A. F. M., Silva, T. G., Aguiar, J. S., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., Guarnieri, M. C., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S. (2012) Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon* 59 667–671.

Park, H. J., Yang, J., Ambati, S., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Rayalam, S., Baile, C. A. (2008) Combined Effects of Genistein, Quercetin and Resveratrol in Human and 3T3-L1 Adipocytes. *J Med Food* 11 (4), 773–783.

Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B. K. (1998) Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Vaccine*. Vol. 16, No. 213. pp. 188-195.

Priego, S., Feddi, F., Ferrer, P., Mena, S., Benlloch, M., Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., Asensi, M., Estrela, J. M., (2008) Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxidedismutase2-dependent mechanism. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 3330–3342.

Rafter J. J., (2002) Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer, *Br. J. Nutr.* 88 (Suppl. 2) S219–S224.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.

Reis A, Spickett CM. (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta*. Oct; 1818(10):2374-87.

Roy M., Chakrabarty S., Sinha D., Bhattacharya R.K., Siddiqi M., (2003) Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol, *Mutat. Res.* 523–524, 33–41.

Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N., Ghidoni, R., (2003) Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast

cancer cells via de novo ceramide signaling.03-0292 fje.

Siriwardhana, N., Kalupahanab, N. S., Cekanovac, M., LeMieuxa, M., Greerd, B., Moustaid-Moussa, N. (2013) Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24 613–623.

Su, J.L., Lin, M.T., Hong, C.C., et al., (2005) Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Carcinogenesis* 26, 1–10.

Surh, Y.J., Hurh, Y.J., Kang, J.Y., Lee, E., Kong, G., Lee, S.J. (1999) Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters* 140, 1-10.

Strobel, P., Allard, C., Perez-Acle, T., Calderon, R., Aldunate, R., Leighton, F. (2005) Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J*;386:471–478.

Terao, J., Piskula, M., Yao, Q. (1994) Protective effect of epichatecin, epichatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation phospholipid bilayers. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 308, No. 1, January, pp. 278 – 284.

Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., Nagini, S., (2010) The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated

apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *European Journal of Pharmacology* 649, 84–89.

Wang, K., Wu, Y. (2013) Dual-functionalization based on combination of quercetin compound and rare earth nanoparticle. *Journal of Rare Earths* Volume 31, Issue 7, Pages 709–714.

Williams, D. J., Edwards, D. , Hamernig, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S. K., Tapsell, L. C. (2013) Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International* 52 323–333.

Xie, X., Yin, J., Jia, Q., Wang, J., Zou, C., Brewer, K. J., Colombo, C., Wang, Y., Huang, G., Shen, J., (2010) Quercetin induces apoptosis in the methotrexate-resistant osteosarcoma cell line U2-OS/MTX300 via mitochondrial dysfunction and dephosphorylation of Akt. *Oncology Reports* 26, 687–693.

Zhang, Y., Huang, C. (2012) Targeting adipocyte apoptosis: A novel strategy for obesity therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 1–4.