



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PABYTON GONÇALVES CADENA

**NANOENCAPSULAÇÃO DE QUERCETINA E
RESVERATROL EM LIPOSSOMAS ELÁSTICOS
CONTENDO DESOXYCOLATO DE SÓDIO**

RECIFE, 2012

PABYTON GONÇALVES CADENA

**NANOENCAPSULAÇÃO DE QUERCETINA E RESVERATROL EM
LIPOSSOMAS ELÁSTICOS CONTENDO DESOXICOLATO DE SÓDIO**

Tese apresentada para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas pela Universidade Federal
de Pernambuco

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

COORIENTADORA:

Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva

COLABORADORES

Profa. Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

RECIFE, 2012

Cadena, Pabyton Gonçalves

Nanoencapsulação de quercetina e resveratrol em lipossomas elásticos contendo desoxicolato de sódio/ Pabyton Gonçalves Cadena. – Recife: O Autor, 2012.

163 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Valdinete Lins da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Nanotecnologia 2. Fosfolipídios 3. Flavonoides I. Magalhães, Nereide Estela Santos II. Silva, Valdinete Lins da III. Título.**

620.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-063

PABYTON GONÇALVES CADENA

**NANOENCAPSULAÇÃO DE QUERCETINA E RESVERATROL EM
LIPOSSOMAS ELÁSTICOS CONTENDO DESOXICOLATO DE SÓDIO**

Tese apresentada para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas pela Universidade Federal
de Pernambuco

Aprovado em 09 de março de 2012

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães – Presidente

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior – Examinador Interno

Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Examinador Interno

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva – Examinador Externo

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira – Examinador Externo

*Aos meus pais, Luciene e Severino, a
minha esposa Marilia por sempre
acreditarem em mim e a todos os meus
familiares e amigos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar nos caminhos da vida;

Aos meus pais Severino e Luciene, irmão Thiago e esposa Marília, amo todos vocês, pela convivência, apoio e aprendizado;

A todos os meus familiares em especial a minha avó Iracema, que tanto amo;

À minha orientadora Prof.^a Nereide Stela Santos Magalhães e aos professores Valdinete Lins da Silva, Maria do Carmo de Barros Pimentel, Alberto da Nova Araújo, Maria Conceição Montenegro e José Luiz de Lima Filho pela paciência e dedicação;

Ao professor Benício de Barros Neto (in memoriam) pelos conhecimentos adquiridos;

Aos meus amigos Hiram Falcão, Vitor Cardim, Rivaldo Antônio, Moacir Paulo, Flávio Silva, Arturo Costa, Indra Helena pela força e momentos felizes;

À Universidade Federal de Pernambuco, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a todos os professores que contribuíram para a minha formação;

À Facepe, CNPq e UFPE pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos do SLC e PPGCB: Isabella, Patrícia, Milena, Islene, André, Fábio, Hywre e a todos os alunos e funcionários pelos momentos felizes e empenho nos trabalhos.

As minhas Co-orientandas Marcela Araújo e Rafaela batista pela enorme ajuda e espírito de cooperação;

Aos meus amigos do LIKA Roberto Afonso, Roberto Mota, Alessandro, Germana, Marcela, Carol, Moisés e seus cafés, Vera, Sérgio (Microscopia eletrônica), Rafael Padilha (Microscopia eletrônica), Sr. Otaviano, Felipe.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*O único caminho para desvendar os limites do possível
é aventurar-se além dele, através do impossível.*

(Arthur C. Clarke)

RESUMO

Várias moléculas naturais são agentes potenciais para o tratamento da obesidade e outras doenças relacionadas ao acúmulo de gordura subcutânea, sendo o desoxicolato de sódio (SDC ou DCA) bastante usado desde 2001. Outras moléculas de origem natural também foram descobertas com efeitos sobre a inibição da adipogênese em pré-adipócitos e indução de apoptose em adipócitos maduros. Recentemente descobriu-se que flavonoides como a quercetina (QUE) e resveratrol (RES) apresentam esta desejada ação apoptótica e antiadipogênica em tecido adiposo comprovado por estudos *in vitro* em células humanas. Entretanto estas moléculas podem apresentar elevada toxicidade como o SDC e baixa biodisponibilidade devido ao caráter hidrofóbico como QUE e RES. Diante do exposto a nanotecnologia farmacêutica, através de lipossomas, pode apresentar-se como uma alternativa para superar estas limitações. Esta Tese tem por objetivo a obtenção de um produto à base de uma formulação lipossomal em escala nanométrica para administração por via subcutânea contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol livres e/ou complexados a ciclodextrinas. Um método de complexação de sais biliares, como o SDC e o ácido ursodesoxicólico (UDCA), em ciclodextrinas foi desenvolvido e usado na determinação destas substâncias. O SDC também foi usado como um dos constituintes de lipossomas elásticos para a nanoencapsulação de QUE e RES. O aumento da temperatura causou variações nas absorbâncias em todos os complexos de inclusão, entretanto, 20-30 °C foi encontrado o melhor intervalo para a determinação dos ácidos biliares. A temperatura causou um efeito negativo na constante de equilíbrio resultando em valores altamente negativos de entalpia (β -CD-DCA: $-10,25 \pm 1,48$ e β -CD-UDCA: $-12,47 \pm 0,96$ kJ·mol⁻¹) e valores positivos de entropia (β -CD-DCA: $50,31 \pm 4,74$ e β -CD-UDCA: $43,42 \pm 3,12$ J·mol⁻¹). Em todos os casos, as reações de complexação competitiva foram espontâneas. Os complexos de inclusão foram estáveis por 12 dias tendo um tempo de meia vida de 68,71 dias para o DCA e 294,71 dias para a determinação do UDCA. O método foi validado pela metodologia da ANVISA e EMEA apresentando limites de detecção e de quantificação de $3,94 \times 10^{-5}$ mol·L⁻¹ e $1,31 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ para o DCA e $4,08 \times 10^{-5}$ mol·L⁻¹ e $1,36 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ para o UDCA, respectivamente. Amostras dos ácidos biliares foram determinadas em formulações farmacêuticas com variação de 4% para o DCA e 1% para o UDCA. A reação de complexação competitiva também foi aplicada na construção de sensores químicos. A melhor formulação lipossomal produzida reduziu o uso de fosfatidilcolina e colesterol em 17,7% e 68,4%, respectivamente, em relação às primeiras formulações produzidas. Os lipossomas tiveram um diâmetro médio de 149 nm com índice de polidispersão de 0,3. O potencial zeta dos lipossomas foi negativo (-13,1 mV) devido à presença do SDC na bicamada lipídica. A eficiência de encapsulação de QUE e RES nos lipossomas foi maior que 97%. A cinética de liberação de QUE e RES a partir dos lipossomas também foi estudada havendo liberação controlada por mais de 50 h e liberação máxima de 96% para QUE e RES. Foi possível nanoencapsular 23 vezes (4620 µM) mais flavonoides que a concentração (100 µM) reportada na literatura que apresenta efeitos apoptóticos e antiadipogênicos. Podemos concluir que as formulações lipossomais elásticas produzidas são adequadas para a injeção subcutânea, podendo proporcionar uma nova estratégia para redução de gordura subcutânea.

Palavras-chave: Desoxicolato de sódio, Quercetina, Resveratrol, Lipossomas, Ciclodextrina.

ABSTRACT

Several natural molecules are potential agents for treatment of obesity and other related diseases to the accumulation of subcutaneous fat being sodium deoxycholate (SDC) often used since 2001. Other molecules of natural origin as also found with effects on the inhibition of adipogenesis in pre-adipocytes and induction of apoptosis in mature adipocytes. Recently it has been found that flavonoids such as quercetin (QUE) and resveratrol (RES) show this desired apoptotic and anti-adipogenic effect in fatty tissue and evidenced by *in vitro* studies in human cells. However, these molecules may have high toxicity such as SDC or low biodisponibility due to hydrophobic character as QUE and RES. In this framework, the pharmaceutical nanotechnology, via liposomes, may present as an alternative to overcome these limitations. The aim of this Thesis was to do a product based in a nanosize liposomal formulation containing sodium deoxycholate, quercetin and resveratrol free and / or complexed with cyclodextrins to be administrated by subcutaneous injection. A method for the complexation of bile salts, as SDC and ursodeoxycholic acid (UDCA), in cyclodextrins was developed and used for determining of these molecules. The SDC was also used as constituent in elastic liposomes for nanoencapsulation of QUE and RES. The increase in temperature caused absorbance variation for all inclusion complexes; however, 20-30 °C was the best range for the bile acids determination. The temperature had a negative effect on the equilibrium constant resulting in high negative values of enthalpy (β -CD-DCA: -10.25 ± 1.48 and β -CD-UDCA: -12.47 ± 0.96 kJ·mol⁻¹) and positive values of entropy (β -CD-DCA: 50.31 ± 4.74 and β -CD-UDCA: 43.42 ± 3.12 J·mol⁻¹), in all cases the competitive complexation reactions were spontaneous. The inclusion complexes were stable for 12 days with a half-life of 68.71 days to DCA determination and 294.71 days for the UDCA. The methods were validated by ANVISA and EMEA methodologies, showing limits of detection and quantification of 3.94×10^{-5} mol·L⁻¹ and 1.31×10^{-4} mol·L⁻¹ for the DCA, 4.08×10^{-5} mol·L⁻¹ and 1.36×10^{-4} mol·L⁻¹ for UDCA, respectively. Samples of bile acids were determined in pharmaceutical formulations with variation of 4% for the DCA and 1% for the UDCA. The competitive complexation reaction was also applied in the production of chemical sensors. The optimal liposomal formulation has been produced with a reduced amount of phosphatidylcholine (17.7%) and cholesterol (68.4%), respectively, concerning to previous formulations produced. Liposomes had a mean diameter of 149 nm with a polydispesion index of 0.3. The zeta potential of liposomes was negative (-13.3) due to the presence of SDC in the phospholipid bilayer. Encapsulation efficiency of QUE and RES into liposomes was almost 97%. The release kinetics of QUE and RES from liposomes were also studied having controlled release over 50 h and maximum release of 96% for QUE and RES. The typical elastic SDC-liposomes obtained in this study were able to entrap 23 times (4620 μ M) more flavonoids than the formulations reported in the literature (100 μ M) that showed apoptotic and antiadipogenic effects. In conclusion, the elastic liposomal formulations containing QUE and RES are suitable for subcutaneous injection, thereby providing a new strategy for reduction of subcutaneous fat.

Keywords: Sodium deoxycholate, Quercetin, Resveratrol, Liposomes, Cyclodextrin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1: Estrutura química do ácido ursodesoxicólico. **30**
- Figura 2: Efeitos da quercetina no ciclo de vida do adipócito, incluindo a inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento dos pré-adipócitos, indução de apoptose nos pré-adipócitos e indução de lipólise em adipócitos maduros (Modificado de RAYALAM et al., 2008). **33**
- Figura 3: Efeitos do resveratrol no ciclo de vida do adipócito, incluindo a inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento dos pré-adipócitos, a inibição da diferenciação e acúmulo de lipídeos durante o desenvolvimento posterior dos pré-adipócitos, indução de lipólise e apoptose em adipócitos maduros (Modificado de BAILE et al., 2011). **38**
- Figura 4: Estrutura da α -ciclodextrina (1), β -ciclodextrina (2), γ -ciclodextrina (3), estrutura tridimensional (4) (Modificado de VEIGA et al., 2006). **39**
- Figura 5: Formação de um complexo de inclusão entre a molécula hóspede e a ciclodextrina (Fonte: SZEJTLI, 1998). **41**
- Figura 6: Farmacocinética de um sistema convencional (a) e de um sistema de liberação controlada (b) (Modificado de LOW et al., 2001). **44**
- Figura 7: A. Lipossoma convencional com fármaco solúvel em água (a) encapsulado no interior aquoso, e fármaco insolúvel em água (b) encapsulado à bicamada lipídica. B. Lipossoma sítio específico - Imunolipossoma com o anticorpo covalentemente ligado (c) aos fosfolipídeos reativos da membrana, ou hidrofobicamente ancorados (d) à bicamada. C. Lipossoma de longa circulação ou furtivo com um polímero de proteção (e) como o PEG, que protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas de opsonização (f). D. Imunolipossoma furtivo que pode ter simultaneamente o polímero de proteção e anticorpos fixados à superfície do lipossoma (g) ou, preferencialmente, a extremidade distal do polímero (h). E. Lipossoma de nova geração, a superfície pode ser modificada (separadamente ou simultaneamente) por diferentes maneiras. Entre essas modificações são: Ligação do polímero de proteção (i) ou polímero de proteção e ligante alvo, como um anticorpo (j), incorporação de rótulos de diagnóstico (k), incorporação de lipídeos carregados positivamente (l), permitindo a complexação com DNA (m), incorporação de lipídeos sensíveis a estímulos (n), ligação de polímeros sensíveis a estímulos (o),

ligação de peptídeos (p), incorporação de componentes virais (q). Além do fármaco, lipossomas podem ser carregados com partículas magnéticas (r) para sensores magnéticos de segmentação e / ou com ouro e partículas de prata (s) para microscopia eletrônica (Fonte: TORCHILIN, 2005).

45

Figura 8: Figura 8: Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas, maiores informações no texto (Modificado de TORCHILIN, 2005)..

46

Figura 9: Apresentação esquemática dos tipos de sonda: direta onde o sonificador é imerso na dispersão lipossomal e indireta onde a dispersão é exposta a um banho de ultrassom (Modificado de LASIC, 1993).

47

Figura 10: Apresentação esquemática da formação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. Linhas indicam as camadas de fosfolipídeos. Na parte direita de cada imagem é possível ver o crescimento de camadas de fosfolipídeos adjacentes. Setas em 2a e 3b mostram a direção preferencial de migração das moléculas lipídicas (Fonte: LASIC, 1993).

48

Figura 11: Esquema demonstrando a passagem de um lipossoma elástico (preto) por uma barreira permeável. O lipossoma clássico (azul) não consegue penetrar esta barreira.

49

Figura 12: Representação esquemática de uma secção transversal da pele humana mostrando as diferentes camadas celulares e apêndices (Modificado de EL MAGHRABY et al., 2008).

50

Figura 13: Representação esquemática da absorção linfática de lipossomas injetados por via subcutânea. Após S.C., lipossomas injetados não tem acesso direto à corrente sanguínea devido à permeabilidade do capilar que é restrita a água e pequenas moléculas. Em vez disso, lipossomas podem ser absorvidos pelos capilares linfáticos sendo drenados do local de injeção. A absorção linfática depende fortemente do tamanho dos lipossomas. Lipossomas pequenos (≤ 100 nm) podem entrar nos capilares linfáticos e se acumulam nos gânglios linfáticos regionais. Lipossomas maiores permanecem no local de injeção e lentamente se desestabilizam e se degradam ao mesmo tempo liberando o fármaco encapsulado. Com a liberação, o fármaco pode entrar na circulação sanguínea. Pequenos fármacos com peso molecular < 16 kDa podem entrar no compartimento sanguíneo passando através dos poros das paredes do capilar, as moléculas maiores são transportadas principalmente pelo vasos linfáticos (Modificado de OUSSOREN e STORM, 2001).

51

CAPÍTULO 2

Figure 1: Absorption spectrum of phenolphthalein (PHP – 1A) ($1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) at pH 10.5 in different β -cyclodextrin (β -CD) concentrations (3.88×10^{-5} up to $6.20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Determination of (4.38×10^{-5} up to $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) deoxycholic acid (DCA – 1B) by the inclusion complex of β -CD–PHP (6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and (1.19×10^{-5} up to $1.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) of ursodeoxycholic acid concentrations (UDCA – 1C) by the inclusion complex of β -CD–PHP (3.1×10^{-4} : $7.75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). **70**

Figure 2: Temperature effect (10–55 °C) on the phenolphthalein (PHP); β -CD–PHP inclusion complex (6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) formation and complex interaction with deoxycholic (DCA – $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and ursodeoxycholic acids (UDCA – $1.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). **70**

Figure 3: Standard curve of the optical chemical sensor for deoxycholic and ursodeoxycholic acids (β -CD–PHP– 6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ for DCA and 3.1×10^{-4} : $7.75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for UDCA) determinations. **72**

CAPÍTULO 3

Figura 1: Esquema do complexo de inclusão formado entre a ciclodextrina e indicador, no qual ciclodextrina (CD) a qual é misturada com o indicador (I) na presença de solução tampão (T), como mostra a figura 1. **90**

Figura 2: Esquema da molécula lipofílica deslocando o indicador da cavidade da ciclodextrina no qual o complexo de inclusão ciclodextrina-indicador (CDI) em solução tampão (T) é misturado à amostra (A) que é uma molécula lipofílica a qual forma o complexo de inclusão (CDA). **90**

Figura 3: Esquema do sistema de dosagem de moléculas hidrofóbicas com a solução do kit reagente o qual é composto por um dispositivo que contém módulo de análise (DA); módulo de leitura de resultados (LR) e módulo de transmissão (MT), o qual está conectado a um servidor a distancia com módulo de transmissão. **91**

CAPÍTULO 4

- Figure 1: Scatter plot of the formulations produced using a 2^{5-1} fractional experimental design and effects of response variables zeta potential, encapsulation efficiency and polydispersity index (formulation number indicated above). **118**
- Figure 2: Scatter plot of the formulations produced using a 2^3 full experimental design and effects of response variables zeta potential, polydispersity index, quercetin and resveratrol concentrations (formulation number indicated above). **119**
- Figure 3: SEM micrographs of elastic QUE/RES-loaded liposomes. **120**
- Figure 4: *In vitro* kinetic profile of QUE/RES-loaded liposomes in 7.4 pH phosphate buffer solution at 37 °C. **121**

CAPÍTULO 5

- Figura 1: Estrutura do desoxicolato de sódio em sua forma ácida. **149**
- Figura 2: Estrutura química do desoxicolato em sua forma de sal de sódio. **149**
- Figura 3: Estrutura química da quercetina. **149**
- Figura 4: Estrutura química do resveratrol. **150**
- Figura 5: Esquema de produção dos lipossomas em sua escala nanométrica no qual fosfatidilcolina e colesterol formam um filme lipídico delgado, este é posteriormente hidratado por um tampão e sonificado para produzir lipossomas em escala nanométrica. Os fármacos podem ser adicionados diretamente no filme lipídico bem como no tampão de hidratação complexados a ciclodextrinas. Legenda: PC = Fosfatidilcolina, CH = Colesterol, CD = Ciclodextrina, SDC = Desoxicolato de sódio, QUE = Quercetina, RES = Resveratrol, MLV = Vesícula multilamelar grande e SUV = Vesícula unilamelar pequena. **150**
- Figura 6: Esquema dos lipossomas produzidos em escala nanométrica com os fármacos na fase orgânica e ou complexados a ciclodextrinas no tampão de hidratação. **151**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do ácido desoxicólico e de sua forma em sal de sódio.	25
Tabela 2: Composição do: A. Lipostabil® injetável – 1mL (Fonte: KLEIN et al., 2009; SCHULLER-PETROVIC et al., 2008); B. Fosfatidilcolina injetável (Fonte: ROTUNDA et al., 2004); C. Desoxicolato injetável (Fonte: ODO e CUCÉ, 2006).	26
Tabela 3: Efeitos do Lipostabil® nos níveis plasmáticos (Fonte: SCHULLER-PETROVIC et al., 2008).	27
Tabela 4: Frequência e duração média dos efeitos colaterais ocorridos em 10% ou mais dos pacientes tratados (Fonte: ROTUNDA et al., 2009).	29
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da quercetina.	31
Tabela 6: Parâmetros físico-químicos do resveratrol.	34
Tabela 7: Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas (Fonte: LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; VEIGA et al., 2006; NASONGKLA et al., 2003).	39

CAPÍTULO 2

Table 1: Equilibrium constants (Kc) of the inclusion complexes: β -cyclodextrin–phenolphthalein (β -CD–PHP) without or with the deoxycholic acid (DCA) or ursodeoxycholic acid (UDCA) at different temperatures and the thermodynamic parameters.	71
Table 2: Validation data ($p < 0.05$).	72
Table 3: Accuracy of the kit reagent (β -CD–PHP) developed for different pharmaceutical formulations.	72

CAPÍTULO 3

Table 1: The apparent solubility and dissolution rate of QUE and RES at 25°C.	122
Table 2: Pre-formulation study of SDC elastic liposomes containing QUE, RES or inclusion complexes using different buffer solutions.	123
Table 3: Two-level 2^{5-1} fractional experimental design of elastic liposomes containing QUE and RES or inclusion complexes.	124

Tabela 4: Two-level 2^3 full experimental design and physicochemical properties of elastic QUE/RES-loaded liposomes.	125
--	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Exemplos de formulações lipossomais elásticas produzidas.	145
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIACÃO	PORTUGUÊS	ENGLISH
A	Coeficiente de Absorção molar	Molar absorption coefficient
A	Absorbância	Absorbance
A ₀	Absorbância inicial	Initial absorbance
AP	Fase aquosa	Aqueous phase
ANOVA	Análise de Variância	Analysis of variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	Brazilian National Health Surveillance Agency
CD(s)	Ciclodextrina	Cyclodextrin
CGTase	Ciclodextrina-glicosil-transferase	Cyclodextrin glucosyl transferase
C _L	Limite de detecção	Limit of detection
C _{LQ}	Limite de quantificação	Limit of quantitation
cP	Centipoise	Centipoise
DCA	Ácido desoxicólico	Deoxycholic acid
EMA	Agência europeia de medicamentos	European medicine agency
FDA	Agência regulatória de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos	U.S. Food and drug administration
FE/PHP	Fenolftaleína	Phenolphthalein
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	High performance liquid chromatography
K _c	Constante de equilíbrio	Equilibrium constant
K _i	Constante de inativação	Inactivation constant
L	Litro	Litre
m	Inclinação da reta	Slope
MEKC	Cromatografia micelar eletrocinética	Micellar electrokinetic chromatography
MEV/SEM	Microscopia eletrônica de varredura	Scanning electron microscopy
MET/TEM	Microscopia eletrônica de transmissão	Transmission electron microscopy
mg	Miligramma	Milligram

mL	Mililitro	Millilitre
mmol	Milimol	Millimol
nm	Nanomol	Nanomol
OP	Fase orgânica	Organic phase
PBS	Tampão Fosfato Salina	Phosphate buffered saline
PC/ PtdCho	Fosfatidilcolina de soja	Soya phosphatidylcholine
PDI	Índice de polidispersão	Polydispersity index
PHP ₀	Concentração inicial de Fenolftaleína	Initial phenolphthalein concentration
<i>pKa</i>	Cologaritmo da constante de dissociação ácida	Cologarithm of Acid dissociation constant
PP	Tampão fosfato de potássio	Potassium phosphate buffer
QUE	Quercetina	Quercetin
R	Constante dos gases ideais	Ideal gas constant
RES	Resveratrol	Resveratrol
RMN	Ressonância magnética nuclear	Nuclear magnetic resonance
<i>S_B</i>	Desvio padrão	Standard deviation
SDC	Desoxicolato de sódio	Sodium deoxycholate
SFC	Cromatografia de Fluido Supercrítico	Supercritical fluid chromatography
T	Temperatura absoluta	Absolute Temperature
<i>t</i>	Tempo	Time
<i>t</i> _½	Tempo de meia-vida	Half-life time
UV-Vis	Ultravioleta-Visível	UV-Visible
p/v ou w/v	Peso/Volume	Weigh/Volume
%	Por cento	Per cent

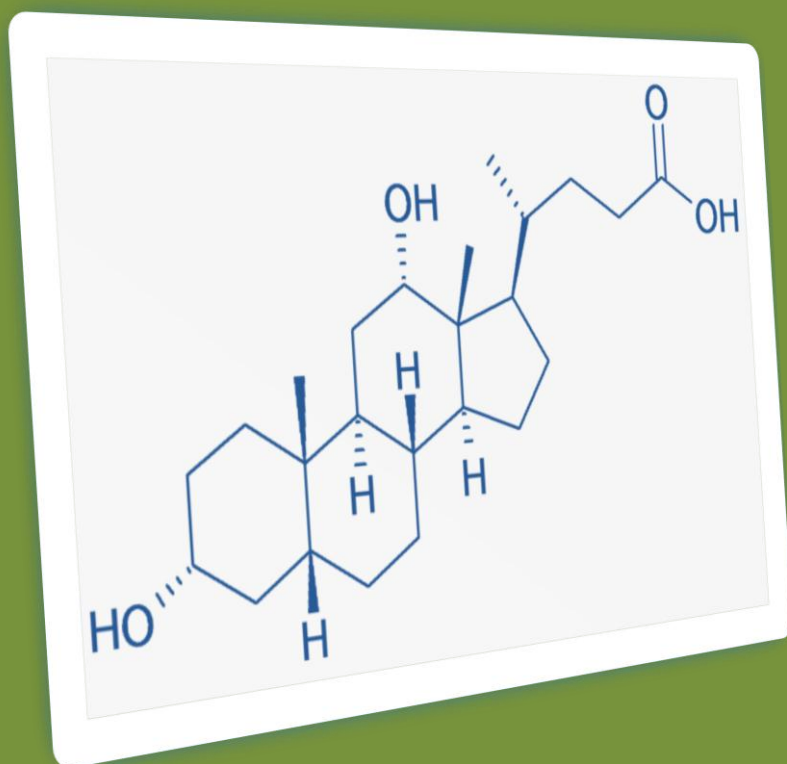
Letras Gregas

ABREVIACÃO	PORTUGUÊS	ENGLISH
α-CD	Alfa-Ciclodextrina	Alpha-Cyclodextrin
β-CD	Beta-Ciclodextrina	Beta-Cyclodextrin
HPβ-CD	2-Hidroxipropil-Beta-ciclodextrina	2-Hydroxypropyl-Beta-cyclodextrin
γ-CD	Gama-Ciclodextrina	Gamma-Cyclodextrin
ζ	Potencial zeta	Zeta potencial

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
1. Introdução	20
2. Revisão de literatura	22
2.1. Inovação tecnológica de produtos para a indústria farmacêutica e cosmética	22
2.2. Sais biliares	22
2.2.1. Ácido desoxicólico e desoxicolato de sódio	23
2.2.2. Mecanismo de ação das formulações injetáveis	26
2.2.3. Ácido ursodesoxicólico	29
2.3. Flavonoides	30
2.3.1. Quercetina	30
2.3.2. Resveratrol	33
2.4. Ciclodextrinas (CDs)	37
2.4.1. Complexos de inclusão	40
2.5. Nanotecnologia Farmacêutica	43
2.5.1. Lipossomas	44
2.5.2. Lipossomas elásticos	48
2.5.3. Administração de lipossomas por via subcutânea	49
3. Objetivos	52
3.1. Geral	52
3.2. Específicos	52
4. Referências bibliográficas	53
CAPÍTULO 2	66
Artigo – <i>Physical–chemical parameters and validation of a colorimetric method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor</i>	68
CAPÍTULO 3	75
Patente – <i>Produto na forma de kit reagente para moléculas lipofílicas</i>	78
CAPÍTULO 4	92
Artigo – <i>Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes</i>	94
CAPÍTULO 5	126
Patente – <i>Produto nanotecnológico de uma formulação lipossomal elástica para o tratamento da obesidade, lipoma, lipodistrofia e gorduras subcutâneas</i>	129
CAPÍTULO 6	152
1. Conclusões	153

2. Perspectivas	154
3. Anexos	156
ANEXO A - Resumos publicados em anais de congressos	156
ANEXO B - Resumos expandidos publicados em anais de congressos	157
ANEXO C - Normas das revistas (Lipids)	159



Capítulo 1

Introdução e Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO

Atualmente mais de 1 bilhão de adultos estão com sobrepeso e destes, mais de 300 milhões são considerados clinicamente obesos. Altos níveis de gorduras corporais são associados com o aumento do risco de desenvolvimento de numerosas condições adversas à saúde como desenvolvimento de diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (BAILE et al., 2011). Além da obesidade existem outras doenças que envolvem o acúmulo de gordura, como os lipomas que se apresentam como neoplasias de células adiposas maduras, ocasionadas pelo acúmulo de tecido gorduroso que pode se estender por via intramuscular, normalmente sendo removidos de forma cirúrgica (ROTUNDA et al., 2005). Por outro lado a lipodistrofia, que se caracteriza pelo acúmulo anormal de gordura subcutânea, é ocasionada por terapia com antivirais devido aos seus efeitos colaterais, principalmente em pacientes soropositivos (AVRAM et al., 2005). Finalmente, a gordura subcutânea pode apresentar-se como um problema estético de forma que diversos procedimentos são utilizados para a sua redução e/ou remoção. Dentre eles a lipoaspiração e a cirurgia clássica demandam grande tempo de recuperação, métodos invasivos podendo provocar sérias sequelas ou até mesmo levar o paciente a óbito.

Várias moléculas naturais são agentes potenciais para o tratamento da obesidade e outras doenças relacionadas ao acúmulo de gordura subcutânea, sendo o desoxicolato de sódio bastante usado a pouco mais de uma década. Em 2001, a dermatologista Patrícia Rittes em São Paulo, utilizou pela primeira vez o Lipostabil® (Artesan Pharma, Lüchow, Germany), cujo princípio ativo é o desoxicolato de sódio, como medicamento injetável para o tratamento de gordura subcutânea, o qual era anteriormente usado para o tratamento de embolia gordurosa (ROTUNDA et al., 2009; ATIYEH et al., 2008; RITTES, 2001). O desoxicolato de sódio é um sal biliar secundário que age como um agente tensoativo provocando lise nas membranas dos adipócitos seguido de necrose. Em altas concentrações o mesmo apresenta uma série de efeitos colaterais como edema, eritema, ardor dentre outros (DUNCAN e CHUBATY, 2006).

Outras moléculas de origem natural também foram descobertas com potentes efeitos sobre a obesidade interferindo na regulação desta pela inibição da adipogênese em pré-adipócitos e pela indução de apoptose em adipócitos maduros (YANG et al., 2008). O mesmo autor relatou que flavonoides como a quercetina, resveratrol e genisteína apresentam esta desejada ação apoptótica e antiadipogênica em tecido adiposo após estudos *in vitro* em células humanas. Milburn et al. (2007) em uma patente foram um dos pioneiros a descrever formulações a base de flavonas, estilbenos, flavononas, isoflavonas, catequinas, chalconas, taninos ou antocianidinas e nicotinamidas para a prevenção da obesidade. Alguns trabalhos científicos demonstraram a aplicação combinada dos flavonoides em questão tais como o de Yang et al. (2008) utilizando linhagens de células 3T3-L1, os mesmos autores observaram um

decréscimo na acumulação de lipídeos de $73,5 \pm 0,9\%$ e aumento na apoptose de $310,3 \pm 9,6\%$ maior que a utilização destes compostos isoladamente. Park et al. (2008) também estudaram os efeitos combinados de quercetina, resveratrol e genisteína em adipócitos jovens e maduros (3T3-L1) observando efeitos semelhantes.

Estes flavonoides não devem ser administrados em solução diretamente *in vivo*, pois são rapidamente metabolizados, possuem baixa estabilidade e baixa solubilidade aquosa sendo necessário a sua proteção, que pode ser por ciclodextrinas ou pela incorporação em sistemas de liberação controlada de fármacos. As ciclodextrinas são formadas de oligossacarídeos cíclicos consistindo de 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), 8 (γ -ciclodextrina) ou mais unidades de glicose unidas por ligações α -(1,4) (CADENA et al., 2011; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; ABAY et al., 2005; DE LEON-RODRIGUEZ e BASUILTOBIAS, 2005; DEL VALLE, 2004) com capacidade de formação de complexos de inclusão em solução aquosa (BREWSTER e LOFTSSON, 2007). Alguns artigos científicos descreveram a complexação de quercetina e resveratrol com ciclodextrinas bem como a caracterização destes complexos (LU et al., 2009; JULLIAN et al., 2007), mas complexos com as moléculas associadas não foram descritos na literatura.

A nanotecnologia tem sido uma ferramenta de inovação tecnológica para os sistemas de liberação controlada de fármacos, a qual se apresenta como uma área interdisciplinar de pesquisa e desenvolvimento que envolve a manufatura, processamento e aplicação de substâncias ou dispositivos que possuem uma ou mais dimensões em escala nanométrica (MOZAFARI et al., 2008). Os lipossomas em escala nanométrica representam uma excelente alternativa para a superação das limitações apresentadas por cada molécula acima citada. Lipossomas estes, que são caracterizados como vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo podendo proteger o fármaco da luz, da degradação por outros processos e aumentar a sua solubilidade aquosa. Lipossomas são caracterizados como um sistema transportador visando direcionar o fármaco para a célula alvo e evitar locais indesejáveis onde o mesmo exerça toxicidade (BATISTA et al., 2007; FANG et al., 2006a; FANG et al., 2006b; FRÉZARD et al., 2005). Adicionalmente, um tipo especial de lipossoma, os elásticos que possuem elevada adaptabilidade, devido à presença de agentes tensoativos como o desoxicolato de sódio em sua composição, penetram intactos pelos espaços entre as células proporcionando uma melhor liberação do fármaco (GILLET et al., 2011).

Baseado no exposto, a presente Tese propõe o desenvolvimento de métodos analíticos à base de complexos de inclusão com ciclodextrinas para a determinação de sais biliares. Além disso, o desenvolvimento de um produto inovador à base de uma formulação lipossomal elástica em escala nanométrica para o tratamento de gordura subcutânea com desoxicolato de sódio em concentrações reduzidas e o efeito sinérgico de quercetina e resveratrol, estando estas moléculas livres ou complexadas a ciclodextrinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Inovação tecnológica de produtos para a indústria farmacêutica e cosmética

Estima-se que o mercado brasileiro de perfumaria e cosméticos crescerá cerca de 5% ao ano até 2015 chegando ao volume de 50 bilhões de reais, com tendências a procura de produtos com alto valor agregado em todas as classes sociais segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (SEABRA, 2011). Um dos fatores que pode estar associado a esta grande procura de produtos inovadores, é o aumento da incidência de doenças decorrentes do acúmulo de gordura subcutânea devido ao sedentarismo da população atual, como a obesidade, uma doença complexa e crônica, que afetará mais de 20% da população masculina e 40% da população feminina no Brasil até 2015 (WHO, 2011). Devido ao fato da obesidade está associada a uma série de doenças potencialmente fatais, como a hipertensão, diabetes, doença arterial coronariana, câncer, complicações respiratórias e osteoartrite, tem sido considerada um dos maiores obstáculos à saúde humana no mundo industrializado (ALBERDI et al., 2011; AHN et al., 2008).

Além da obesidade, outras doenças envolvem o acúmulo de gordura subcutânea como os lipomas que se apresentam como neoplasias de células adiposas maduras, ocasionadas pelo acúmulo de tecido gorduroso que pode se estender por via intramuscular, normalmente sendo removidos de forma cirúrgica (ROTUNDA et al., 2005). Lipodistrofia, que se caracteriza pelo acúmulo anormal de gordura subcutânea, causada pela terapia com antivirais usadas em pacientes soropositivos (AVRAM et al., 2005).

As tradicionais metodologias empregadas como a lipoaspiração e a cirurgia clássica podem demandar grande tempo de recuperação, são métodos invasivos considerados seguros, mas podem provocar sérias sequelas ou até mesmo levar o paciente a óbito. Desta forma, novas técnicas de remoção de gordura vêm sendo utilizadas como a *Liposuction* com ultrassom ou laser associadas a anestésicos (MANN et al., 2008) e a *Lipodissolve* na qual é usada uma mistura de produtos químicos com ação sobre a gordura subcutânea. Diante do exposto, o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de gordura subcutânea pode apresentar-se como uma nova alternativa para o mercado brasileiro.

2.2. Sais biliares

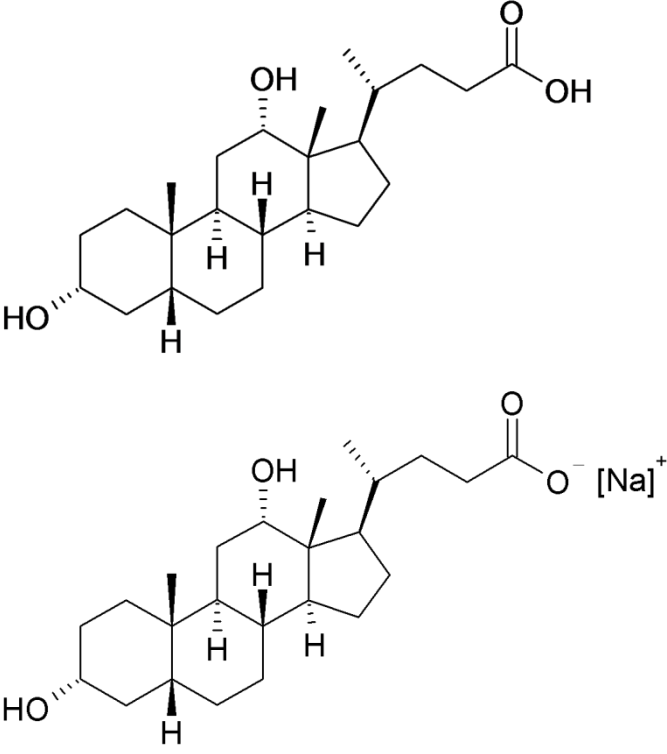
Os sais biliares, compostos orgânicos derivados do colesterol, são surfactantes biológicos com um papel importante na absorção, transporte e secreção de lipídeos (YOO,

2007). São sintetizados no fígado a partir do colesterol, armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino delgado ajudando na formação de micelas mistas de sais biliares e triacilgliceróis a partir de gorduras alimentares (NELSON et al., 2002).

2.2.1. Ácido desoxicólico e desoxicolato de sódio

O ácido desoxicólico (DCA) é um ácido biliar secundário constituído de formas conjugadas do ácido cólico (FERNÁNDEZ-LEYES et al., 2007). O mesmo pode apresentar-se na forma de sal de sódio sendo conhecida como desoxicolato de sódio (SDC), aumentando consideravelmente sua solubilidade aquosa. Os parâmetros físico-químicos do DCA e sua forma de sal são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do ácido desoxicólico e de sua forma em sal de sódio.

Nome comum	Ácido desoxicólico (DCA) Desoxicolato de sódio (SDC)
Estrutura química: a – Ácido desoxicólico; b – Desoxicolato de sódio.	 a. b.
Fórmula molecular	DCA: $C_{24}H_{40}O_4$; SDC: $C_{24}H_{39}NaO_4$ (O'NEIL et al., 2006)
Nomenclatura (IUPAC)	DCA: (4R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,12-dihidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il]pentanóico ácido SDC: Sal monosódico
Origem	Sal biliar (DEBRUYNE et al., 2001)
Peso molecular	DCA: 392,56; SDC: 414,6

PKa	DCA: 6,58
(P)	DCA: $5,2 \pm 1,1$ a 35,2°C (benzeno/água) (OHNO et al., 2008); DCA: 3,2 a 37°C (Tampão Tris, pH 7,5 0,15M octanol/água); SDC: 2,65 a 25°C (PBS, 0,1M octanol/água) (RODA et al., 1990).
Ponto de fusão	176-178°C
Solubilidade	DCA: Água: 0,24 g/L; Álcool: 220,7 g/L; Éter: 1,16 g/L; Clorofórmio: 2,94 g/L; Benzeno: 0,12 g/L; Acetona: 10,46 g/L;; Ácido acético Glacial: 9,06 g/L; SDC: Água: >333 g/L
CMC	SDC: 0,83-2,49 mg/mL
Número de agregação (N)	SDC: 3-12
HLB	SDC: 16 (Hidrofílica)
Complexação com ciclodextrinas	
$K_{C(1:1)} M^{-1}$	Método – Hildenbrand e Benesi β -CD-SDC: $8,65 \times 10^3$ (pH 9,5 a 25°C) β -CD-SDC: $2,58 \times 10^4$ (pH 10,5 a 25°C) (CADENA et al., 2009) HP β -CD-SDC: $2,58 \times 10^4$ (pH 10,5 a 25°C)
Toxicologia e Farmacocinética	
CL ₅₀	DCA: 300 μ M (<i>in vitro</i>) – <i>Human tenon's fibroblaste</i> ; SDC: 300 μ M (<i>in vitro</i>) – <i>Human tenon's fibroblaste</i> (RAMAESH et al., 1998)
Nanotecnologia (Lipossomas – Como surfactante aniônico)	
Tipo	Transferossomas (GILLET et al., 2009)
Bicamada lipídica	PC-CH-SDC
Compartimento aquoso	Tampão HEPES (pH 7,4), HP β -CD:Betametasona
Concentração do fármaco	13% (m/m)

O DCA é usado como agente colerético associado a outros componentes em terapias e disfunções do fígado (RODRÍGUEZ et al., 2000); em hidrogéis aumentando a permeabilidade das membranas celulares (VALENTA et al., 1999); constituinte de antibióticos com ação inibidora do crescimento de *Candida albicans* (MARPLES e STRETTON, 1987); pode ser associado aos derivados do N-(2-dimetilamino)etil que apresenta ação antimalárica (TERZIC

et al., 2007). Aumenta a biodisponibilidade de nanopartículas do copolímero de ácido lático e glicólico, usado no encapsulamento de fármacos, protegendo-o durante seu transporte através do trato gastrointestinal e aumentando sua absorção no epitélio intestinal (SAMSTEIN et al., 2008).

O Lipostabil[®] (Artesan Pharma, Lüchow, Alemanha), formulação farmacêutica contendo fosfatidilcolina dissolvida em solução com desoxicolato de sódio, foi introduzido na década de 60 como um medicamento endovenoso para prevenir ou tratar embolia gordurosa (KLEIN et al., 2009; ROTUNDA et al., 2009; ATIYEH et al., 2008). A partir de 2001 este medicamento começou a ser usado popularmente, por via subcutânea, para a dissolução de gorduras subcutâneas (KLEIN et al., 2009; MATARASSO e PFEIFER, 2009; ATIYEH et al., 2008). Processo este, que não estava totalmente elucidado, o que estimulou pesquisas sobre a atividade farmacológica de cada constituinte da formulação.

A “injeção de fosfatidilcolina”, formulação mais simples do Lipostabil[®], foi utilizada para a elucidação do efeito farmacológico sobre a gordura subcutânea. Inicialmente o princípio ativo desta formulação era atribuído a fosfatidilcolina, mas Rotunda et al. (2004) observaram que o SDC administrado isoladamente possuía o mesmo efeito que a primeira. Outros estudos demonstraram que esta injeção podia levar a uma perda de leve a moderada de tecido adiposo (ROTUNDA e KOLODNEY, 2006) devido à ação de lise dos adipócitos causada pela presença do SDC (PALUMBO et al., 2010; DUNCAN et al., 2009; ROTUNDA et al., 2009; ROTUNDA et al., 2004).

Além do processo de dissolução de gorduras subcutâneas, três mecanismos de retração da pele foram observados: inflamação difusa intradérmica na pele que recobre a região de tratamento, angiogênese na região de tratamento, e ablação focal das gorduras subcutâneas que se estende até a camada basal da derme. A necrose observada nos adipócitos é semelhante à observada na paniculite, lipoaspiração e necrose gordurosa traumática (DUNCAN et al., 2009). Durante as injeções subcutâneas não foram observadas alterações nas enzimas hepáticas ou danos sistêmicos além da região do tratamento imediatamente após a injeção (HEXSEL et al., 2005).

A composição completa do Lipostabil[®] injetável como relatado por SCHULLER-PETROVIC et al. (2008) e Klein et al. (2009) é apresentado na Tabela 2A. Rotunda et al. (2004) apresentaram uma formulação mais simples (Tabela 2B) aplicada à dissolução de

gorduras subcutâneas, utilizada nos trabalhos de Duncan et al. (2009), Rotunda et al. (2009) e Mann et al. (2008). ODO e CUCÉ (2006) patentearam uma formulação sem a fosfatidilcolina (Tabela 2C), cujo teste clínico em 30 pacientes do sexo feminino mostrou a substituição de gordura por fibrose visualizada por biopsia e ultrassom, além de lise dos adipócitos.

Tabela 2: Composição do: A. Lipostabil® injetável – 1mL (Fonte: KLEIN et al., 2009; SCHULLER-PETROVIC et al., 2008); B. Fosfatidilcolina injetável (Fonte: ROTUNDA et al., 2004); C. Desoxicolato injetável (Fonte: ODO e CUCÉ, 2006).

<i>A. Lipostabil® injetável</i>	
<i>Fosfatidilcolina</i>	46,5 mg
Desoxicolato de sódio	25,3 mg
Álcool benzílico	9 mg
Cloreto de sódio	3,6 mg
Hidróxido de sódio	2,53 mg
DL- α -Tocoferol	0,15 mg
Álcool etílico	3 mg
Água	907,8 mg
<i>B. Fosfatidilcolina injetável</i>	
<i>Fosfatidilcolina</i>	5% (p/v)
Desoxicolato de sódio	4,75% (p/v)
Álcool benzílico	0,9% (p/v)
Água	100 mL
<i>C. Desoxicolato injetável</i>	
<i>Desoxicolato de sódio</i>	4,75% (p/v)
Álcool benzílico	0,9% (p/v)
Propileno glicol	10% (p/v)
Água	100 mL

2.2.2. Mecanismo de ação das formulações injetáveis

Duncan e Hasengschwandtner (2005) foram um dos pioneiros a apresentar um possível mecanismo de ação para a “injeção de fosfatidilcolina” onde a formulação agiria destruindo a membrana dos adipócitos seguido da mobilização das reservas de triglicerídeos armazenados. Klein et al. (2009) usando adipócitos 3T3-L1 como modelo para estudos *in vitro* e Schuller-Petrovic et al. (2008), usando ratos como modelo para estudos *in vivo*, submeteram seus modelos a várias doses de SDC, fosfatidilcolina e Lipostabil®. Brow et al. (2006) e mais tarde Matarasso e Pfeifer (2009) relataram que o SDC poderia realizar a destruição dos adipócitos por 3 formas: 1. Micelas contendo o SDC em excesso poderiam ser agentes causadores de necrose; 2. O SDC na forma de micela poderia causar mobilização dos ácidos

graxos de dentro do adipócito; 3. Na forma cristalina, este é conhecido por causar dano celular pela perfuração das membranas biológicas.

Duncan et al. (2009) demonstraram três mecanismos de ação para a fosfatidilcolina: 1. Atuação como um tampão, pois o pH em solução da mesma é 7,0, e o do SDC em solução é 8,08, causando um ajuste do pH final da mistura para valores próximos ao pH sistêmico humano (7,4); 2. Interação com o SDC permitindo que este fique temporariamente com efeito reduzido para se difundir além do local onde foi administrado. O SDC numa concentração de 4,2% (p/v), ou 42 mg/mL, causa necrose imediata da gordura no local de injeção; 3. Um terceiro papel da fosfatidilcolina parece ser a de um regulador da intensidade do grau de necrose gordurosa retardando todo o processo, causando fracionamento da resposta com redução de tecido cicatricial fibroso produzido pela administração do SDC isolado.

Outra questão importante é quais os efeitos fisiológicos provocados pela gordura liberada dos adipócitos? Tentando responder esta pergunta Schuller-Petrovic et al. (2008) realizaram estudos *in vitro* utilizando tecido adiposo e *in vivo* tanto em ratos como em humanos, monitorando os níveis plasmáticos de triglicerídeos bem como os níveis das enzimas hepáticas, estes resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Efeitos do Lipostabil[®] nos níveis plasmáticos (Fonte: SCHULLER-PETROVIC et al., 2008).

	Controle		Lipostabil [®]	
	1 semana	4 semanas	1 semana	4 semanas
Bilirrubina total (mg/dL)	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,01
FA (IU/L)	139 ± 10	129 ± 7	109 ± 10	119 ± 12
GGT (IU/L)	1,25 ± 25	1,50 ± 0,5	0,67 ± 0,33	1,50 ± 0,50
CHE (IU/L)	189 ± 6	166 ± 5	250 ± 32	386 ± 20*
AST (IU/L)	174 ± 21	206 ± 8	188 ± 71	107 ± 5*
ALT (IU/L)	80 ± 7	91 ± 3	74 ± 23	50 ± 3*
GDH (IU/L)	9,3 ± 0,8	10,0 ± 0,4	17,3 ± 5,8	28,7 ± 11,8
Triglicerídeos (mg/L)	14,5 ± 0,6	15,5 ± 1,2	27,0 ± 6,1	56,5 ± 3,4*
Ácidos graxos livres (mM)	0,56 ± 0,11	0,64 ± 0,05	0,64 ± 0,06	1,24 ± 0,03*
Proteína C reativa (mg/L)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Interleucina-8 (pg/mL)	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0

Resultados informados pela média ± desvio padrão de 4 ratos por grupo; *p<0,05 comparando o controle com o Lipostabil[®]. FA – Fosfatase alcalina; GGT – Gama Glutamil Transferase; CHE – Colesterol Esterase; AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase; GDH – Glutamato desidrogenase.

Ainda estudando o trabalho de Schuller-Petrovic et al. (2008), mostrou que após uma semana de tratamento e uma aplicação do Lipostabil[®], não houve alteração nos perfis das

enzimas hepáticas nem nos triglicerídeos (Tabela 3). Após 4 semanas e com mais de uma aplicação, a atividade de ChE aumentou 2,3 vezes, as atividades de AST e ALT diminuíram aproximadamente 45%, enquanto que os níveis de triglicerídeos e ácidos graxos livres aumentaram quatro e duas vezes, respectivamente. O mesmo autor não conseguiu identificar o motivo das alterações nos níveis destas enzimas hepáticas após 4 semanas, apenas que os lipídeos livres provavelmente são originados da lise dos adipócitos. É importante salientar que HEXSEL et al. (2005) e ROTUNDA et al. (2009) não observaram alterações hepáticas ou no perfil lipídico, o último em mais de 42 pacientes. No entanto os autores não demonstraram os parâmetros analisados, desta forma destaca-se a importância de mais estudos *in vivo* em relação às alterações hepáticas e plasmáticas provocadas por este tipo de formulação.

A forma e a quantidade administrada, quando erradas podem ocasionar perda de pele em pequenas áreas (DUNCAN e PALMER, 2008), o mesmo autor também observou edema em todos os pacientes submetidos ao tratamento. Rotunda et al. (2009) realizaram tratamentos com a fosfatidilcolina injetável e com o desoxicolato injetável em mais de 42 voluntários, os dados são apresentados na Tabela 4. Os principais efeitos colaterais observados foram edema, eritema, dor, ardor ou sensibilidade no local de aplicação. Outros efeitos foram dormência, sensação de aperto, prurido e equimoses. A grande maioria dos efeitos colaterais foi classificada como leves a moderados. Schuller-Petrovic *et al.* (2008) também observaram em um voluntário tratado com altas doses de Lipostabil® (600 µL) sinais histológicos de paniculite e lesões vasculares.

Duncan e Chubaty (2006) observaram dor em 8,1% dos seus 75 pacientes imediatamente após a aplicação e 1% após 1 semana. Os outros efeitos observados foram eritema (72%), pontadas e ardor (90%), edema (88%), hematomas (16%) e Náusea (10%), este último apenas em doses elevadas (> 3.000 mg/mL de SDC). Os presentes autores concluíram que estes efeitos foram transitórios e não afetaram o resultado final não havendo também qualquer complicação. A redução na concentração de SDC utilizada neste tipo de tratamento pode reduzir seus efeitos colaterais, mas para a manutenção dos efeitos desejados surge a necessidade de associação com outros fármacos com efeito sobre a gordura ou até mesmo a utilização de sistemas inteligentes para a liberação controlada do mesmo.

Tabela 4: Frequência e duração média dos efeitos colaterais ocorridos em 10% ou mais dos pacientes tratados (Fonte: ROTUNDA et al., 2009).

<i>Efeito colateral</i>	<i>Desoxicolato de sódio</i>		<i>Fosfatidilcolina injetável</i>	
	<i>Paciente, n (%)</i>	<i>Duração média (Dias)</i>	<i>Paciente, n (%)</i>	<i>Duração média (Dias)</i>
Edema	21 (100)	15	21 (100)	15
Eritema	21 (100)	4	21 (100)	2
Dor	21 (100)	8	21 (100)	7,5
Queimadura	21 (100)	2	19 (90)	2
Sensibilidade	19 (90)	14	21 (100)	13
Dormência	17 (81)	14	16 (76)	13,5
Sensação de aperto	15 (71)	11	17 (81)	14
Prurido	14 (67)	3	16 (76)	4
Equimoses	11 (52)	9	14 (67)	7
Sangramento local	7 (33)	<1	10 (48)	<1

2.2.3. Ácido ursodesoxicólico

O ácido ursodesoxicólico, (3 α , 5 β , 7 β)-3,7-dihidroxi-5-colano-24-oico, UDCA, Figura 1) é um ácido biliar terciário de difícil determinação formado pela epimerização do ácido quenodesoxicólico (DEBRUYNE et al., 2001) e menor constituinte da bile humana (SOLA et al., 2006). O mesmo é encontrado na forma de pó branco, cristalino, inodoro, de sabor amargo, pouco solúvel em água, apresentando boa solubilidade em etanol e ácido acético glacial e pKa de 5,10 (O'NEIL et al., 2006; NAKASHIMA et al., 2002; ORIENTI et al., 1999).

O UDCA é utilizado para dissolver cálculos biliares - colelitíase, tratar cirrose biliar, refluxo de bile na gastrite, no tratamento do câncer colorretal (TAY et al., 2007; SETCHELL et al., 2005; PETRONI et al., 2001), colangite esclerosante primária (LINDOR, 1997), prevenção da pancreatite causada por microlitíases em pacientes com a vesícula biliar intacta (OKORO et al., 2008) e também em pacientes com hepatite C aumentando o nível da enzima alanina aminotransferase (IKEGAMI e MATSUZAKI, 2008). Não é relatado na literatura se o UDCA tem efeito sobre gordura subcutânea, mas este também não é descartado.

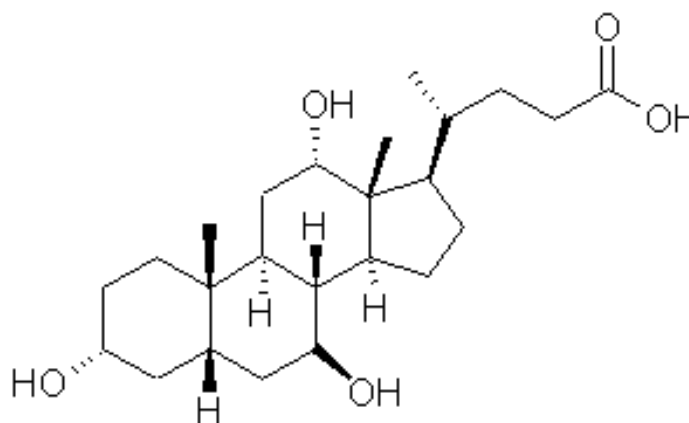


Figura 1: Estrutura química do ácido ursodesoxicólico.

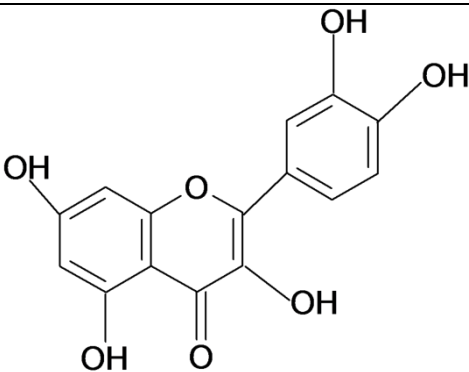
2.3. Flavonoides

Flavonoides compreendem um grande grupo de compostos naturais polifenólicos de baixo peso molecular presente em todos os vegetais (AHN et al., 2008). Flavonoides são classificados como 1,4-benzopironas consistindo de 2 anéis aromáticos ligados por um anel pirona heterocíclico (HARWOOD et al., 2007). Estes compostos contribuem para a coloração vegetal fornecendo um grande espectro de cores. Ainda, devido às propriedades benéficas a saúde humana, os flavonoides são estudados em relação a sua composição química e suas propriedades biológicas (JULLIAN et al., 2007).

2.3.1. Quercetina

Dentre os flavonoides mais comuns na dieta, a quercetina (QUE), encontrada em frutas, legumes, sementes, vinho e chá, apresenta as propriedades químicas contidas na Tabela 5. QUE atua no processo de proteção contra radiação UV nos vegetais devido ao seu efeito antioxidante. Também apresenta atividade biológica anti-adipogênica, anti-carcinogênica, anti-inflamatória e antiviral (YEN et al., 2011; PRINCE e SATHYA, 2010; AHN et al., 2008; HARWOOD et al., 2007). Na qualidade de um potente antioxidante, pode agir como um mediador do estresse oxidativo celular podendo auxiliar na proteção dos neurônios e no tratamento de doenças crônicas como Parkinson ou Alzheimer. Entretanto, quando administrada em solução diretamente possui baixa biodisponibilidade já que é rapidamente metabolizada no organismo (PRIPREM et al., 2008), sendo necessária a utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos, como alternativa, para aumentar a sua biodisponibilidade e protegê-la da degradação.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da quercetina.

Nome comum	Quercetina (QUE)
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{15}H_{10}O_7$ (O'NEIL et al., 2006)
Nomenclatura (IUPAC)	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicromen-4-ona
Origem	Cebola, Maça, Vinho vermelho etc. (PRIPREM et al., 2008)
Peso molecular	302,23
PKa	6,74 (ARSHAD et al., 2009)
(P)	$1,82 \pm 0,32$ a 40°C (Tris-HCl pH 7,4 octanol/água) (ROTHWELL et al., 2005)
Ponto de fusão	314°C
Solubilidade	Álcool: 3,45g/L; Ácido acet. Glacial: Solúvel; Solução aquosa alcalina: Solúvel (Amarela); Praticamente insolúvel em água;
Complexação com ciclodextrinas	
$K_{C(1:1)} M^{-1}$	Higuchi e Connors β -CD-QUE: $6,02 \times 10^2$ (pH 7,0 a 30°C) HP β -CD-QUE: $1,42 \times 10^3$ (pH 7,0 a 30°C) SBE β -CD-QUE: $4,03 \times 10^3$ (pH 7,0 a 30°C) (JULLIAN et al., 2007)
Toxicologia e Farmacocinética	
CL ₅₀	160 mg/Kg (oral) – Camundongo 620 μ M (<i>in vitro</i>)- Hepatócito (2h) (MORIDANI et al., 2002)
Dose (mg/Kg)	30 (oral) – rato (CHEN et al., 2010)
AUC_{∞} (μ g·min·mL ⁻¹)	57 ± 6 (plasma) (CHEN et al., 2010)
MRT (min)	149 ± 23 (plasma) (CHEN et al., 2010)
$t_{1/2}$ (min)	112 ± 31 (plasma) (CHEN et al., 2010)
Nanotecnologia (Lipossomas)	
Tipo	Clássico (PRIPREM et al., 2008)
Bicamada lipídica	PC-CH-QUE (2:1:1)
Compartimento aquoso	PEG 50% (v/v)
Concentração do fármaco	0,1% (p/v)

QUE pode aumentar o gasto energético celular pelo aumento do consumo de oxigênio nos miócitos. O mecanismo ocorre através do aumento da expressão de dois tipos de diodinasas, o qual aumenta o gasto energético pelo aumento da formação de tri-iodotironina (T3), um hormônio tireoidiano envolvido no metabolismo basal (RAINS et al., 2011; STEWART et al., 2008). Também pode agir diretamente na redução do desenvolvimento dos adipócitos através de seus efeitos antiadipogênicos e apoptóticos, estes que ocorrem pelo aumento da expressão de proteínas quinases AMP-ativadas (AHN et al., 2008). O mesmo autor observou que a diferenciação em pré-adipócitos pode ser afetada de diferentes maneiras principalmente pela regulação da expressão de fatores relacionados à adipogênese e enzimas. Finalmente, Ahn et al. (2008) observaram que a quercetina ativa genes de apoptose tais como Caspase-3, Caspase-9 que são mais expressos e bcl-2, um gene antiapoptótico tem sua expressão reduzida.

Raylam et al. (2008) também estudaram o mecanismo de ação de QUE sobre pré-adipócitos observando um decréscimo do potencial de membrana pela redução da regulação de poli (ADP-Ribose) polimerase, bcl-2 e ativação da caspase-3, consequentemente iniciando um processo de apoptose pela inibição da mitogênese celular. 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. Os efeitos de QUE sobre os adipócitos em seus diferentes estágios são mostrados na Figura 2.

A QUE possui propriedades anti-carcinogênicas em baixas concentrações (abaixo de 1200 mg/dia), mas os trabalhos publicados são controversos, pois a literatura evidencia inibição em tumores do colón, da mama e aumento de tumores gastrointestinais. Além disso, não foi observada uma inibição da iniciação do tumor quando QUE é administrada por via oral (HARWOOD et al., 2007). O presente autor não leva em consideração a associação de QUE com outros fármacos, pois quando ela é combinada com outros flavonoides como resveratrol e/ou genisteína os mesmos apresentaram efeito positivo para o tratamento de câncer oral (WALLE, 2005).

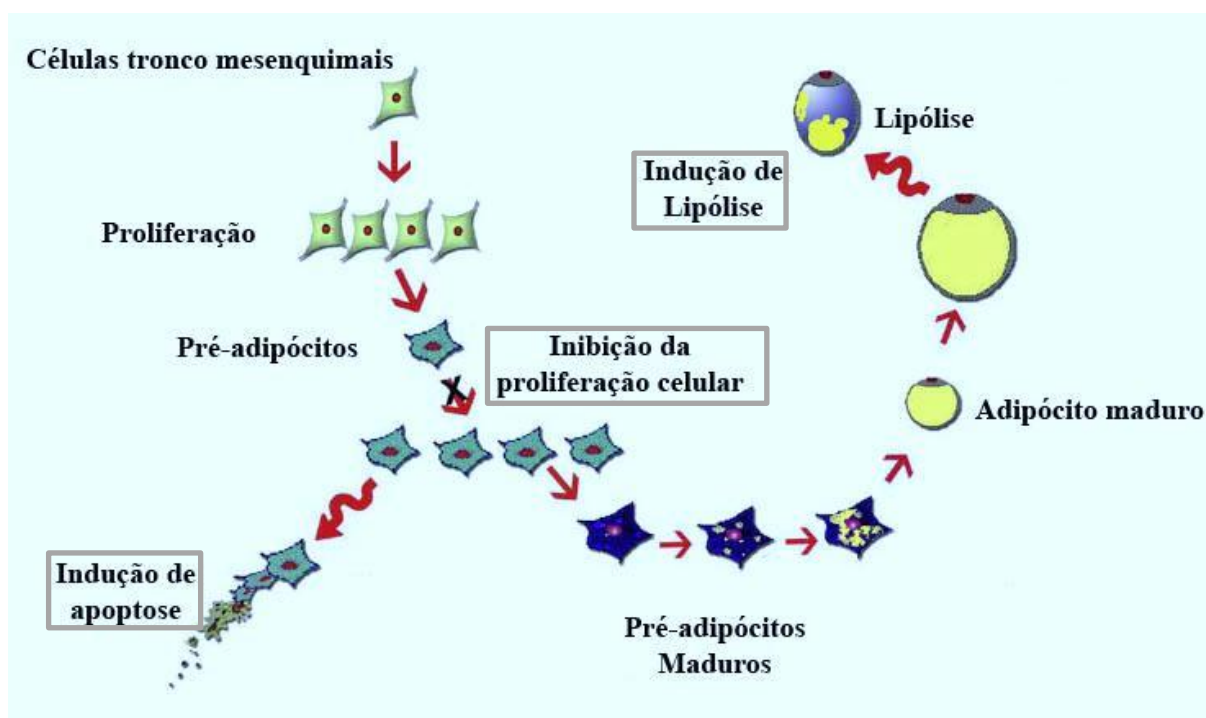


Figura 2: Efeitos da quercetina no ciclo de vida do adipócito, incluindo a inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento dos pré-adipócitos, indução de apoptose nos pré-adipócitos e indução de lipólise em adipócitos maduros (Modificado de RAYALAM et al., 2008).

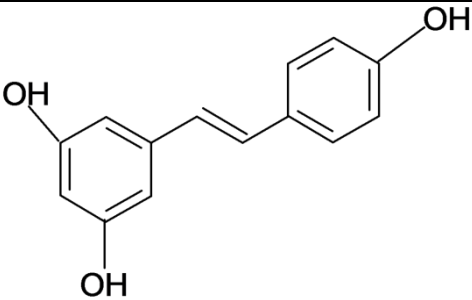
Estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação inversa entre a ingestão de flavonoides na dieta e a mortalidade por doença coronariana. QUE pode oferecer efeitos cardioprotetores já que elimina os radicais livres e inibe a peroxidação lipídica o que indiretamente ajuda a manter os níveis de lipídeos no coração (PRINCE e SATHYA, 2010). Os mesmos autores observaram estes efeitos benéficos em ratos com problemas cardíacos através de análises bioquímicas e eletrocardiogramas. Adicionalmente, o potencial anti-inflamatório da QUE é associado a um decréscimo da produção de citocinas inflamatórias.

2.3.2. Resveratrol

O resveratrol (RES) é uma fitoalexina polifenólica sintetizada por mais de 72 espécies vegetais (LU et al., 2009): *Polygonum cuspidatum* (Sieb. et Zuce), a maior fonte natural é uma planta de porte herbáceo; uva (*Vitis* spp.); vinho e amendoim (*Arachis* spp.). Este é produzido em resposta a um agente estressante como um mecanismo de defesa contra infecções fúngicas, virais e bacterianas e dano por radiação ultravioleta. Recentemente, passou a ser vendido em comprimidos como suplemento alimentar (SZKUDELKA e SZKUDELSKI, 2010; CADDEO et al., 2008). Os parâmetros físico-químicos do resveratrol são apresentados na Tabela 6.

Nos últimos anos, o interesse pelo RES aumentou consideravelmente devido as inúmeras aplicações biológicas. As principais são os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, cardioprotetores e anticâncer já bem caracterizados (ALBERDI et al., 2011; SZKUDELKA e SZKUDELSKI, 2010; BECHMANN et al., 2009; CADDEO et al., 2008).

Tabela 6: Parâmetros físico-químicos do resveratrol.

Nome comum	Resveratrol (RES)
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{14}H_{12}O_3$
Nomenclatura (IUPAC)	5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol
Origem	Uva, Vinho vermelho (SZKUDELKA e SZKUDELSKI, 2010)
Peso molecular	228,24
PKa	9,30 (ALLAN et al., 2009)
(P)	1,87 a 37°C (PBS 0,05M pH 7,4 octanol/água); 2,79 a 37°C (Salina 0,05 M pH 7,4 octanol/água) (KEREM et al., 2006)
Ponto de fusão	256-257°C
Solubilidade	Água: 0,03 g/L; DMSO: 16 g/L; Álcool: 50 g/L;
Complexação com ciclodextrinas	
$K_{C(1:1)} M^{-1}$	Higuchi e Connors β -CD-RES: $1,82 \times 10^3$ (pH 7,0 a 25°C) HP β -CD-RES: $6,78 \times 10^3$ (pH 7,0 a 25°C); (LU et al., 2009)
Toxicologia e Farmacocinética	
CL ₅₀	23,2 μM (<i>in vitro</i>) – Células estreladas hepáticas humanas LX-2 (BECHMANN et al., 2009) 470 μM (<i>in vitro</i>) - Hepatócito (2h) (MORIDANI et al., 2002)
Dose (mg/Kg)	20 (oral- Camundongo); 225 (subcutânea – Camundongo) (ISHIDA et al., 2009)
AUC_{∞} ($\mu g \cdot min \cdot ml^{-1}$)	63 (oral), 5870 (subcutânea) (ISHIDA et al., 2009)

<i>MRT</i> (min)	32 (oral) 16700 (subcutânea) (ISHIDA et al., 2009)
$t_{1/2}$ (min)	20 (oral) 451 (subcutânea) (ISHIDA et al., 2009)
Tipo	23,2µM (<i>in vitro</i>) - Células estreladas hepáticas humanas LX-2 (BECHMANN et al., 2009) 470 µM (<i>in vitro</i>)- Hepatócito (2h) (MORIDANI et al., 2002)
Nanotecnologia (Lipossomas)	
Tipo	Clássico (CADDEO et al., 2008) - 5mL de dispersão
Bicamada lipídica	PC-Diacetil fosfato-CH-RES (129:36:26:6,5)
Compartimento aquoso	Tris-HCl (pH 7,4)
Concentração do fármaco	6,5 µM

RES é um potente antioxidante *in vivo*, porque aumenta a síntese de óxido nítrico (NO). O papel anti-inflamatório do resveratrol ficou evidente quando o mesmo inibiu a agregação plaquetária e a ação de citocinas em células vasculares. RES também inibiu a expressão de vários fatores incluindo a interleucina 1 β , fatores de necrose tumoral (TNF- α), lipopolissacarídeo (LPS), prostaglandinas e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) em baixas concentrações (SHAH e PATEL, 2010). Esta resposta anti-inflamatória do resveratrol é importantíssima para reduzir os efeitos colaterais da necrose produzida pelo SDC.

Estudos têm demonstrado que em baixas concentrações, RES age como um agente anti-apoptótico proporcionando cardioproteção. Os efeitos anticâncer aparecem em altas doses de RES administradas sob o tecido alvo, reduzindo a expressão de fatores de crescimento e aumentando efeitos benéficos contra respostas inflamatórias. Concentrações acima de 50 µM já induzem apoptose em células cancerígenas (MUKHERJEE et al., 2010; SHAH e PATEL, 2010). No entanto, o resveratrol sofre rápido metabolismo em seres humanos, o que limita a disponibilidade desta molécula em órgãos distantes do local de absorção para a quimioprevenção (PRIETO-HONTORIA et al., 2011; SHAH e PATEL, 2010).

Outra importante aplicação de RES é a redução da adipogênese e da viabilidade dos pré-adipócitos. Adicionalmente, também aumenta a lipólise e reduz a lipogênese em adipócitos maduros, reduz a síntese de lipídeos em fígado de rato e adipócitos 3T3-L1, inibe a proliferação em pré-adipócitos dependentes de SIRT-1 e sinergicamente, em altas concentrações, aumenta a produção de fatores de necrose tumoral-alfa (TNF- α) induzindo

apoptose em adipócitos humanos, eventos mostrados na Figura 3 (ALBERDI et al., 2011; BAILE et al., 2011; KIM et al., 2011; BAUR, 2010a; b; DAL-PAN et al., 2010; SZKUDELSKA e SZKUDELSKI, 2010). Em resumo, RES parece prevenir a obesidade ao induzir o metabolismo mitocondrial oxidativo de ácidos graxos, diminuir a resistência à insulina em camundongos submetidos a uma dieta de alto valor calórico e minimizar a hiperglicemia em pacientes obesos (DAL-PAN et al., 2010). O mesmo autor também observou em lêmures (*Microcebus murinus*) que RES administrado na dieta aumentou a taxa metabólica no repouso bem como o efeito da saciedade nestes primatas. Szkudelska e Szkudelski (2010) em uma revisão apresentaram diversos trabalhos com camundongos e ratos submetidos a dietas com alto teor de gordura e suplementação com resveratrol onde se observou o aumento na expectativa de vida, função motora, ganho de peso e alteração na expressão gênica. Os animais submetidos à mesma dieta e tratados com resveratrol também apresentaram redução nos parâmetros lipídicos (triglicerídeos plasmáticos e do fígado, colesterol) em relação aos animais não tratados.

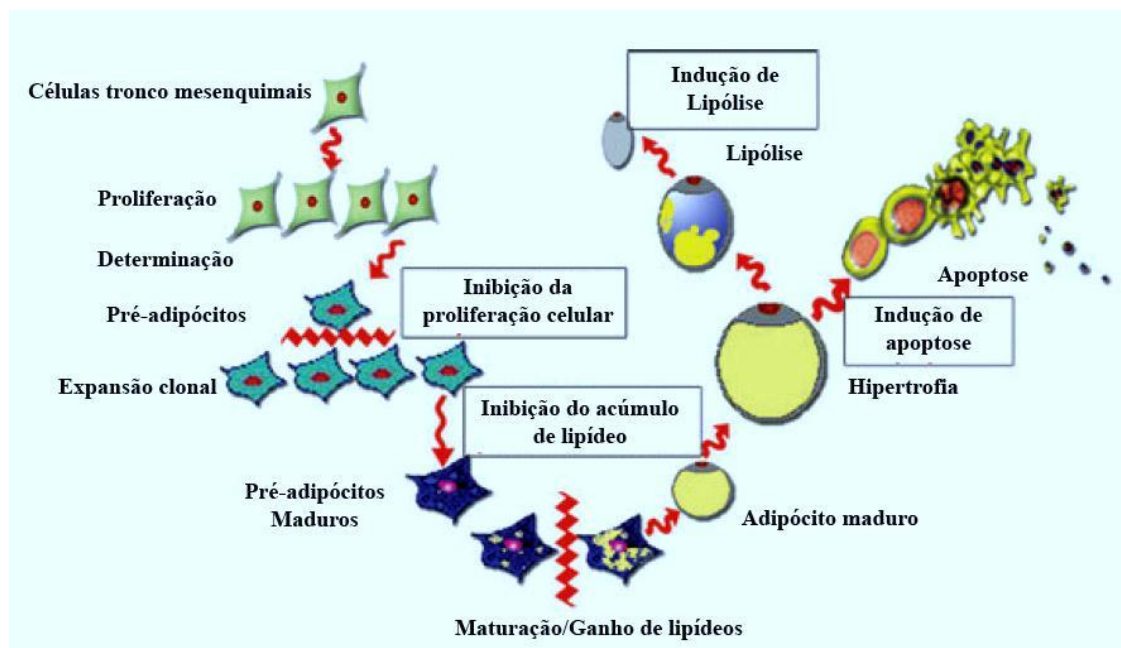


Figura 3: Efeitos do resveratrol no ciclo de vida do adipócito, incluindo a inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento dos pré-adipócitos, a inibição da diferenciação e acúmulo de lipídeos durante o desenvolvimento posterior dos pré-adipócitos, indução de lipólise e apoptose em adipócitos maduros (Modificado de BAILE et al., 2011).

Alguns trabalhos científicos demonstraram a aplicação combinada de resveratrol com outros flavonoides como a quercetina onde Yang et al. (2008) estudaram os efeitos de QUE (100 μ M) e RES (100 μ M) combinados em linhagens de células 3T3-L1 e observaram um decréscimo no acúmulo de lipídeos de $73,5 \pm 0,9\%$ e aumento na apoptose de $310,3 \pm 9,6\%$

maior que a utilização destes compostos isoladamente. Park et al. (2008) também estudaram os efeitos combinados de QUE (100 μ M), RES (100 μ M) e genisteína (50 μ M) em adipócitos jovens e maduros (3T3-L1) provocando apoptose. Não foi observado este efeito quando os compostos eram utilizados isoladamente. Hsu e Yen (2006) estudaram os efeitos isolados dos flavonoides naringenina, rutina, hesperidina, resveratrol, naringina e quercetina sobre células 3T3-L1 onde foi observado inibição em 28,3; 8,1; 11,1; 33,2; 5,6 e 71,5% respectivamente.

A patente depositada por Milburn et al. (2007) descreve formulações a base de flavonas, estilbenos, flavononas, isoflavonas, catequinas, chalconas, taninos ou antocianidinas e nicotinamidas para a prevenção de uma série de desordens metabólicas incluindo a obesidade. Dentre os compostos apresentados encontram-se QUE, RES e suas formas derivadas incluindo também preparações lipossomais furtivas (reduz o reconhecimento pelo sistema imune) utilizando o PEG (1000-5000 Da, 5% mol/%) em escala nanométrica até micrométrica. A patente não apresenta todos os outros constituintes da formulação e suas respectivas composições. Estes lipossomas diferem dos propostos neste trabalho por serem de longa circulação (furtivos) diferente dos de ação local que possuem composição e método de produção mais simples, além disso, não apresentam o desoxicolato de sódio em sua composição como surfactante ou fármaco.

2.4. Ciclodextrinas (CDs)

Em 1891, A. Villiers, um cientista francês, isolou uma substância produzida por *Bacillus amylobacter* contendo amido que o mesmo denominou de “celulosina”. Depois, o microbiologista austríaco Franz Schardinger entre 1903 e 1911 descreveu dois compostos cristalinos – α -dextrina e β -dextrina isolado de sobrenadante bacteriano produzido em amido de batata. A celulosina descrita por Villers é a β -dextrina descrita por Schardinger. Em 1935, Freudenberg e Jacobi foram os primeiros a descrever as ciclodextrinas (CDs) como são conhecidas hoje: α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD). De 1935 a 1955, Freudenberg, Cramer e colaboradores identificaram a estrutura das CDs, suas propriedades físico-químicas e sua habilidade de formar complexos de inclusão. Na década de 1970, com o avanço dos processos biotecnológicos, foi possível a produção de CDs com alto grau de pureza e baixo custo (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; DEL VALLE, 2004).

Ao longo do último século houve um aumento na utilização das CDs devido ao fato de serem produtos seminaturais decorrentes de fontes renováveis (amido) através de conversões enzimáticas simples. Milhares de toneladas são produzidas ao ano por tecnologias não agressivas sob o ponto de vista ambiental; baixo preço; capacidade de formar complexos de

inclusão; baixos efeitos secundários e dependendo da aplicação, pode ser ingerida pelo homem em produtos indústrias com aplicações farmacêuticas (solubilizantes e estabilizantes), alimentícia (alterando o odor e o sabor) e cosmética (estabilizantes) (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; VEIGA et al., 2006).

As ciclodextrinas são obtidas através da reação de transglicosilação intramolecular onde o amido é degradado pela ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase) produzindo dextrinas cíclicas e acíclicas (SZEJTLI, 1998). Essa enzima possui peso molecular na ordem de 70-75kD e apresenta uma sequência de aminoácidos com similaridade estrutural a α -amilase (VAN DER VEEN et al., 2001). Vários microrganismos catalisam esta reação enzimática como o *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *Klebsiella pneumoniae*. As CDs que são obtidas em maiores porcentagens são a α -CD, β -CD e a γ -CD, cujas quantidades relativas dependem do tipo de microrganismo e das condições de reação (VEIGA et al., 2006).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos (Figura 4) derivados do amido com 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), 8 (γ -ciclodextrina) ou mais unidades de glicose unidas por ligações α -(1,4) (ZHANG et al., 2009; DE LEON-RODRIGUEZ e BASUIL-TOBIAS, 2005; DEL VALLE, 2004). CDs com número inferior a 6 moléculas de glicose não existem por razões estereoquímicas, mas CDs com mais de 8 moléculas de glicose já foram produzidas (VEIGA et al., 2006). Devido à ausência de rotação livre nas ligações glicosídicas e da conformação em cadeira apresentadas pelas moléculas de glicose, as CDs apresentam uma forma tronco-cônica onde as radicais hidroxilas secundárias ligados aos carbonos 2 e 3 e ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto que as hidroxilas primárias ligadas ao carbono 6 localizam-se na menor base do tronco. Esta conformação faz com que as ciclodextrinas em solução aquosa apresentem um exterior hidrofílico e interior hidrofóbico (DEL VALLE, 2004).

Todas as ciclodextrinas apresentam estrutura cristalina, não higroscópica e reduzida solubilidade aquosa, são bastante resistentes em meio alcalino, mas, hidrolisam-se facilmente em meio ácido (DEL VALLE, 2004). A Tabela 7 apresenta as propriedades físico-químicas das principais CDs.

Em geral, as ciclodextrinas mais comuns apresentam baixa toxicidade sendo capazes apenas de permear membranas biológicas, tais como a córnea, se ingeridas por via oral, estas não são absorvidas no trato gastrointestinal e não apresentam toxicidade, quando administradas por via parentérica também apresentam baixa toxicidade (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; DEL VALLE, 2004).

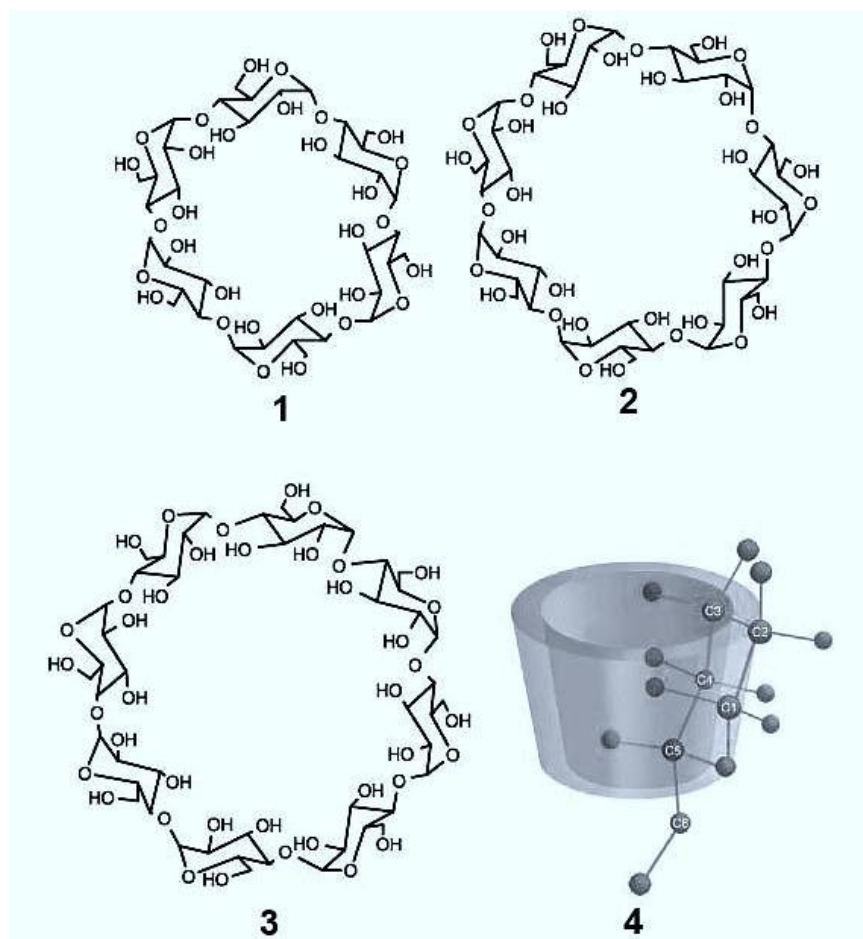


Figura 4: Estrutura da α -ciclodextrina (1), β -ciclodextrina (2), γ -ciclodextrina (3), estrutura tridimensional (4) (Modificado de VEIGA et al., 2006).

Tabela 7: Propriedades físico-químicas das principais ciclodextrinas (Fonte: LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; VEIGA et al., 2006; NASONGKLA et al., 2003).

Propriedades	α -CD	β -CD	HP β -CD	γ -CD
Unidades de Glicose	6	7	7	8
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	972	1135	1390	1297
Solubilidade aquosa (g/100mL a 25°C)	14,5	1,85	>50	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7 - 5,3	6,0 - 6,5	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
Altura da estrutura tronco-cônica (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	ND	7,9 ± 0,1
Volume aproximado da cavidade (Å ³)	174	262	ND	427
Formas dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramas monoclínicos	ND	Prismas quadráticos
pKa (a 25°C)	12,333	12,202	ND	12,081
Constante de difusão a 40°C (m ² /s)	3,443	3,223	ND	3,000

ND = não determinado

2.4.1. Complexos de inclusão

Devido a sua estrutura, as CDs podem ser consideradas cápsulas vazias cilíndricas abertas em ambas às extremidades, o que lhe permite a inclusão de uma enorme variedade de moléculas orgânicas em sua cavidade hidrofóbica. Neste complexo de inclusão a molécula que entra na cavidade é chamada de hospedeira enquanto a ciclodextrina é a molécula hóspede (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; DEL VALLE, 2004).

Uma grande variedade de moléculas pode formar complexos de inclusão, tais como indicadores, fármacos, pequenos ânions, ácidos carboxílicos e álcoois (TAWARAH e KHOURI, 2000). Estas moléculas ficam ligadas por forças intermoleculares não covalentes (ANSELMi et al., 2008; AFKHAMI et al., 2006; DEL VALLE, 2004) além destas forças, o tamanho e estrutura interferem na inclusão destes compostos (AL-SHERBINI, 2005). Devido a estas interações, as propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes podem ser drasticamente modificadas (HERNÁNDEZ BALBOA et al., 2008; YANEZ et al., 2004).

Em solução aquosa, a cavidade da ciclodextrina está ocupada por moléculas de água, isto é termodinamicamente desfavorável devido à interação polar-apolar. A formação do complexo de inclusão ocorre através do deslocamento destas moléculas de água da cavidade da CD pela molécula hóspede ou por grupos hidrofóbicos (Figura 5). Este processo é termodinamicamente favorável e contribui para a formação do complexo. As principais interações que ocorrem para a formação e estabilização do complexo são as interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas dependendo da molécula hóspede (GUNARATNE e CORKE, 2008; JADHAV e VAVIA, 2008; SHANMUGAM et al., 2008; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; CHEN et al., 2004; DEL VALLE, 2004).

Veiga et al. (2006) e Del Valle (2004) descreveram o mecanismo de formação de um complexo de inclusão: 1. Ocorre a aproximação da molécula hóspede à molécula de CD; 2. Acontece a quebra da estrutura da água existente no interior da cavidade da CD e remoção de algumas das moléculas de água para a solução; 3. Em seguida há quebra da estrutura da água em volta da molécula hóspede; 4. Ocorre a interação dos substituintes da molécula hóspede com os grupos existentes na superfície ou no interior da CD; 5. Possivelmente há formação das pontes de hidrogênio entre a molécula hóspede e a CD; 6. Finalmente ocorre à reconstrução da estrutura da água em volta das partes expostas da molécula hóspede, após o processo de inclusão.

Diversas técnicas são utilizadas para a produção de complexos de inclusão, as quais por sua vez têm grande influência no composto final obtido (MURA et al., 1999): a co-precipitação é a técnica mais usada em laboratório e consiste na adição da molécula hóspede a

uma solução aquosa de CD (ANSELM I et al., 2008); a complexação fluída ocorre pela adição do hóspede a uma solução de CD 50-60% em massa; a complexação pastosa é semelhante a complexação fluída com a diferença de que a CD está praticamente sólida; na co-evaporação, a solução aquosa de CD é misturada à molécula hóspede e depois aquecida a 100°C para a eliminação da água; a extrusão é uma técnica onde o hóspede e a CD são misturadas e aquecidas continuamente (CHALLA et al., 2005); por fim, na Mistura a Seco, o hóspede e a CD são diretamente combinados (VEIGA et al., 2006; DEL VALLE, 2004).

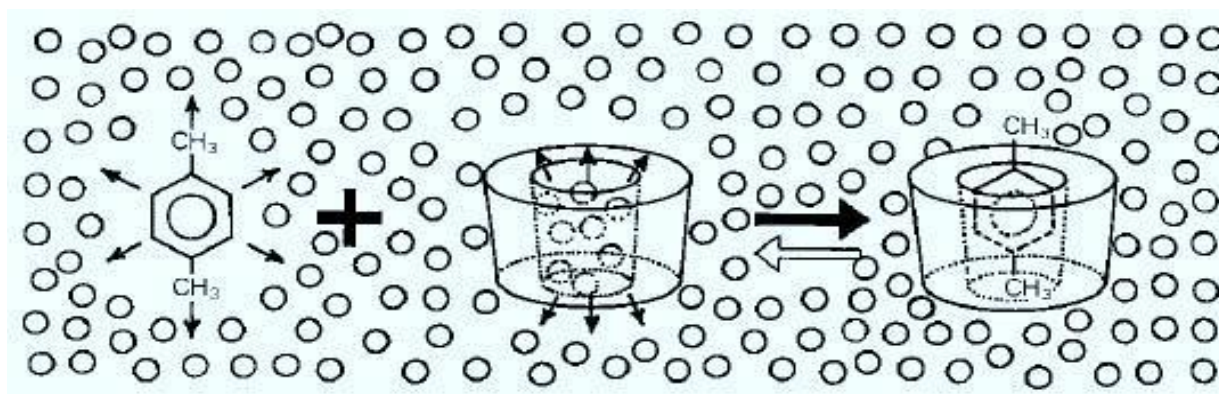


Figura 5: Formação de um complexo de inclusão entre a molécula hóspede e a ciclodextrina (Fonte: SZEJTLI, 1998).

A análise dos complexos de inclusão é realizada por uma grande variedade de técnicas: espectrofotométricas (UV-Vis, fluorescência), cromatográficas (HPLC), eletroquímica e calorimétrica (GHOREISHI et al., 2008; ZHU et al., 2007; GEORGIOU et al., 1995). Algumas técnicas espectrofotométricas utilizando CDs foram extensamente utilizadas para aumentar a sensibilidade do analito, no entanto trabalhos utilizando análises UV-Vis com CDs são escassos. O emprego de ciclodextrinas em técnicas UV-Vis tem como objetivo melhorar a solubilidade e estabilidade das substâncias colorimétricas, além de aumentar a seletividade e sensibilidade desta técnica (DE LEON-RODRIGUEZ e BASUIL-TOBIAS, 2005).

Os complexos de inclusão também podem ser utilizados para a determinação indireta de substâncias. Para isso são utilizadas técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ABDEL-SHAFI, 2007; BREWSTER e LOFTSSON, 2007), a Fluorescência (LIU et al., 2007) e a Espectrofotometria UV-Vis (JADHAV e VAVIA, 2008; ABAY et al., 2005; KADRI et al., 2005). Este último método, em associação com substâncias coloridas, tais como indicadores, apresenta-se como uma alternativa para a determinação de substâncias com baixa absorvidade molar, onde a substância compete com o indicador pela cavidade da CD,

sendo esta liberada em solução e em seguida quantificada. Esta técnica é conhecida como Reação de Complexação Competitiva (CADENA et al., 2009; AFKHAMI et al., 2006; GLAZYRIN et al., 2004).

A determinação da constante de equilíbrio (K_c) da molécula hóspede-CD é de suma importância, pois esta serve como um parâmetro para medir as alterações físico-químicas ocasionadas pela complexação, tais como solubilidade aquosa, reatividade química, absorvidade molar e outras propriedades ópticas (dispersão rotatória óptica). Existem vários métodos para se determinar K_c : O método de solubilidade de fases de Higuchi e Connors, Espectrofotometria UV-Vis de Hildebrand e Benesi, RMN e Modelação molecular. Também é possível, através de K_c determinar os parâmetros termodinâmicos – variação da energia livre de Gibbs (ΔG), variação da entalpia aparente (ΔH) e a variação da entropia aparente (ΔS) (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; VEIGA et al., 2006; DEL VALLE, 2004; BENESI e HILDEBRAND, 1949).

A quercetina já foi complexada a três tipos de ciclodextrinas (β -CD; HP β -CD e sulfobutil éter β -CD) sendo seus complexos de inclusão caracterizados. A complexação com as CDs aumentou a duração das propriedades antioxidantes de QUE (JULLIAN et al., 2007). O resveratrol também foi complexado a dois tipos de ciclodextrinas (β -CD e HP β -CD) com seus complexos de inclusão caracterizados. Não houve diferença na atividade antioxidante dos resveratrol livre para o complexado, a complexação também aumentou a solubilidade do resveratrol e sua estabilidade em solução (ALLAN et al., 2009; LU et al., 2009). Não foi encontrado na literatura complexos de inclusão da associação de QUE e RES.

Sais biliares também já foram complexados a ciclodextrinas e seus complexos de inclusão já foram caracterizados (CADENA et al., 2009; ORIENTI et al., 1999; VENTURA et al., 1997). O núcleo esteroide do sal biliar entra na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina (CAI et al., 2005), este efeito aumenta a solubilidade aquosa do sal biliar.

Os complexos de inclusão podem ser aplicados no desenvolvimento de vários sistemas como lipossomas, microesferas, microcápsulas e nanopartículas, além dos efeitos mais estudados como solubilidade e dissolução, biodisponibilidade, redução da toxicidade e aumento da estabilidade de fármacos (CHALLA et al., 2005; BIBBY et al., 2000). Dentro deste contexto, normalmente ciclodextrinas são utilizadas com fármacos hidrofóbicos possibilitando a permanência na fase aquosa dos Sistemas de Liberação controlada devido ao aumento da solubilidade. Gilet et al. (2009) encapsularam o complexo de inclusão

betametasona-HP γ -CD em lipossomas, Lira et al. (2009a) encapsularam o complexo ácido úsnico- β -CD em lipossomas.

2.5. Nanotecnologia Farmacêutica

Nanotecnologia pode ser definida como: i. pesquisa e desenvolvimento de tecnologia a nível atômico, molecular ou macromolecular em uma escala de comprimento em torno de 1 a 999 nanômetros; ii. criação e uso de estruturas, dispositivos e sistemas que possuem propriedades novas e funções por causa da sua pequena dimensão e/ou tamanho intermediário; iii. capacidade de controlar e manipular na escala atômica. A nanotecnologia move-se para o centro da atenção pública devido a sua ampla gama de aplicações que trazem impactos tanto na comunidade científica como no mercado. A nanotecnologia pode ser aplicada nas áreas biomédicas, ópticas, eletrônica, mecânica, química bem como bens de consumo como alimentos e cosméticos (MU e SPRANDO, 2010; MOZAFARI et al., 2008).

Dentre as aplicações da nanotecnologia, à farmacêutica está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas e lipossomas. A descoberta dos lipossomas nos anos 1960 aumentou a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica com sistemas lipídicos para vetorização de fármacos (BATISTA et al., 2007; PIMENTEL et al., 2007).

Ainda, produtos nanotecnológicos podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos o que permite a manutenção constante das concentrações do mesmo nos fluídos corporais dentro da faixa terapêutica bem como redução na sua toxicidade, isto não ocorre com sistemas convencionais que frequentemente podem atingir níveis subterapêuticos ou tóxicos nos sistemas biológicos (Figura 6). A medicina moderna utiliza vários sistemas de liberação controlada em escala nanométrica como nanopartículas e lipossomas, mas estes últimos são os mais amplamente usados. As principais vantagens são a baixa toxicidade, serem biodegradáveis, não antigênicos, boa solubilidade e fácil preparação. As principais desvantagens são a estabilidade, esterilização, produção industrial com maior custo do que sistemas convencionais e reprodutibilidade (LASIC, 1993).

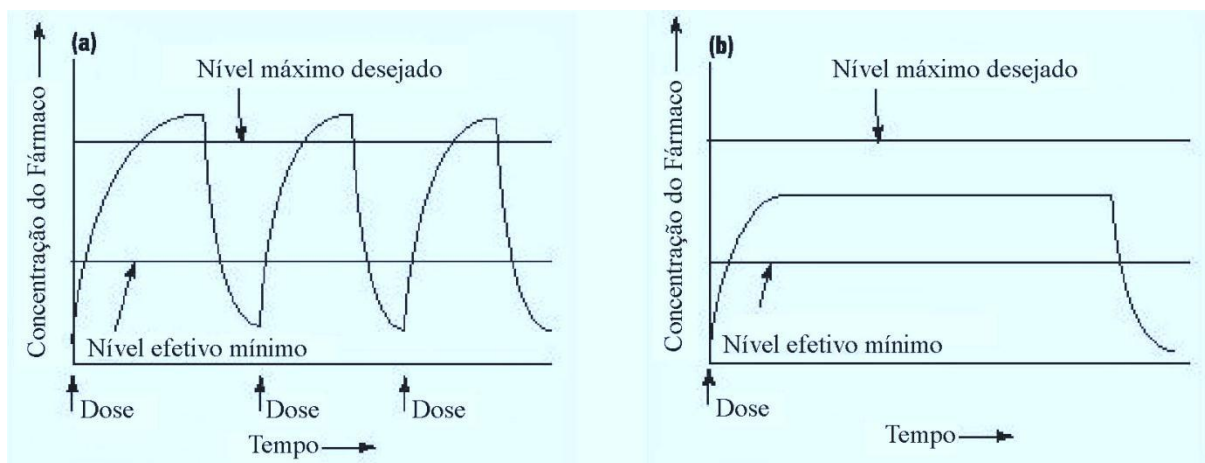


Figura 6: Farmacocinética de um sistema convencional (a) e de um sistema de liberação controlada (b) (Modificado de LOW et al., 2001).

2.5.1. Lipossomas

Desde a observação pioneira de Alec Bangham há cerca de meio século que fosfolípidos em solução aquosa podem formar estruturas fechadas em bicamadas, os lipossomas têm percorrido um longo caminho para não serem apenas mais um objeto de pesquisas biofísicas e sim tornarem-se um sistema de liberação de fármacos com numerosas aplicações (TORCHILIN, 2005). Os lipossomas foram introduzidos como sistemas de liberação na década de 70, mas os resultados iniciais foram decepcionantes devido a sua instabilidade coloidal e biológica, além da instabilidade da encapsulação dos fármacos, devido a isto permaneceu muito tempo sem ser considerado um potencial sistema de liberação controlada. Obviamente estes problemas foram contornados de forma que a partir da década de 80 começaram a surgir produtos no mercado (GREGORIADIS, 2008; LASIC, 1998).

Atualmente os lipossomas são utilizados nas mais variadas áreas do conhecimento, devido a sua propriedade de simular membranas naturais, incluindo a matemática e a física teórica (topologia de superfícies bidimensionais), biofísica (membranas celulares e canais), bioquímica (função das proteínas de membrana), biologia (excreção celular, função e sinalização celular, função de genes). Nas aplicações, eles podem ser usados como sistemas de liberação controlada para antifúngicos, agentes anticâncer, vacinas, formulações cosméticas (produtos para pele e shampoo), diagnóstico e uso na indústria de alimentos (MOZAFARI et al., 2008; LASIC, 1998).

Os lipossomas são vesículas esféricas (Figura 7), constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FANG et al., 2006b; FRÉZARD et al., 2005; GREGORIADIS e RYMAN, 1972). Podem ser usados como sistema transportador visando direcionar o fármaco para a célula alvo e evitar locais indesejáveis onde o fármaco exerça toxicidade com elevada

biocompatibilidade. Além disso, 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 (BATISTA et al., 2007; FRÉZARD et al., 2005).

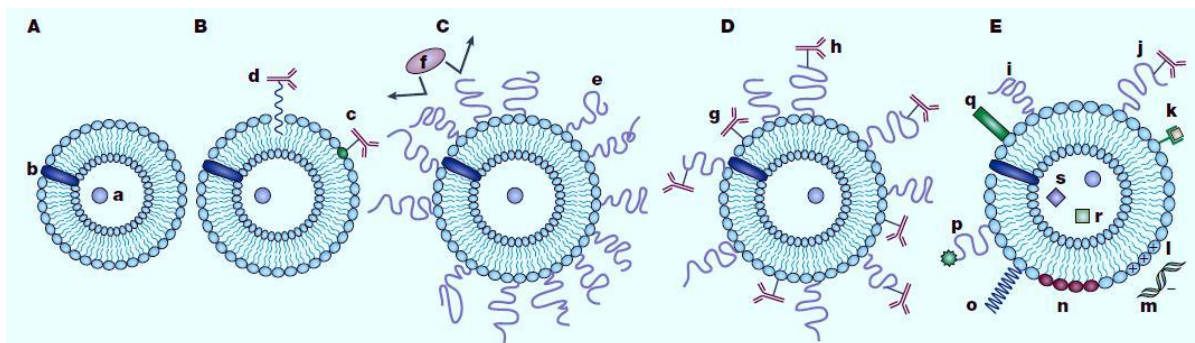


Figura 7: A. Lipossoma convencional com fármaco solúvel em água (a) encapsulado no interior aquoso, e fármaco insolúvel em água (b) encapsulado à bicamada lipídica. B. Lipossoma sítio específico - Imunolipossoma com o anticorpo covalentemente ligado (c) aos fosfolipídeos reativos da membrana, ou hidrofobicamente ancorados (d) à bicamada. C. Lipossoma de longa circulação ou furtivo com um polímero de proteção (e) como o PEG, que protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas de opsonização (f). D. Imunolipossoma furtivo que pode ter simultaneamente o polímero de proteção e anticorpos fixados à superfície do lipossoma (g) ou, preferencialmente, a extremidade distal do polímero (h). E. Lipossoma de nova geração, a superfície pode ser modificada (separadamente ou simultaneamente) por diferentes maneiras. Entre essas modificações são: Ligação do polímero de proteção (i) ou polímero de proteção e ligante alvo, como um anticorpo (j), incorporação de rótulos de diagnóstico (k), incorporação de lipídeos carregados positivamente (l), permitindo a complexação com DNA (m), incorporação de lipídeos sensíveis a estímulos (n), ligação de polímeros sensíveis a estímulos (o), ligação de peptídeos (p), incorporação de componentes virais (q). Além do fármaco, lipossomas podem ser carregados com partículas magnéticas (r) para sensores magnéticos de segmentação e / ou com ouro e partículas de prata (s) para microscopia eletrônica (Fonte: TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas convencionais são compostos de fosfolipídeos e colesterol, podendo possuir carga negativa ou positiva proveniente de outros fosfolipídeos ou surfactantes para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade da dispersão. *In vivo*, os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, sendo então, rapidamente removidos da circulação o que limita sua aplicação a locais específicos, mas não inviabiliza a aplicação destes. Os lipossomas sítio-específicos são direcionados por possuírem ligantes acoplados em sua superfície, que conferem seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação desejado. A superfície destes lipossomas é modificada permitindo a conjugação com anticorpos e peptídeos. Lipossomas de longa circulação ou furtivos possuem revestimento em sua superfície como os polímeros hidrofílicos sintéticos ou

naturais, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) prevenindo o reconhecimento e consequente associação com as opsoninas no plasma, desse modo, reduzindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (LIRA et al., 2009b; BATISTA et al., 2007; TORCHILIN, 2005).

Diversos parâmetros físico-químicos são utilizados para a caracterização dos lipossomas como a medida do tamanho da vesícula dividindo os lipossomas em GUV (*giant unilamellar vesicles*) – vesículas unilamelares gigantes em escala micrométrica (10-100 μm); MLV (*Multilamellar large vesicle*) – vesículas grandes (0,5-10 μm) em escala micrométrica com vários compartimentos aquosos; LUV (*Large unilamellar vesicle*) – vesícula grande (500 nm $\approx$ 1 μm) em escala micrométrica com um único compartimento aquoso; SUV (*Small unilamellar vesicle*) – vesícula em escala nanométrica (20 $\approx$ 150 nm) com um único compartimento aquoso (Figura 8) (BIBI et al., 2011; BATISTA et al., 2007; MAESTRELLI et al., 2006). Outro parâmetro importante é o índice de polidispersão (PDI), este é uma medida estatística do erro relativo entre o ajuste da curva e os valores experimentais, o que caracteriza a homogeneidade das dispersões coloidais. Valores de PDI superiores a 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanho muito grande. Portanto, resultados que revelam baixo PDI indicam homogeneidade na formulação (CADDEO et al., 2008).

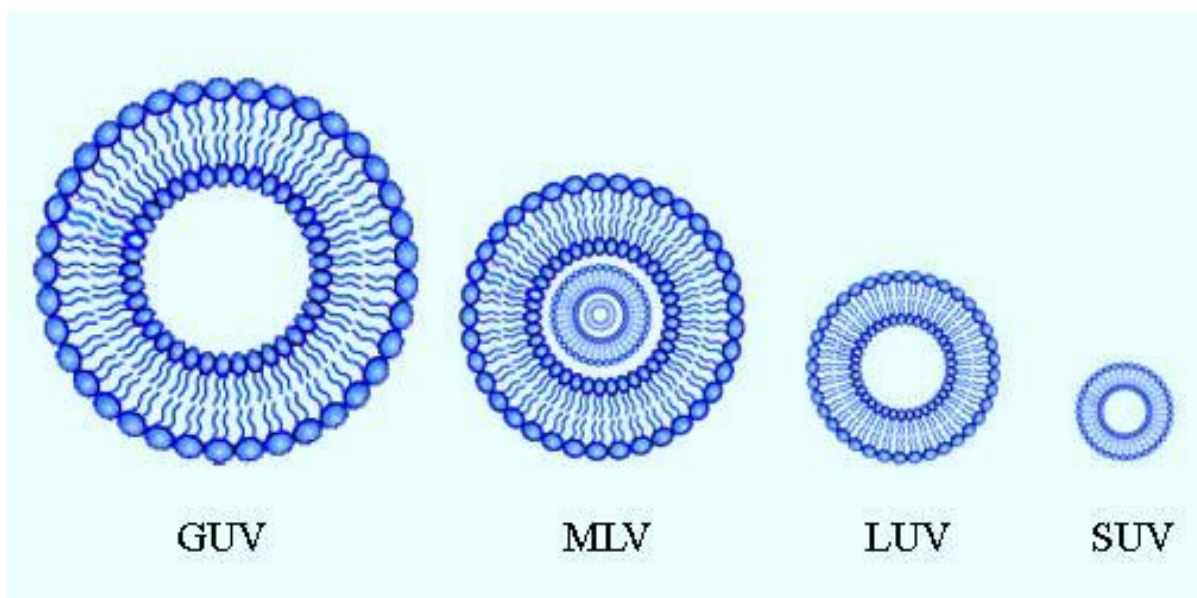


Figura 8: Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas, maiores informações no texto (Modificado de TORCHILIN, 2005).

Outro parâmetro a ser medido é o potencial zeta que é um bom índice da magnitude de interação das forças de repulsão entre as vesículas, é comumente usado para avaliar a

estabilidade de uma dispersão. Se as vesículas apresentarem um grande potencial zeta, negativo ou positivo, ocorre repulsão e a formulação será estável. Dispersões com baixo potencial zeta, a força de repulsão entre as vesículas será baixa, consequentemente ocorrerá agregação e instabilidade da dispersão (CADDEO et al., 2008).

Um dos métodos de preparação dos lipossomas MLV's é a hidratação do filme lipídico (Figura 9). Os lipídeos são primeiramente dissolvidos em solventes orgânicos, seguido da evaporação do solvente com consequente formação do filme lipídico. A hidratação deste último pode ser efetuada com água ou solução tampão, sobre agitação magnética vigorosa, promovendo a formação da dispersão de lipossomas multilamelares (BATISTA et al., 2007; LASIC, 1993). Isto ocorre devido à capacidade natural dos fosfolipídeos de formar complexos agregados para proteger suas porções hidrofóbicas das moléculas da água, mantendo apenas o contato com estas com suas porções hidrofílicas. Quando determinada quantidade de energia é fornecida a estes agregados, são obtidas vesículas com bicamadas lipídicas (MOZAFARI et al., 2008). O fármaco a ser encapsulado pode ser dissolvido na mistura lipídica (lipofílicos) ou incorporado na solução tampão (hidrofílico). A produção de SUV's, obtida por sonicação da dispersão, envolve a entrada de uma grande quantidade de energia (Figura 10), a sonda é imersa na dispersão lipossomal, ou indiretamente, a amostra contida em um béquer é imersa em um banho de ultrassom (LASIC, 1993).

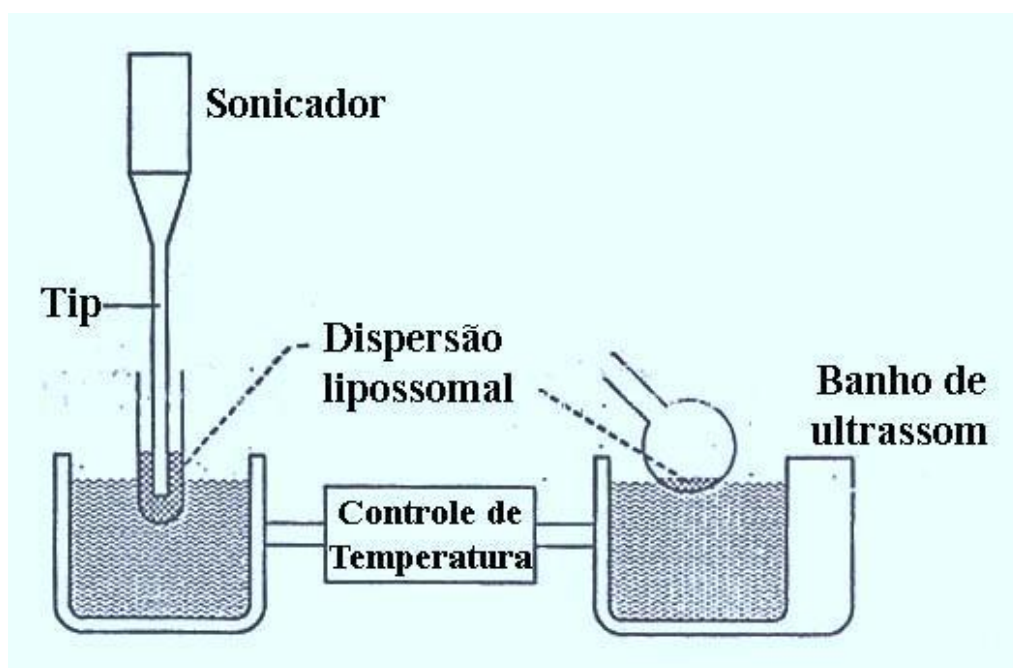


Figura 9: Apresentação esquemática dos tipos de sonda: direta onde o sonicador é imerso na dispersão lipossomal e indireta onde a dispersão é exposta a um banho de ultrassom (Modificado de LASIC, 1993).

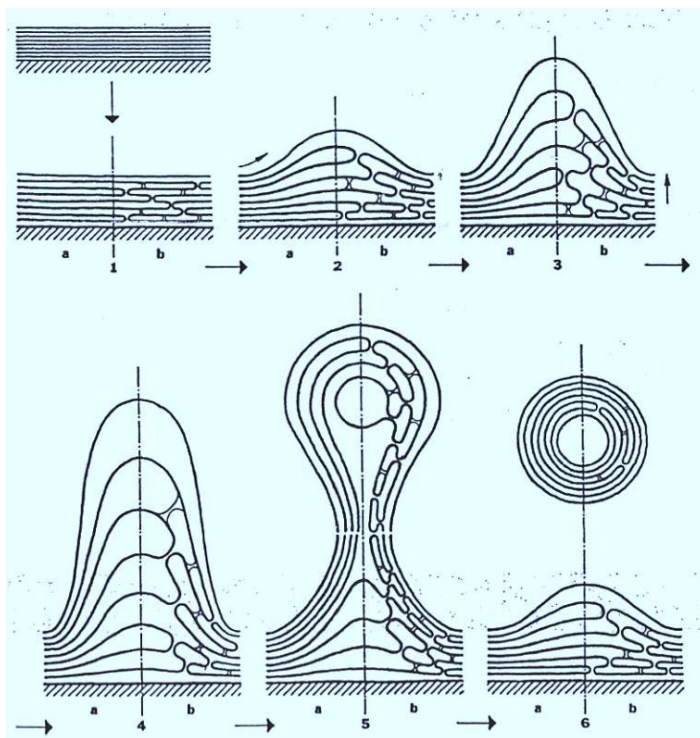


Figura 10: Apresentação esquemática da formação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. Linhas indicam as camadas de fosfolípidos. Na parte direita de cada imagem é possível ver o crescimento de camadas de fosfolípidos adjacentes. Setas em 2a e 3b mostram a direção preferencial de migração das moléculas lipídicas (Fonte: LASIC, 1993).

Os lipossomas vêm sendo administrados por diversas vias, como oral, parenteral ou tópica (MAESTRELLI et al., 2006). Esta última está associada a uma série de modernos produtos cosméticos relacionados à nanotecnologia (MÜLLER et al., 2007; GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2006), como hidratantes, produtos capilares e maquiagens. Por exemplo, os lipossomas antienvelhecimento baseados em formulações tópicas (cremes, loções, géis e hidrogéis) foram formulados para o mercado de cosméticos desde 1986 pela L'Oreal na forma de niosomas e Christian Dior formulou sob a forma de lipossomas (Capture™). Lipossomas são usados em aplicações cosméticas ou transdérmicas com a expectativa de que seu uso irá resultar em um aumento da concentração de agentes ativos (vitaminas A, E e CoQ10) na epiderme com nenhuma toxicidade aguda ou crônica (MU e SPRANDO, 2010). Lipossomas também podem ser usados em adesivos para a pele como reportado por Souto et al. (2008).

2.5.2. Lipossomas elásticos

Surfactantes não iônicos, catiônicos, aniônicos e zwitteriônicos incluindo neste grupo sais biliares, como desoxicolato de sódio e o colato de sódio, podem ser utilizados como agentes tensoativos na formação de lipossomas, estes são conhecidos como lipossomas

elásticos ou transferossomas[®] como inicialmente descritos por CEVEC (GILLET et al., 2009; CEVC, 2000; CEVC et al., 1997; CEVC e BLUME, 1992). A principal vantagem dos lipossomas elásticos é a sua elevada adaptabilidade devido a uma bicamada flexível permitindo que os mesmos penetrem intactos (Figura 11) pelos espaços entre as células (GILLET et al., 2011) ou barreiras permeáveis. Apesar da presença do SDC como constituinte, estes lipossomas ainda não foram aplicados na dissolução de gorduras subcutâneas.

Esta elevada adaptabilidade, segundo Gillet et al. (2009), apresenta-se como uma vantagem para a utilização destes lipossomas por via tópica, pois uma das principais barreiras do organismo é o estrato córneo. Nesta última, há uma melhor liberação do fármaco devido à força motriz fornecida pelo gradiente osmótico entre as camadas externa e interna do estrato córneo (CEVC e BLUME, 1992).

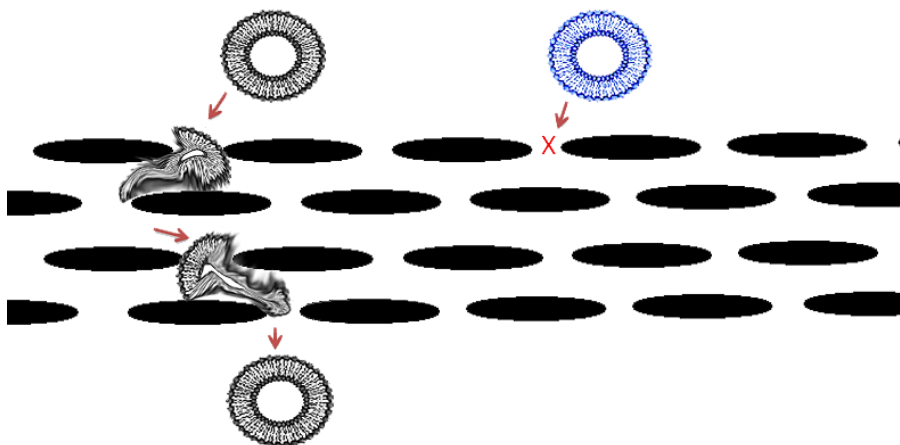


Figura 11: Esquema demonstrando a passagem de um lipossoma elástico (preto) por uma barreira permeável. O lipossoma clássico (azul) não consegue penetrar esta barreira.

2.5.3. Administração de lipossomas por via subcutânea

O tecido adiposo é um tipo especial de tecido conjuntivo com a presença dos adipócitos, este tecido é o maior depósito corporal de energia sob a forma de triglicerídeos. Abaixo da derme, em algumas partes do corpo, existe o tecido subcutâneo (Figura 12) ou panículo adiposo que possui uma camada variável de tecido adiposo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A via de administração subcutânea (S.C.) é utilizada com frequência para fármacos que não irritam o tecido, pois pode ocorrer dor intensa, necrose e descamação tecidual. A taxa de absorção de um fármaco por esta via costuma ser suficientemente constante e lenta para oferecer um efeito prolongado. Esta via é utilizada para absorção de

fármacos em *pellets* sob a pele que ocorre lentamente durante semanas ou meses de forma eficaz (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Em relação aos lipossomas, a administração pela via S.C. pode apresentar vantagens tais como: 1. Propiciar a administração de altas concentrações do fármaco encapsulado, comparada à forma livre, sem efeito nocivo; 2. Proteção dos tecidos adjacentes da toxicidade de fármacos encasulados (OUSSOREN et al., 1998). A via S.C. já foi bastante estudada e hoje se sabe que até mesmo alterações no local de injeção podem provocar efeitos diferentes daquele desejado, a anatomia do local também influencia na ação das formulações lipossomais (OUSSOREN et al., 1997b).

O tamanho do lipossoma é o fator mais importante para a permanência do mesmo no local de injeção. Apenas pequenos lipossomas (≤ 100 nm) ou neutros parecem entrar nos capilares linfáticos do tecido subcutâneo, pois se deslocam através do interstício enquanto que lipossomas maiores tendem a permanecer no local da injeção (Figura 13) (DE ARAÚJO et al., 2003; OUSSOREN e STORM, 2001; OUSSOREN et al., 1997a). Provavelmente ocorre devido a um aumento da pressão intersticial no local da injeção provocando a permanência ou até mesmo a agregação de lipossomas levando a formação de grandes agregados (OUSSOREN e STORM, 2001).

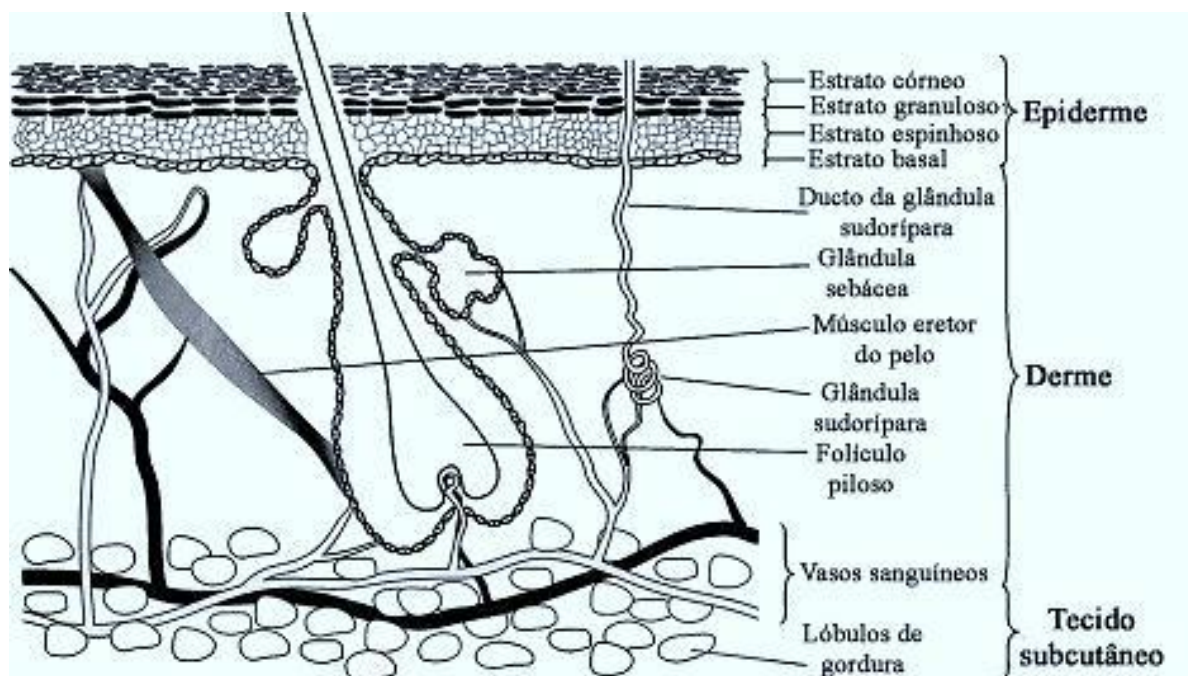


Figura 12: Representação esquemática de uma secção transversal da pele humana mostrando as diferentes camadas celulares e apêndices (Modificado de EL MAGHRABY et al., 2008).

Também foi observado que lipossomas pequenos parecem obter mais êxito para atingirem os linfonodos de acordo com Oussoren *et al.* (1997a). Os mesmos autores também

concluíram que a composição lipídica da bicamada não influencia na absorção linfática com uma exceção – lipossomas neutros contendo DPPC que parecem servir de sinal para a captação destes pelos macrófagos presentes nos linfonodos (OUSSOREN e STORM, 2001). A via S.C. necessita de injeções frequentes para a manutenção dos níveis terapêuticos (ANDRADE et al., 2004), desta forma os sistemas de liberação controlada de fármacos aparecem como uma alternativa viável para a redução na quantidade de aplicações. A concentração de constituintes lipídicos lipossomais influencia na permanência da formulação no local de injeção, principalmente na faixa de 10^1 – 10^4 nmol de lipídeos por rato. A quantidade de lipídeos recuperados do local de injeção bem como a recuperada nos linfonodos aumenta linearmente com a dose administrada (OUSSOREN e STORM, 2001).

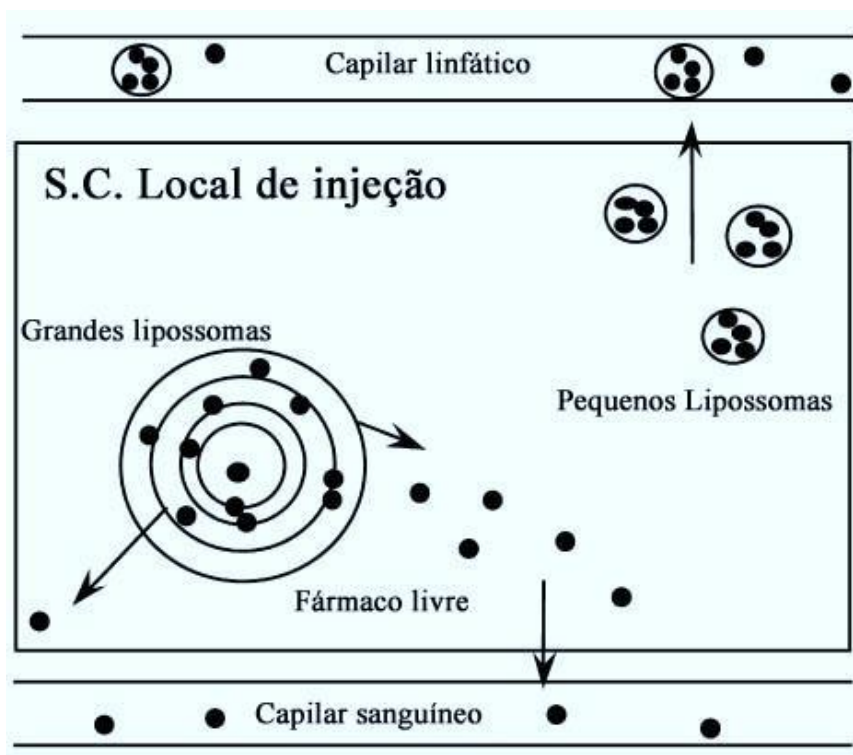


Figura 13: Representação esquemática da absorção linfática de lipossomas injetados por via subcutânea. Após S.C., lipossomas injetados não tem acesso direto à corrente sanguínea devido à permeabilidade do capilar que é restrita a água e pequenas moléculas. Em vez disso, lipossomas podem ser absorvidos pelos capilares linfáticos sendo drenados do local de injeção. A absorção linfática depende fortemente do tamanho dos lipossomas. Lipossomas pequenos (≤ 100 nm) podem entrar nos capilares linfáticos e se acumulam nos gânglios linfáticos regionais. Lipossomas maiores permanecem no local de injeção e lentamente se desestabilizam e se degradam ao mesmo tempo liberando o fármaco encapsulado. Com a liberação, o fármaco pode entrar na circulação sanguínea. Pequenos fármacos com peso molecular < 16 kDa podem entrar no compartimento sanguíneo passando através dos poros das paredes do capilar, as moléculas maiores são transportadas principalmente pelos vasos linfáticos (Modificado de OUSSOREN e STORM, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Esta Tese tem por objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de sais biliares complexados a ciclodextrinas e, a obtenção de uma formulação lipossomal em escala nanométrica contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol livres e/ou complexados a ciclodextrinas.

3.2. Específicos

- Produzir e caracterizar um complexo de inclusão ciclodextrina-ácido desoxicólico e ciclodextrina-ácido ursodesoxicólico;
- Validar um método simples de detecção dos ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico;
- Obter e caracterizar lipossomas contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol livres e/ou complexados a ciclodextrinas;
- Estudar os efeitos das concentrações dos constituintes lipossomais das formulações acima obtidas;
- Analisar os parâmetros físico-químicos dos lipossomas;
- Determinar a eficiência de encapsulação de todas as formulações lipossomais;
- Realizar ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração dos lipossomas contendo os fármacos encapsulados;
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* dos fármacos a partir dos lipossomas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAY, I. et al. Removal and pre-concentration of phenolic species onto β -cyclodextrin modified poly(hydroxyethylmethacrylate-ethyleneglycoldimethacrylate) microbeads. *Chemosphere*, v. 61, n. 9, p. 1263-1272, 2005.

ABDEL-SHAFI, A. A. Spectroscopic studies on the inclusion complex of 2-naphthol-6-sulfonate with β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 66, n. 3, p. 732-738, 2007.

AFKHAMI, A. et al. Spectrophotometric determination of fluoxetine by batch and flow injection methods. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, n. 12, p. 1642-1646, 2006.

AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 373, n. 4, p. 545-549, 2008.

AL-SHERBINI, E.-S. A. M. Spectroscopic study of the inclusion complexes of 1-methyl-4-[4'-aminostyryl] quinolinium iodide with α, β, γ -cyclodextrins in the ground and excited states. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 85, n. 1-2, p. 25-31, 2005.

ALBERDI, G. et al. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutrition and Metabolism*, v. 8, 2011.

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

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.

ANSELMINI, C. et al. Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, n. 4, p. 645-652, 2008.

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.

ATIYEH, B. S. et al. Cosmetic mesotherapy: Between scientific evidence, science fiction, and lucrative business. *Aesthetic Plastic Surgery*, v. 32, n. 6, p. 842-849, 2008.

AVRAM, M. M. et al. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 1. Introduction. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, n. 4, p. 663-670, 2005.

BAILE, C. A. et al. Effect of resveratrol on fat mobilization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1215, p. 40-47, 2011.

BATISTA, C. M. et al. Liposomes and their therapeutic: State of art applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BAUR, J. A. Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1804, n. 8, p. 1626-1634, 2010a.

BAUR, J. A. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 131, n. 4, p. 261-269, 2010b.

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.

BENESI, H. A.; HILDEBRAND, J. H. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 71, n. 8, p. 2703-2707, 1949.

BIBBY, D. C. et al. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 197, n. 1-2, p. 1-11, 2000.

BIBI, S. et al. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 7, p. 645-666, 2007.

BROWN, S. A. The science of mesotherapy: Chemical anarchy. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 26, n. 1, p. 95-98, 2006.

CADDEO, C. et al. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, n. 1-2, p. 183-191, 2008.

CADENA, P. G. et al. Physical-chemical parameters and validation of a colorimetric method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 164, n. 2, p. 99-105, 2011.

CADENA, P. G. et al. Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein- β -cyclodextrin inclusion complex. *Lipids*, v. 44, n. 11, p. 1063-1070, 2009.

CAI, W. et al. Bimodal complexations of steroids with cyclodextrins by a flexible docking algorithm. *Journal of Inclusion Phenomena*, v. 51, n. 1, p. 41-51, 2005.

CEVC, G. *Preparation for the application of agents in mini-droplets*. United States Patent number 6165500, 2000.

CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1104, n. 1, p. 226-232, 1992.

CEVC, G. et al. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. *Journal of Controlled Release*, v. 45, n. 3, p. 211-226, 1997.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*, v. 6, n. 2, 2005.

CHEN, I. L. et al. Lymphatic absorption of quercetin and rutin in rat and their pharmacokinetics in systemic plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 1, p. 546-551, 2010.

CHEN, W. et al. Calculation of cyclodextrin binding affinities: Energy, entropy, and implications for drug design. *Biophysical Journal*, v. 87, n. 5, p. 3035-3049, 2004.

DAL-PAN, A. et al. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiology*, v. 10, n. 1, 2010.

DE ARAÚJO, D. R. et al. Drug-delivery systems for local anesthetics: Therapeutic applications. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 53, n. 5, p. 663-671, 2003.

DE LEON-RODRIGUEZ, L. M.; BASUIL-TOBIAS, D. A. Testing the possibility of using UV-vis spectrophotometric techniques to determine non-absorbing analytes by inclusion complex competition in cyclodextrins. *Analytica Chimica Acta*, v. 543, n. 1-2, p. 282-290, 2005.

DEBRUYNE, P. R. et al. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 480-481, p. 359-369, 2001.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DUNCAN, D. et al. Refinement of technique in injection lipolysis based on scientific studies and clinical evaluation. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 36, n. 2, p. 195-209, 2009.

DUNCAN, D. I.; CHUBATY, R. Clinical safety data and standards of practice for injection lipolysis: A retrospective study. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 26, n. 5, p. 575-585, 2006.

DUNCAN, D. I.; HASENGSCHWANDTNER, F. Lipodissolve for subcutaneous fat reduction and skin retraction. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 25, n. 5, p. 530-543, 2005.

DUNCAN, D. I.; PALMER, M. Fat reduction using phosphatidylcholine/sodium deoxycholate injections: Standard of practice. *Aesthetic Plastic Surgery*, v. 32, n. 6, p. 858-872, 2008.

EL MAGHRABY, G. M. et al. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

FANG, J.-Y. et al. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, n. 1-2, p. 131-138, 2006a.

FANG, J.-Y. et al. Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *Journal of Dermatological Science*, v. 42, n. 2, p. 101-109, 2006b.

FERNÁNDEZ-LEYES, M. D. et al. Aqueous sodium dehydrocholate-sodium deoxycholate mixtures at low concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 314, n. 2, p. 659-664, 2007.

FRÉZARD, F. et al. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GEORGIOU, M. E. et al. Flow injection gradient technique in spectrophotometric determination of formation constants of micromolecule-cyclodextrin complexes. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 1, p. 114-123, 1995.

GHOREISHI, S. M. et al. Study of inclusion complex formation between a cationic surfactant, two cyclodextrins and a drug. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 62, n. 3-4, p. 279-284, 2008.

GILLET, A. et al. Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 380, n. 1-2, p. 174-180, 2009.

GILLET, A. et al. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

GLAZYRIN, A. E. et al. Inclusion compounds of some water-soluble β -cyclodextrin derivatives with phenolphthalein. *Russian Journal of General Chemistry*, v. 74, n. 12, p. 1922-1925, 2004.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 2, p. 167-178, 2006.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GREGORIADIS, G. Liposome research in drug delivery: The early days. *Journal of Drug Targeting*, v. 16, n. 7-8, p. 520-524, 2008.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Lysosomal localization of β -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. *Biochemical Journal*, v. 129, n. 1, p. 123-133, 1972.

GUNARATNE, A.; CORKE, H. Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on physical properties and transition parameters of amylose-lipid complexes of native and acetylated starches. *Food Chemistry*, v. 108, n. 1, p. 14-22, 2008.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

HERNÁNDEZ BALBOA, M. A. et al. Study of chlorambucil and chlorambucil-trimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex by CE. *Chromatographia*, v. 67, n. 1-2, p. 193-196, 2008.

HEXSEL, D. M. et al. Cosmetic uses of injectable phosphatidylcholine on the face. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 38, n. 5, p. 1119-1129, 2005.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 50, n. 11, p. 1072-1079, 2006.

IKEGAMI, T.; MATSUZAKI, Y. Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. *Hepatology Research*, v. 38, n. 2, p. 123-131, 2008.

ISHIDA, T. et al. Attenuation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity by resveratrol: A comparative study with different routes of administration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n. 5, p. 876-881, 2009.

JADHAV, G. S.; VAVIA, P. R. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol- β -cyclodextrin complex. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, n. 1-2, p. 5-16, 2008.

JULLIAN, C. et al. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 67, n. 1, p. 230-234, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KADRI, M. et al. Inclusion complexes of N-sulfamoyloxazolidinones with β -cyclodextrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 4, p. 889-894, 2005.

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.

KIM, S. et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochemical Pharmacology*, v. 81, n. 11, p. 1343-1351, 2011.

KLEIN, S. M. et al. In vitro studies investigating the effect of subcutaneous phosphatidylcholine injections in the 3T3-L1 adipocyte model: Lipolysis or lipid dissolution? *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 124, n. 2, p. 419-427, 2009.

LASIC, D. D. *Liposomes: From physics to applications*. Netherlands: Elsevier, 1993.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LINDOR, K. D. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. *New England Journal of Medicine*, v. 336, n. 10, p. 691-695, 1997.

LIRA, M. C. B. et al. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 64, n. 3-4, p. 215-224, 2009a.

LIRA, M. C. B. et al. In vitrouptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *Journal of Liposome Research*, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2009b.

LIU, Y. et al. Novel permethylated β -cyclodextrin derivatives appended with chromophores as efficient fluorescent sensors for the molecular recognition of bile salts. *Journal of Organic Chemistry*, v. 72, n. 22, p. 8227-8234, 2007.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

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

LU, Z. et al. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 113, n. 1, p. 17-20, 2009.

MAESTRELLI, F. et al. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 312, n. 1-2, p. 53-60, 2006.

MANN, M. W. et al. New advances in liposuction technology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 27, n. 1, p. 72-82, 2008.

MARPLES, B. A.; STRETTON, R. J. *Antifungal utility of bile acids*. United States Patent number 4681876, 1987.

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

MILBURN, M. et al. *Methods and related compositions for treating or preventing obesity, insulin resistance disorders, and mitochondrial-associate disorders*. United States Patent number WO2007008548A2, 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.

MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, v. 18, n. 4, p. 309-327, 2008.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of nanotechnology in cosmetics. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n. 8, p. 1746-1749, 2010.

MUKHERJEE, S. et al. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-Response*, v. 8, n. 4, p. 478-500, 2010.

MÜLLER, R. H. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MURA, P. et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, n. 1, p. 85-95, 1999.

NAKASHIMA, T. et al. Potentiometric study on critical micellization concentrations (CMC) of sodium salts of bile acids and their amino acid derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 24, n. 2, p. 103-110, 2002.

NASONGKLA, N. et al. Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 10, p. 1626-1633, 2003.

NELSON, D. et al. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

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.

ODO, M. E. Y.; CUCÉ, L. C. *Cholic acid and/or its derivatives for the reduction of localized fat in the human body*. Brazil Patent number PI04189639A, 2006.

OHNO, R. et al. Hydrolysis of ionized deoxycholic acid in the aqueous phase and rate analysis for transfer of neutralized deoxycholic acid into the benzene phase across the benzene/water interface. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 112, n. 45, p. 14103-14107, 2008.

OKORO, N. et al. Ursodeoxycholic acid treatment for patients with postcholecystectomy pain and bile microlithiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 68, n. 1, p. 69-74, 2008.

ORIENTI, I. et al. Complexation of ursodeoxycholic acid with β -cyclodextrin-choline dichloride coprecipitate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 190, n. 2, p. 139-153, 1999.

OUSSOREN, C. et al. The influence of the route of administration and liposome composition on the potential of liposomes to protect tissue against local toxicity of two antitumor drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1369, n. 1, p. 159-172, 1998.

OUSSOREN, C.; STORM, G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 50, n. 1-2, p. 143-156, 2001.

OUSSOREN, C. et al. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1328, n. 2, p. 261-272, 1997a.

OUSSOREN, C. et al. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection I. Influence of the anatomical site of injection. *Journal of Liposome Research*, v. 7, n. 1, p. 85-99, 1997b.

PALUMBO, P. et al. Effects of phosphatidylcholine and sodium deoxycholate on human primary adipocytes and fresh human adipose tissue. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 23, n. 2, p. 481-489, 2010.

PARK, H. J. et al. 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.

PETRONI, M. L. et al. Ursodeoxycholic acid alone or with chenodeoxycholic acid for dissolution of cholesterol gallstones: A randomized multicentre trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 15, n. 1, p. 123-128, 2001.

PIMENTEL, L. F. et al. Application of pharmaceutical nanotechnology to the treatment of malaria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PRIETO-HONTORIA, P. L. et al. Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: A molecular nutrition approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1807, n. 6, p. 664-678, 2011.

PRINCE, P. S. M.; SATHYA, B. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 635, n. 1-3, p. 142-148, 2010.

PRIPREM, A. et al. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 4, n. 1, p. 70-78, 2008.

RAINS, T. M. et al. Antiobesity effects of green tea catechins: A mechanistic review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2011.

RAMAESH, K. et al. Effect of bile acids on fibroblast proliferation and viability. *Eye*, v. 12, n. 4, p. 717-722, 1998.

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.

RITTES, P. G. The use of phosphatidylcholine for correction of lower lid bulging due to prominent fat pads. *Dermatologic Surgery*, v. 27, n. 4, p. 391-392, 2001.

RODA, A. et al. Bile acid structure-activity relationship: Evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of Lipid Research*, v. 31, n. 8, p. 1433-1443, 1990.

RODRÍGUEZ, V. G. et al. Determination of bile acids in pharmaceutical formulations using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, n. 2-3, p. 375-381, 2000.

ROTHWELL, J. A. et al. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 11, p. 4355-4360, 2005.

ROTUNDA, A. M. et al. Lipomas treated with subcutaneous deoxycholate injections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, n. 6, p. 973-978, 2005.

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

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. et al. Randomized double-blind clinical trial of subcutaneously injected deoxycholate versus a phosphatidylcholine-deoxycholate combination for the reduction of submental fat. *Dermatologic Surgery*, v. 35, n. 5, p. 792-803, 2009.

SAMSTEIN, R. M. et al. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles. *Biomaterials*, v. 29, n. 6, p. 703-708, 2008.

SCHULLER-PETROVIC, S. et al. Tissue-toxic effects of phosphatidylcholine/deoxycholate after subcutaneous injection for fat dissolution in rats and a human volunteer. *Dermatologic Surgery*, v. 34, n. 4, p. 529-542, 2008.

SEABRA, L. Classes D e E querem produtos sofisticados. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/arquivos/noticia.pdf>> Acesso em: 29 jul. 2011

SETCHELL, K. D. R. et al. Bioequivalence of a new liquid formulation of ursodeoxycholic acid (Ursofalk suspension) and Ursofalk capsules measured by plasma pharmacokinetics and biliary enrichment. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 21, n. 6, p. 709-721, 2005.

SHAH, P. K.; PATEL, J. A. Resveratrol and its biological actions. *International Journal of Green Pharmacy*, v. 4, n. 1, p. 15-21, 2010.

SHANMUGAM, M. et al. Host-guest interaction of l-tyrosine with β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 71, n. 1, p. 125-132, 2008.

SOLA, S. et al. Plasma levels of ursodeoxycholic acid in black bears, *Ursus americanus*: Seasonal changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, n. 2, p. 204-208, 2006.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]). *International Journal of Cosmetic Science*, v. 30, n. 3, p. 157-165, 2008.

STEWART, L. K. et al. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, v. 57, n. Supplement 1, p. S39-S46, 2008.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.

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

TAWARAH, K. M.; KHOURI, S. I. J. Determination of the stability and stoichiometry of p-methyl red inclusion complexes with γ -cyclodextrin. *Dyes and Pigments*, v. 45, n. 3, p. 229-233, 2000.

TAY, J. et al. Systematic Review of Controlled Clinical Trials on the Use of Ursodeoxycholic Acid for the Prevention of Hepatic Veno-occlusive Disease in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 13, n. 2, p. 206-217, 2007.

TERZIC, N. et al. Deoxycholic acid-derived tetraoxane antimalarials and antiproliferatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 21, p. 5118-5127, 2007.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 2, p. 145-160, 2005.

VALENTA, C. et al. Deoxycholate-hydrogels: Novel drug carrier systems for topical use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 185, n. 1, p. 103-111, 1999.

VAN DER VEEN, B. A. et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1543, n. 2, p. 336-360, 2001.

VEIGA, F. et al. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VENTURA, C. A. et al. Improvement of water solubility and dissolution rate of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid by complexation with natural and modified [beta]-cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 149, n. 1, p. 1-13, 1997.

WALLE, T. *Use of quercetin and resveratrol to treat and prevent oral cancer*. United States Patent number WO2005082407A1, 2005.

WHO. Obesity. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>> Acesso em: 25 jul. 2011

YANEZ, C. et al. Spectrophotometric and electrochemical study of the inclusion complex between β -cyclodextrin and furnidipine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, n. 1, p. 51-56, 2004.

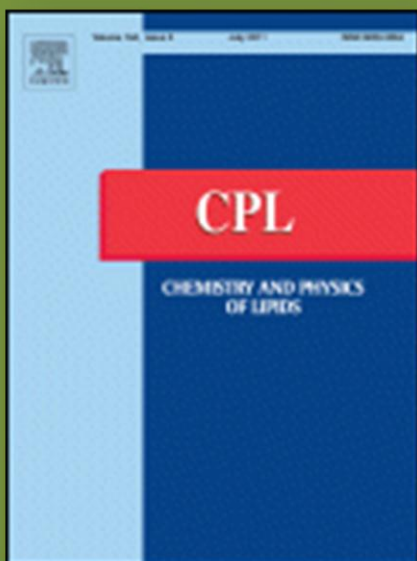
YANG, J.-Y. et al. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sciences*, v. 82, n. 19-20, p. 1032-1039, 2008.

YEN, G. C. et al. Effects of polyphenolic compounds on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced changes of adipokines and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 546-551, 2011.

YOO, S. H. *Preparation of aqueous clear solution dosage forms with bile acids*. Patent number 7,303,768, 2007.

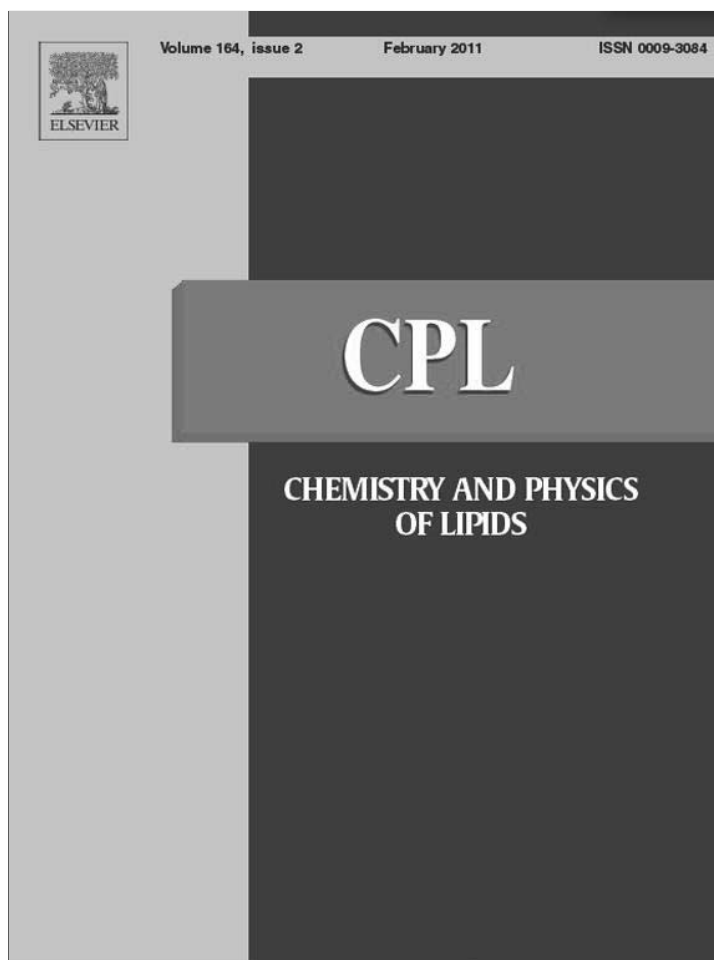
ZHANG, M. et al. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 71, n. 5, p. 1891-1895, 2009.

ZHU, X. et al. Study on the inclusion interactions of β -cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta*, v. 72, n. 1, p. 237-242, 2007.



Capítulo 2

Physical–chemical parameters and validation of a colorimetric method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

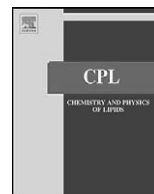
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip

Physical–chemical parameters and validation of a colorimetric method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor

Pabyton G. Cadena^{a,b,*}, Alberto N. Araújo^c, Maria C.B.S.M. Montenegro^c,
Maria C.B. Pimentel^a, José L. Lima Filho^a, Valdinete L. Silva^b^a Lab. de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n 50780-901 Recife, Pernambuco, Brazil^b Lab. de Engenharia Ambiental e da Qualidade (LEAQ), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Arthur de Sá,

s/n Cidade Universitária, 50740-521 Recife, Pernambuco, Brazil

^c REQUIMTE, Dep. de Química-Física, Faculdade de Farmácia, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2009

Received in revised form

22 November 2010

Accepted 25 November 2010

Available online 1 December 2010

Keywords:

Deoxycholic acid

Ursodeoxycholic acid

 β -Cyclodextrin

Inclusion complex

Phenolphthalein

Optical sensor

ABSTRACT

The simple and low cost β -cyclodextrin (β -CD)–phenolphthalein (PHP) inclusion complex was used for both the study of physical–chemical parameters and validation of analytical procedures for deoxycholic acid (DCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) determinations in different formulations. The usefulness of this inclusion complex is proposed either in the form of kit reagent and as an original optical sensor for DCA and UDCA. The results showed that temperature had a negative effect on the equilibrium constant resulting in high negative values of enthalpy and positive values of entropy. The half-life values for DCA and UDCA measurements were 68.71 and 294.71 days, respectively. The method was validated showing limits of detection and quantification of $4.92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and $1.64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ for DCA, $1.14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and $3.79 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for UDCA, respectively. The developed optical sensor also showed response linearity, ease of implementation and potential application in fast screening tasks even out of the laboratory.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Besides playing an important physiological role in biological systems some bile acids such as the deoxycholic acid (DCA), are also employed to enhance oral availability of biodegradable nanoparticles (Samstein et al., 2008), as choleric agent in liver dysfunctions (Rodriguez et al., 2000), as *N*-(2-dimethylamino)ethyl derivatives in malaria treatment (Terzic et al., 2007) and in several cosmetic preparations (Valenta et al., 1999). Injection lipolysis for subcutaneous application primarily aiming cosmetic proposes were initially used in Brazil. They were based on a mixture of phosphatidylcholine and DCA as major active components (Duncan et al., 2009; Rotunda et al., 2004), being lately replaced by formulations containing only DCA (Rotunda and Kolodney, 2006; Yagima Odo et al., 2007). However, due to the associated health risks both of them have been forbidden by national sanitary authorities like ANVISA (the Brazilian National Health Surveillance Agency)

and FDA in US. Another important bile acid, the ursodeoxycholic acid (UDCA) is also used in the treatment of primary biliary cirrhosis, primary cholangitic sclerosis (Lindor, 1997), cholelithiasis (Petroni et al., 2001), to prevent the relapse of acute pancreatitis caused by microlithiasis (Okoro et al., 2008) and to reduce alanine aminotransferase levels in hepatitis C (Ikegami and Matsuzaki, 2008).

Due to stated applications of both bile acids, a variety of methods are routinely used to measure their content in pharmaceutical formulations, such as: electrochemical (voltammetric), fluorimetric or spectrophotometric (Arias De Fuentes et al., 2000), HPLC (Scalia et al., 1989) and micellar electrokinetic chromatographic (Rodriguez et al., 2000). Nevertheless, each of one has its own disadvantage (Arias De Fuentes et al., 2000; Lin et al., 2003) which added to complexity of the samples treatment turn difficult the “in loco” control by national sanitary authorities thus usually addressing the formulation or cosmetic sample into the laboratory for further processing and analysis. The research about validated simple and low cost methods for measurement of bile acids in commercial formulations can be also useful for screening tasks during technological development replacing expensive technologies more difficult to access in developing countries. In this way, inclusion complexes formed between cyclodextrins and indicators provide the basis

* Corresponding author at: Lab. de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n 50780-901 Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8484; fax: +55 81 2126 8485.

E-mail address: pabyton@yahoo.com.br (P.G. Cadena).

for simplified methods of measurement of hydrophobic molecules such as is the case of bile acids (Cadena et al., 2009).

The important property of cyclodextrins (CDs) – cyclic oligosaccharides with six (α -), seven (β -) or eight (γ -) glucose residues linked by α -(1–4) glycosidic bonds (Yanez et al., 2004) – and their numerous derivatives is the ability to form inclusion complexes with inorganic and organic guests (Brewster and Loftsson, 2007). Concomitantly, inclusion in cyclodextrins exerts a profound effect on the physicochemical properties of guest molecules such as solubility, chemical stability, absorption and bioavailability (Zhang et al., 2009). Guests reaction with CDs by competitive complexation with indicators has been used to assess the respective equilibrium constants (K_c) and other related thermodynamic parameters due to the fails in the direct determination of the complex. For example, phenolphthalein (PHP) is a typical acid/base indicator that forms a colourless 1:1 inclusion complex with β -CD and by this used in indirect determinations of other colourless compounds by competitive complexation reaction (Afkhani et al., 2006; Glazyrin et al., 2004).

Herein, the temperature dependence of the equilibrium constants of the PHP–, DCA– and UDCA– β -cyclodextrin were used to obtain thermodynamic parameters, i.e. the free energy change (ΔG), the enthalpy change (ΔH) and the entropy change (ΔS). The usefulness of the obtained data is evidenced in the subsequent validation of analytical procedures based on the β -cyclodextrin–phenolphthalein (β -CD–PHP) inclusion complex as kit reagent or optical sensor both providing rapid, inexpensive and simple alternative method for “in loco” measurements and fast screening.

2. Experimental

2.1. Materials

Analytical grade chemicals without any further purification treatment and double deionised water were used thoroughly. β -cyclodextrin was obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Phenolphthalein, deoxycholic acid (sodium salt) and ursodeoxycholic acid were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Absorption spectra were collected from a Pharmacia Ultrospec 3000pro UV/Vis spectrophotometer using 1-cm path length quartz cells. Statistical evaluations were carried out by Statistica software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and the images were analysed by trial version of Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of analytical reagent

The co-precipitation technique (Del Valle, 2004) enabled to prepare the inclusion complexes in batch conditions using the following solutions: 1 mL of phenolphthalein solution, 1 mL of carbonate buffer solution (pH 10.5; 150 mmol L⁻¹) (Afkhani et al., 2006) and 1 mL of β -CD solution. For having a homogeneous system the mixture was vigorously mixed after each solution addition (the order did not interferes in the result), then readily transferred into a dark flask and kept at room temperature (25 °C). Humidity and temperature effects were considered neglected because all experiments and kit storage were performed in the same acclimatized room.

2.2.2. Development of the method (kit reagent)

The competitive inclusion complexes above obtained were just homogenized with either 1 mL of water (control) or 1 mL of bile acid solution (sample). The positive control to study the absorbance of the phenolphthalein was made using 1 mL of PHP solution, 1 mL carbonate buffer (pH 10.5; 150 mmol L⁻¹) and 2 mL of water, which

was strongly mixed after each solution addition. The blank solution was composed of 1 mL the same buffer plus 3 mL of water.

Absorption spectra were obtained at pH 10.5, containing 1.55×10^{-4} mol L⁻¹ phenolphthalein (PHP) and different amounts of β -cyclodextrin (β -CD), 3.88×10^{-5} up to 6.20×10^{-4} mol L⁻¹, at 25 °C. Spectra for DCA analysis were carried out using 4.38×10^{-5} up to 7.0×10^{-4} mol L⁻¹ DCA solutions and β -CD–PHP complex in the fixed proportion of 6.2×10^{-4} : 1.55×10^{-4} mol L⁻¹. In turn, for UDCA analysis 1.19×10^{-5} up to 1.9×10^{-4} mol L⁻¹ solutions of this bile acid were assayed with the β -CD–PHP complex (3.1×10^{-4} : 7.75×10^{-5} mol L⁻¹).

Temperature effect was assessed in the range from 10 up to 55 °C for the 8.75×10^{-5} up to 1.40×10^{-3} mol L⁻¹ DCA and 2.38×10^{-5} up to 1.9×10^{-4} mol L⁻¹ UDCA concentrations, while keeping pH constant at the value of 10.5.

The effect of the ionic strength on inclusion complex formation with DCA or UDCA and β -CD was examined in the range from 0.11 up to 0.40 using β -CD–PHP – 6.2×10^{-4} : 1.55×10^{-4} mol L⁻¹ for DCA and 3.1×10^{-4} : 7.75×10^{-5} mol L⁻¹ for UDCA, according to Wang et al. (2007).

Storage stability of the kit reagent developed was evaluated by maintaining two solutions of this complex at 25 °C during 60 days in dark flasks. At defined time intervals, samples were withdrawn from each of one for testing with solutions containing 7.0×10^{-4} mol L⁻¹ of DCA and 1.9×10^{-4} mol L⁻¹ of UDCA, respectively.

2.2.3. Validation of the method (kit reagent)

The methodology used to validate the determination of DCA and UDCA followed the procedures presented by the EMEA (European Medicines Agency – CPMP/ICH/381/95) and ANVISA (Brazilian National Health Surveillance Agency – RE 899, May 2003).

Absorbances vs. concentration linearity was evaluated using authentic solutions of each bile acid and from them 10 samples at the range 8.3×10^{-6} up to 3.36×10^{-3} mol L⁻¹ for DCA or 8.0×10^{-6} up to 4.0×10^{-4} mol L⁻¹ for UDCA were measured. Assays with each solution were performed in triplicate. At the experimental conditions previously established, the linearity of the calibration graphs were validated for both bile acids by the least squares method and the one-way analysis of variance (ANOVA) for $p < 0.05$.

Standard curves were then established to $\pm 20\%$ over the specified range, 5.6×10^{-4} up to 8.4×10^{-4} mol L⁻¹ for the DCA and from 1.52×10^{-4} up to 2.28×10^{-4} mol L⁻¹ for the UDCA, respectively. Therefore, results of the triplicate assays at five different concentrations were considered.

For evaluation of the repeatability, three concentrations of the DCA (5.6×10^{-4} , 7.0×10^{-4} and 8.4×10^{-4} mol L⁻¹) and UDCA (1.52×10^{-4} , 1.9×10^{-4} and 2.28×10^{-4} mol L⁻¹) were assayed in nine determinations (3 concentrations/3 replicates). Intermediate precision was assessed with solutions of the same concentration in a 2² full factorial design considering different analysts and equipments (Pharmacia Ultrospec 3000pro and Micronal B582). The limit of detection was defined as $C_L = 3.3S_B/m$, where C_L , S_B , and m are respectively the limit of detection, standard deviation and slope, also the same approach was applied for the limit of quantification defined by $C_{LQ} = 10S_B/m$.

Accuracy was established by comparison of the concentrations found in pharmaceutical formulations: Injectable Phosphatidylcholine formula (Rotunda et al., 2004) – phosphatidylcholine 5% (w/v), deoxycholic acid (sodium salt) 4.75% (w/v), benzyl alcohol 0.9% (v/v), water 100 mL; injectable deoxycholate formula (Yagima Odo et al., 2007) – deoxycholic acid (sodium salt) 2.5% (w/v), benzyl alcohol 1% (v/v), propylene glycol 10% (v/v), water 100 mL; Ursacol® – Ursodeoxycholic acid 300 mg and excipients (lactose, povidone, crospovidone, magnesium stearate) with the ones obtained for standardized solutions of DCA (5.6×10^{-4} , 7.0×10^{-4}

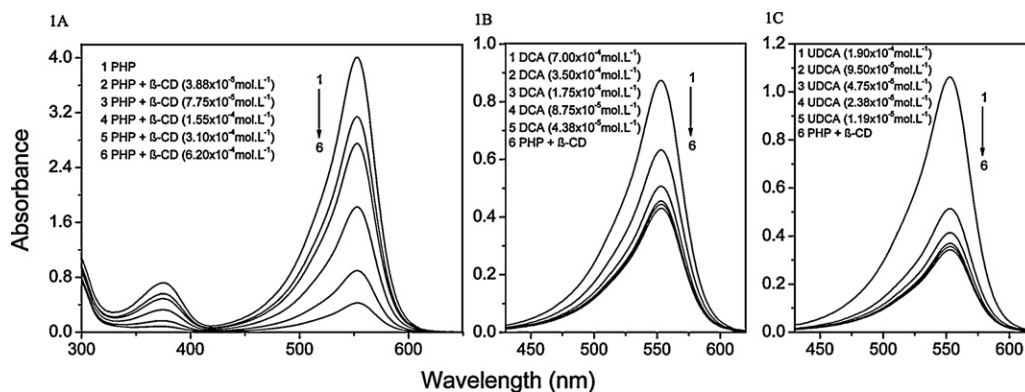


Fig. 1. Absorption spectrum of phenolphthalein (PHP – 1A) ($1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) at pH 10.5 in different β -cyclodextrin (β -CD) concentrations (3.88×10^{-5} up to $6.20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Determination of (4.38×10^{-5} up to $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) deoxycholic acid (DCA – 1B) by the inclusion complex of β -CD-PHP (6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and (1.19×10^{-5} up to $1.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) of ursodeoxycholic acid concentrations (UDCA – 1C) by the inclusion complex of β -CD-PHP (3.1×10^{-4} : $7.75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

and $8.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and UDCA (1.52×10^{-4} , 1.9×10^{-4} and $2.28 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) in nine determinations (3 concentrations/3 replicates).

The robustness was evaluated based on the variations in the analytical conditions, such as pH (10.3–10.7) and water (distilled, deionised, double deionised), using different settling conditions for each variation.

2.3. Optical chemical sensor for bile acids

Optical chemical sensor strips were implemented using $2 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$ Bristol-paper strips afterwards soaked for 2 min in 5 mL of 1% (w/v) sodium alginate gel containing the β -CD-PHP inclusion complex (6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ for DCA and 3.1×10^{-4} : $7.75 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for UDCA) and finally dried for 24 h (25°C). Later, 20 μL of DCA (1.68×10^{-3} up to $8.40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) or UDCA (4.56×10^{-4} up to $2.28 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) solution was added. Colour changes were evaluated using a scanner (Model HP 5590) for obtaining images with 600dpi definition. All the images were downloaded to a computer, each image was converted to 8-bit grayscale by Adobe Photoshop software and the arithmetic mean of pixel intensity within each test zone was used to quantify the colorimetric response by the observed RGB (red, green, and blue colour system) values of digital images (Yang et al., 2007). Finally, the background-corrected response was calculated by subtraction of the each sample and control (without bile acids) values (Martinez et al., 2008a).

3. Results and discussion

3.1. Development of the method (kit reagent)

The spectral changes obtained for phenolphthalein solutions in the presence of different β -CD concentrations are shown in Fig. 1A. Phenolphthalein interacted with the β -CD in alkaline pH causing a decrease of more than 95% in the absorption band at the wavelength of 553 nm. The ionised red form of PHP was forced into β -CD cavity, forming its colourless lactone structure without protonation of the phenolic groups (Afkhami et al., 2006). Spectra of phenolphthalein solutions with increasing amount of β -CD revealed a proportional decrease of the free PHP up to concentration of $6.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ at pH 10.5 resulting in the ratio of 1:4 for PHP: β -CD. Higher concentrations of β -CD did not cause additional observable decrease in absorbance. However, the addition of bile acids forced the PHP leaves the cavity of β -CD molecules returning to its ionised red form in the alkaline solution (Fig. 1B and C). Thus, the extent of the

solution colour change can then be easily determined by standard curve of the free PHP and the corresponding concentration related with the amount of bile acid.

The effect of temperature on the absorbance of solutions containing the complexes with PHP, DCA and UDCA is presented in Fig. 2, where can be observed that with the increase of temperature an increase in absorbance was induced. Similar findings were previously described by Zarzycki and Lamparczyk (1998) being this effect caused by destabilization of the complex (Del Valle, 2004), with consequent phenolphthalein release. Hence, it becomes difficult to distinguish between the absorbance increase caused by an increase in the bile acid affinity by the β -CD cavity or the simple destabilization of the inclusion complex. For this reason, the temperature for the following studies was fixed at 25°C , once it was enabled in both extended absorbance range for free PHP and β -CD-PHP inclusion complex, and there was no significant differences for robustness ($p < 0.05$ by Turkey's test) working between 20 and 30°C .

The equilibrium constants ($K_{C1:1}$ bile acid/cyclodextrin) for the β -CD-PHP, β -CD-DCA and β -CD-UDCA inclusion complexes were obtained by means of the Benesi-Hildebrand plot (Abdel-Shafi, 2007; Benesi and Hildebrand, 1949) according to Eqs. (1) and (2):

$$\text{PHP} + \beta\text{-CD} \rightleftharpoons \beta\text{-CD-PHP}, \quad K_c = \frac{[\beta\text{-CD-PHP}]}{[\text{PHP}][\beta\text{-CD}]} \quad (1)$$

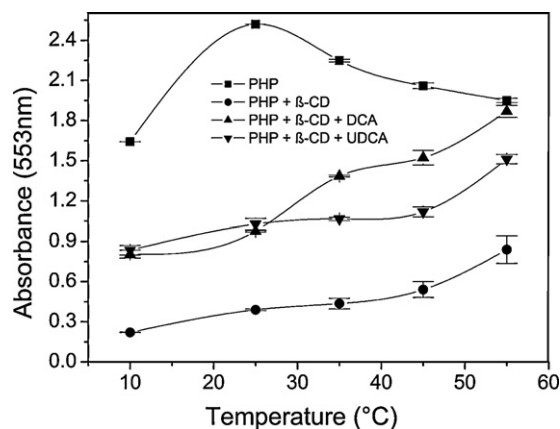


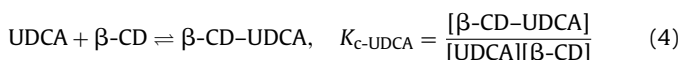
Fig. 2. Temperature effect (10 – 55°C) on the phenolphthalein (PHP); β -CD-PHP inclusion complex (6.2×10^{-4} : $1.55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) formation and complex interaction with deoxycholic (DCA – $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and ursodeoxycholic acids (UDCA – $1.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Table 1
Equilibrium constants (K_c) of the inclusion complexes: β -cyclodextrin–phenolphthalein (β -CD–PHP) without or with the deoxycholic acid (DCA) or ursodeoxycholic acid (UDCA) at different temperatures and the thermodynamic parameters.

Inclusion complexes	T (K)	K_c ($\times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
β -CD–PHP	298	1.7(± 0.1)	–2.4(± 0.2)	–16(± 1)	26(± 3)
	308	1.4(± 0.1)	–2.5(± 0.2)	–	–
	318	1.17(± 0.07)	–2.5(± 0.2)	–	–
	328	0.93(± 0.04)	–2.5(± 0.1)	–	–
β -CD–DCA	298	2.60(± 0.01)	–2.53(± 0.01)	–10(± 1)	50(± 5)
	308	2.39(± 0.01)	–2.59(± 0.01)	–	–
	318	2.12(± 0.01)	–2.64(± 0.01)	–	–
	328	1.77(± 0.01)	–2.68(± 0.01)	–	–
β -CD–UDCA	298	2.81(± 0.01)	–2.55(± 0.01)	–13(± 1)	43(± 3)
	308	2.43(± 0.01)	–2.59(± 0.01)	–	–
	318	2.13(± 0.01)	–2.64(± 0.01)	–	–
	328	1.76(± 0.01)	–2.67(± 0.01)	–	–

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{a} + \frac{1}{aK_c[\beta\text{-CD}_0]} \quad (2)$$

where A and A_0 are the absorbances of PHP in the presence and absence of β -CD, respectively, a is a constant related to the molar absorption coefficient changes, and $[\beta\text{-CD}_0]$ is the initial concentration of β -CD. Yuexian et al. (2005) described the competitive complexation equilibrium constant ($K_{c1:1}$) between amino acid and methyl orange that can be applied for K_c determination between DCA or UDCA with β -CD by Eqs. (3)–(6):



$$K_{c\text{BA}} = \frac{[\beta\text{-CD}_0] - [\text{CD}]}{[\text{CD}]([\text{BA}]_0 - [\beta\text{-CD}_0] + [\text{CD}])} \quad (5)$$

where $[\text{BA}]_0$ represented the initial concentration bile acid. $K_{c\text{BA}}$ represented the equilibrium constant of bile acid– β -CD, $[\text{CD}]$ was the uncomplexing β -CD concentration when bile acid, PHP and β -CD coexisted in solution and it was related to the absorbance variety of phenolphthalein in solution. $[\text{CD}]$ could be obtained from:

$$[\text{CD}] = \frac{E_{\text{PHP}} - E}{K_c(E - E_{\beta\text{-CD-PHP}})} \quad (6)$$

where E_{PHP} and $E_{\beta\text{-CD-PHP}}$ represented the absorbance of uncomplexing phenolphthalein and β -CD–PHP inclusion complex, respectively; E was the absorbance of system in which bile acid, PHP and β -CD coexisted (Yuexian et al., 2005). For the selected wavelength of 553 nm the corresponding molar absorptivity β -CD–PHP complex is negligible, the absorbance of the solution is mainly due to free PHP (uncomplexed). In turn, PHP releasing causes an absorbance increase which is proportional to bile acids concentration in solution, allowing the K_c determination (Cadena et al., 2009). The values of K_c were determined at various temperatures (25 up to 55 °C) and at pH 10.5. Table 1 shows the temperature effect in the equilibrium constant ($K_{c1:1}$ bile acid/cyclodextrin).

The thermodynamic parameters (Table 1) were calculated according to the Van't Hoff Eq. (7) which describes the temperature dependence as function of K ($K_{c1:1}$). The $\ln K$ values were plotted as a function of the inverse temperature to give a linear relationship. Then, the apparent enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) changes were obtained from the slope and the intercept of the curve (Del Valle, 2004; Wang et al., 2007; Yuexian et al., 2005).

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

Apparent free energy change (ΔG) was obtained according to the Eq. (8):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (8)$$

The Van't Hoff plots were linear and exhibited large negative ΔH and positive ΔS for the developed complexes; these results were similar to those reported by Holm et al. (2009) for conjugated bile acids, suggesting an exothermic inclusion processes.

It was also observed an enthalpy decrease and entropy increase to the inclusion complex with the bile acids compared to β -CD–PHP inclusion complex. These results suggested that the inclusion processes of DCA and UDCA into the β -CD cavity were more favourable and spontaneous than that of PHP. In all cases ΔG was negative showing that the inclusion complexes formation can be spontaneous.

According to Jullian et al. (2008), the formation of an inclusion complex with cyclodextrin occurs due to the hydrogen bonding with the OH groups at the periphery of the cavity, Van der Waals and hydrophobic interactions. Generally, solute inclusion in the cyclodextrin cavity is associated with large negative values of ΔH . Either negative or slightly positive ΔS values indicating inclusion complexation of the guest without extensive desolvation in a primarily enthalpy-driven process. The same behaviour has been reported by several authors which confirmed the great contribution from Van der Waals forces for the complexes formation (Brewster and Loftsson, 2007; Castronuovo and Niccoli, 2006).

The effect of ionic strength on inclusion of the β -CD–PHP complex at constant concentration was examined in the range from 0.11 up to 0.40. For this study, different concentrations of NaCl solution were prepared leading to systems containing H^+ , Na^+ , CO_3^{2-} , Cl^- , PHP, and β -CD. Due to the lower concentration of PHP and the neutral molecule β -CD, their contributions to ionic strength were negligible, so the H^+ , Na^+ , CO_3^{2-} and Cl^- are only responsible to ionic strength in the systems. The changes in the absorbance of inclusion complex as a function of ionic strength were carried out. The absorbance of inclusion complex gradually decreased with a rise in the ionic strength with significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$). May be due to the system polarities were enhanced by ionic strength. Second Wang et al. (2007), the enhancement of polarity of solution is favourable to the hydrophobic interaction of β -CD molecules, which shields the interaction between β -CD molecule and PHP molecule and leads to decrease of the absorbance inclusion complex.

The study of the β -CD–PHP inclusion complex as kit reagent showed that it was stable for bile acids determination up to 12 days. A loss of about 30% for DCA and 12% regarding UDCA determinations were observed after 30 days of storage at 25 °C. The inactivation

Table 2
Validation data ($p < 0.05$).

		Linearity			
		DCA	UDCA		
Linearity range Standard curve		8.30×10^{-6} – 1.68×10^{-3} mol L ^{−1} ABS = −0.0069(±0.0091) + 870.0373(±12.4216)DCA _{mol/L}	8.00×10^{-6} – 2.28×10^{-3} mol L ^{−1} ABS ^{0.5} = 0.0699(±0.011) + 4506.688(±77.1179)UDCA _{mol/L}		
Correlation coefficient		0.99919	0.99898		
Robustness ^a					
pH	DCA	UDCA	Water	DCA	UDCA
10.3	–	97.75(±1.49)	Distilled	102.38(±1.52)	100.42(±0.95)
10.4	97.84(±3.53)	99.19(±1.76)	Deionised	100.11(±4.48)	98.04(±1.86)
10.5	100.00(±3.48)	100.0(±2.15)	Double deionised	100(±2.18)	100(±0.66)
10.6	102.62(±2.48)	99.01(±1.85)			
10.7	104.50(±0.46)	98.46(±0.97)			

^a %Mean ± %R.S.D.

Table 3
Accuracy of the kit reagent (β-CD-PHP) developed for different pharmaceutical formulations.

Drugs	Accuracy (%mean ± %R.S.D.)		
Deoxycholic acid standard	98.97 (±0.84)	101.36(±0.36)	99.31(±1.48)
Injectable Phosphatidylcholine formula (Rotunda et al., 2004)	97.11(±1.43)	101.33(±1.28)	100.51(±0.99)
Injectable deoxycholate formula (Yagima Odo et al., 2007)	98.08(±0.43)	102.77(±0.63)	102.52(±0.38)
Ursodeoxycholic acid standard	99.43(±1.17)	100.89(±0.54)	99.63(±0.21)
Ursacol®	98.1(±0.49)	98.7(±1.86)	99.22(±0.81)

constant (k_i) of the kit reagent was obtained by:

$$\ln A = \ln A_0 - k_i t \quad (9)$$

where A_0 is the initial absorbance of the bile acids and A is the final absorbance of the bile acids after 60 days. Furthermore, the half-life ($t_{1/2}$) can be obtained by:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (10)$$

The inactivation constants (k_i) of the kit reagent were of 1.01×10^{-2} day⁻¹ for DCA and 2.35×10^{-3} day⁻¹ for UDCA determinations. The half-life ($t_{1/2}$) for the kit reagent was 68.71 days for DCA and 294.71 days for the UDCA measurements. Despite the greater stability of the kit reagent for UDCA compared to that one for DCA, the last one allowed determinations in more concentrated solutions (data not shown) and pharmaceutical formulations containing high DCA concentrations (Rotunda et al., 2004; Schuller-Petrovic et al., 2008; Yagima Odo et al., 2007).

3.2. Validation of the method (kit reagent)

The spectrophotometric method using the developed kit reagent for DCA and UDCA was validated according to the EMEA and ANVISA guidelines. Thus the validation characteristics addressed were linearity, accuracy, precision, specificity, limits of detection and quantification and robustness (Table 2). The standard curves for the linearity assays were constructed with 10 concentrations and validated by the least squares method showing correlation coefficients higher than 0.998 and the one-way analysis of variance (ANOVA) showing F and p values of 4905.94 and less than 10^{-10} for DCA and 3415.11 and less than 10^{-9} for UDCA, respectively. For the range (80–120%), the standard curves were constructed with 5 concentrations showing correlation coefficients of the same order of magnitude.

The precision (repeatability) was determined by the percentage of relative standard deviation (%R.S.D.) at three levels (DCA – 5.6×10^{-4} , 7.0×10^{-4} and 8.4×10^{-4} mol L⁻¹ and UDCA – 1.52×10^{-4} , 1.9×10^{-4} and 2.28×10^{-4} mol L⁻¹). The %R.S.D. values were less than 3% obtained in the concentrations studied indicating a good repeatability. The use of an experimental design is encouraged by EMEA guidelines, in this way the intermediate precision

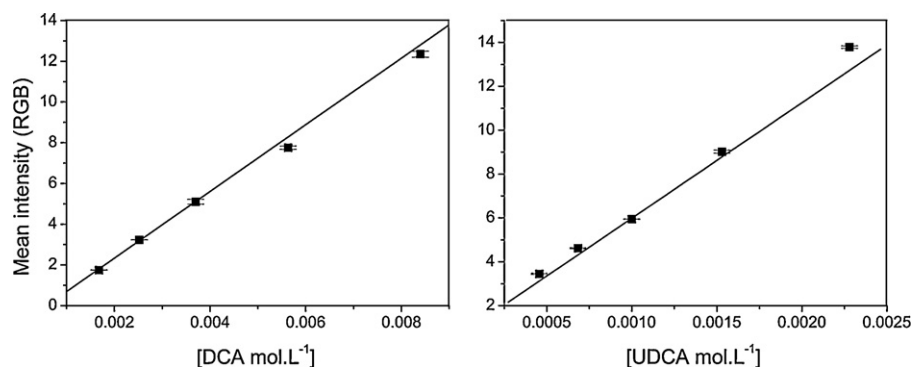


Fig. 3. Standard curve of the optical chemical sensor for deoxycholic and ursodeoxycholic acids (β-CD-PHP – 6.2×10^{-4} : 1.55×10^{-4} mol L⁻¹ for DCA and 3.1×10^{-4} : 7.75×10^{-5} mol L⁻¹ for UDCA) determinations.

was studied by a 2^2 full factorial design which did not present significant effects and interactions ($p < 0.05$). According to these results, the different analysts and equipments and your interactions did not interfere in the method.

The accuracy results demonstrated the method effectiveness for quantitative determination of DCA and UDCA in the pharmaceutical formulation. Accuracy was showed as percentage recovery of the target value, exhibited excellent results with bias lower than 2% throughout the tested range (Table 3). In the concentrations studied, the excipients used in the formulations and water type did not interfere in the results. The optimum pH was fixed at 10.5, condition that was also reported by Afkhami et al. (2006) and Glazyrin et al. (2004). Determinations performed at high pH conditions did not cause significant changes of the results and were limited by the buffering power of carbonate buffer (Table 2).

The limits of detection were of $4.92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for DCA and $1.14 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for UDCA, respectively. The corresponding limits of quantification were of $1.64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and $3.79 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Optical chemical sensor for bile acids

The results obtained concerning robustness of β -CD-PHP inclusion complex suggested its biotechnological application in the form of optical strip sensor for both qualitative and quantitative measurements of bile acids. Therefore, a mixture of alginate and β -CD-PHP inclusion complex was used to impregnate strips of paper. Alginate is largely used in biomolecule immobilization because it provides simple implementation using a biodegradable and non toxic material (Ha et al., 2009). Furthermore, it did not interfere either with the competitive complexation reaction or with the digital images obtained after colour change induced by the reaction. The quantitative analysis of digital images obtained from a scanner of the optical sensor is a recent tool to measure the amount of analytes. This new technology has been showed low cost and simplicity, very important for the developing world (Martinez et al., 2008b). The scanners are inexpensive, have high resolution, the scanned image is always in focus, the intensity of the image is not affected by lighting conditions, are portables (business card scanners or pen scanners), and they can be linked to personal digital assistants (PDAs) by wireless communication (Martinez et al., 2008a). In this technique, the analytical signal corresponds to the RGB-based value that was calculated from each digital image, using the proposed procedure based on the red, green, and blue colour system (Martinez et al., 2008a; Gaiao et al., 2006; Yang et al., 2007).

The test was only based on dropwise $20 \mu\text{L}$ of each bile acid solution and controls (buffer) in different places on the same strip, after 5 min at room temperature (25°C) when the tip was dried, followed by immediate scanning. However, after the scanning, the tip colour was observed for 3 h without any changes. Based on collected images, it was possible to plot a standard curves (Fig. 3) for DCA obtaining the equation: $\text{RGB} = 1553 (\pm 32) \text{ DCA}_{\text{mol/L}} - 0.8 (\pm 0.2)$ with a correlation coefficient of 0.9994 and UDCA with the corresponding equation $\text{RGB} = 5671 (\pm 229) \text{ UDCA}_{\text{mol/L}} + 0.6 (\pm 0.3)$ showing the correlation coefficient of 0.998.

4. Conclusion

The development of low cost and simple method for determining DCA and UDCA are important in quality control of raw materials and pharmaceutical formulations to prevent misuses and accidents when used for aesthetic purposes, specifically for the DCA. The β -CD-PHP inclusion complex showed to be a good alternative method for bile acids measurement. The physical–chemical and thermodynamic parameters studies for the application of inclu-

sion complexes as kit reagent or optical sensor was carried out. The proposed method had good storage stability, linearity and precision and can be applied to the analysis of a wide concentration range of DCA and UDCA in real samples with satisfactory results as kit reagent. The original optical chemical sensor developed showed good linearity suggesting that can be used for fast screening and the analyses “in loco” of bile acids in pharmaceutical formulations or raw materials.

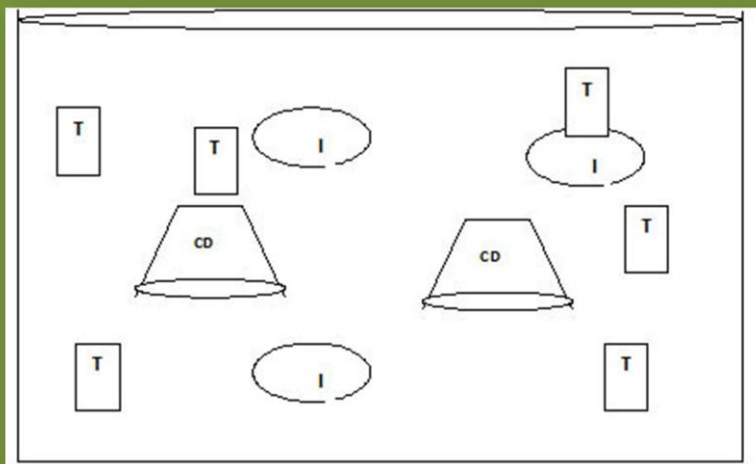
Acknowledgements

The authors thank FACEPE, CAPES-GRICES, LIKA/UFPE, CNPq, and Dr. Marta M.M.B. Duarte for her appreciated suggestions in methods validation.

References

- Abdel-Shafi, A.A., 2007. Spectroscopic studies on the inclusion complex of 2-naphthol-6-sulfonate with β -cyclodextrin. *Spectrochim. Acta A* 66 (3), 732–738.
- Afkhami, A., Madrakian, T., Khalafi, L., 2006. Spectrophotometric determination of fluoxetine by batch and flow injection methods. *Chem. Pharm. Bull.* 54 (12), 1642–1646.
- Arias De Fuentes, O., Campanella, L., Crescentini, G., Falcioni, A., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., 2000. Flow injection analysis of cholic acids in pharmaceutical preparations using a polymeric membrane ISE as detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (1), 89–98.
- Benesi, H.A., Hildebrand, J.H., 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 71 (8), 2703–2707.
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59 (7), 645–666.
- Cadena, P.G., Oliveira, E.C., Araújo, A.N., Montenegro, M.C.B.S.M., Pimentel, M.C.B., Lima Filho, J.L., Silva, V.L., 2009. Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein- β -cyclodextrin inclusion complex. *Lipids* 44 (11), 1063–1070.
- Castronuovo, G., Niccoli, M., 2006. Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with propranolol in aqueous solution at 298 K. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (11), 3883–3887.
- Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39 (9), 1033–1046.
- Duncan, D., Rubin, J.P., Golitz, L., Badylak, S., Kesel, L., Freund, J., Duncan, D., 2009. Refinement of technique in injection lipolysis based on scientific studies and clinical evaluation. *Clin. Plast. Surg.* 36 (2), 195–209.
- Gaiao, E.d.N., Martins, V.L., Lyra, W.d.S., Almeida, L.F.d., Silva, E.C.d., Araújo, M.C.U., 2006. Digital image-based titrations. *Anal. Chim. Acta* 570 (2), 283–290.
- Glazyrin, A.E., Grachev, M.K., Kurochkina, G.I., Nifant'ev, E.E., 2004. Inclusion compounds of some water-soluble β -cyclodextrin derivatives with phenolphthalein. *Russ. J. Gen. Chem.* 74 (12), 1922–1925.
- Ha, J., Engler, C.R., Wild, J.R., 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresour. Technol.* 100 (3), 1138–1142.
- Holm, R., Shi, W., Hartvig, R.A., Askaer, S., Christian Madsen, J., Westh, P., 2009. Thermodynamics and structure of inclusion compounds of tauro- and glyco-conjugated bile salts and β -cyclodextrin. *PCCP Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (25), 5070–5078.
- Ikegami, T., Matsuzaki, Y., 2008. Ursodeoxycholic acid: mechanism of action and novel clinical applications. *Hepato. Res.* 38 (2), 123–131.
- Jullian, C., Orosteguis, T., Pérez-Cruz, F., Sánchez, P., Mendizabal, F., Olea-Azar, C., 2008. Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin. A thermodynamic and reactivity study. *Spectrochim. Acta A* 71 (1), 269–275.
- Lin, M.-C., Wu, H.-L., Kou, H.-S., Wu, S.-M., Chen, S.-H., 2003. Simple and sensitive fluorimetric liquid chromatography for simultaneous analysis of chenodiol and ursodiol in pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta* 493 (2), 159–166.
- Lindor, K.D., 1997. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. *N. Engl. J. Med.* 336 (10), 691–695.
- Martinez, A.W., Phillips, S.T., Carrilho, E., Thomas Iii, S.W., Sindi, H., Whitesides, G.M., 2008a. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal. Chem.* 80 (10), 3699–3707.
- Martinez, A.W., Phillips, S.T., Wiley, B.J., Gupta, M., Whitesides, G.M., 2008b. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab Chip* 8 (12), 2146–2150.
- Okoro, N., Patel, A., Goldstein, M., Narahari, N., Cai, Q., 2008. Ursodeoxycholic acid treatment for patients with postcholecystectomy pain and bile microlithiasis. *Gastrointest. Endosc.* 68 (1), 69–74.
- Petroni, M.L., Jazrawi, R.P., Pazzi, P., Lanzini, A., Zuin, M., Pigozzi, M.G., Fracchia, M., Galatola, G., Alvisi, V., Heaton, K.W., Podda, M., Northfield, T.C., 2001. Ursodeoxycholic acid alone or with chenodeoxycholic acid for dissolution of cholesterol gallstones: a randomized multicentre trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15 (1), 123–128.

- Rodriguez, V.G., Lucangioli, S.E., Fernandez Otero, G.C., Carducci, C.N., 2000. Determination of bile acids in pharmaceutical formulations using micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2–3), 375–381.
- Rotunda, A.M., Kolodney, M.S., 2006. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections: historical clarification and review. *Dermatol. Surg.* 32 (4), 465–480.
- Rotunda, A.M., Suzuki, H., Moy, R.L., Kolodney, M.S., 2004. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol. Surg.* 30 (7), 1001–1008.
- Samstein, R.M., Perica, K., Balderrama, F., Look, M., Fahmy, T.M., 2008. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles. *Biomaterials* 29 (6), 703–708.
- Scalia, S., Pazzi, P., Guarneri, M., 1989. Determination of bile acids in pharmaceutical dosage forms by HPLC. *Anal. Lett.* 22 (4), 915–927.
- Schuller-Petrovic, S., Wölkart, G., Höfler, G., Neuhold, N., Freisinger, F., Brunner, F., 2008. Tissue-toxic effects of phosphatidylcholine/deoxycholate after subcutaneous injection for fat dissolution in rats and a human volunteer. *Dermatol. Surg.* 34 (4), 529–542.
- Terzic, N., Opsenica, D., Milic, D., Tinant, B., Smith, K.S., Milhous, W.K., Šolaja, B.A., 2007. Deoxycholic acid-derived tetraoxane antimalarials and antiproliferatives. *J. Med. Chem.* 50 (21), 5118–5127.
- Valenta, C., Nowack, E., Bernkop-Schnurch, A., 1999. Deoxycholate-hydrogels: novel drug carrier systems for topical use. *Int. J. Pharm.* 185 (1), 103–111.
- Wang, H.Y., Han, J., Feng, X.G., 2007. Spectroscopic study of orange G- β -cyclodextrin complex and its analytical application. *Spectrochim. Acta A* 66 (3), 578–585.
- Yagima Odo, M.E., Cuce, L.C., Odo, L.M., Natrielli, A., 2007. Action of sodium deoxycholate on subcutaneous human tissue: local and systemic effects. *Dermatol. Surg.* 33 (2), 178–188.
- Yanez, C., Salazar, R., Nunez-Vergara, L.J., Squella, J.A., 2004. Spectrophotometric and electrochemical study of the inclusion complex between β -cyclodextrin and furnidipine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (1), 51–56.
- Yang, C.X., Sun, X.Y., Liu, B., Lian, H.T., 2007. Determination of total phosphorus in water sample by digital imaging colorimetry. *Chin. J. Anal. Chem.* 35 (6), 850–853.
- Yuexian, F., Yu, Y., Shaomin, S., Chuan, D., 2005. Molecular recognition of α -cyclodextrin (CD) to choral amino acids based on methyl orange as a molecular probe. *Spectrochim. Acta A* 61 (5), 953–959.
- Zarzycki, P.K., Lamparczyk, H., 1998. The equilibrium constant of β -cyclodextrin–phenolphthalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1–2), 165–170.
- Zhang, M., Li, J., Zhang, L., Chao, J., 2009. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Spectrochim. Acta A* 71 (5), 1891–1895.



Capítulo 3

Produto na forma de kit reagente para moléculas lipofílicas

PATENTES, DESENHOS INDUSTRIAIS, CONTRATOS, PROGRAMAS DE COMPUTADOR, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS, TOPOGRAFIA DE CIRCUITO INTEGRADO

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Nº 2139

03 de Janeiro de 2012

SEÇÃO I

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Dilma Rousseff

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

Ministro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

Fernando Pimentel

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

PRESIDENTE

Jorge de Paula Costa Ávila

VICE-PRESIDENTE

Ademir Tardelli

CHEFE DE GABINETE

Josefina Sales de Oliveira

DIRETORIA DE COOPERAÇÃO PARA O

DESENVOLVIMENTO

Denise Nogueira Gregory

PROCURADORIA FEDERAL no INPI

Mauro Sodré Maia

DIRETORIA DE PATENTES

Julio César Castelo Branco Reis Moreira

DIRETORIA DE MARCAS

Vinicius Bogéa Câmara

DIRETORIA DE CONTRATOS, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS

E REGISTROS

Breno Bello de Almeida Neves

DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO

Leonardo de Paula Luiz

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Órgão Oficial do INSTITUTO NACIONAL DA

PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Lei nº 5648, de 11.12.70 art. 9º e decreto nº 68.104, de

22.01.71, art. 24

SEDE DO INPI

MV - Mayrink Veiga nº 9, Centro - CEP: 20090-910

PM - Praça Mauá nº 7, Centro - CEP: 20081-240

Tel.: PABX (21) 3037-3000

PROCURADORIA

MV - 22º andar

Tel.: (21) 3037-3731, 3037-3732

Fax: (21) 3037-9841

DIRMA - Diretoria de Marcas

MV - 25º andar

Tel.: (21) 3037-3528

Fax: (21) 3037-3247

DIRPA - Diretoria de Patentes

MV - 20º andar

Tel.: (21) 3037-3592, 3037-3715, 3037-3049

Fax: (21) 3037-3194

DICIG - Diretoria de Contratos, Indicações Geográficas e

Registros

PM - 12º andar

Tel.: (21) 3037-3646, 3037-3608, 3037-3648

Fax: (21) 3037-3175

DIRAD - Diretoria de Administração

MV - 3º andar

Tel.: (21) 3037-3114

DICOD - Diretoria de Cooperação para o Desenvolvimento

MV - 27º andar

Tel.: (21) 3037-3044

DIVISÕES REGIONAIS

BRÁSILIA

Chefe: Antonio Carlos Pereira Coelho

e-mail: direg-df@inpi.gov.br

SAS - Quadra 2, Lote 1/A

Brasília - DF - CEP: 70070-020

Tel.: (61) 3224-1114

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

CEARÁ

Chefe: Alberto Moreira da Rocha

e-mail: diregce@inpi.gov.br

Rua Doutor Mário Martins Coelho, nº 36

Aldeota - Fortaleza - CE - CEP: 60170-280

Tel.: (85) 3261-1372, 3261-1695

Fax: (85) 3268-1495

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

MINAS GERAIS

Chefe: José Renato Carvalho Gomes

e-mail: jrenato@inpi.gov.br

Avenida Amazonas nº 1.909

Santo Agostinho - Belo Horizonte - MG - CEP: 30180-002

Tel.: (31) 3291-5614, 3291-5623

Fax: (31) 3291-5449

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

PARANÁ

Chefe: Renee Fernando Senger

e-mail: diregrpr@inpi.gov.br

Rua Marechal Deodoro, 344, 16º andar

Edifício Atalaia, Centro, Curitiba - PR

CEP: 80010-909

Telefone: (41) 3322-4411

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

RIO GRANDE DO SUL

Chefe: Maria Isabel de Toledo Andrade Cunha

e-mail: diregrs@inpi.gov.br

e-mail: bel@inpi.gov.br

Av. José de Alencar, 521 - Cobertura 902 - Bairro Menino

Jesus. Porto Alegre - RS - CEP: 90880-481

Telefone: (51) 3226-6909, 3226-6422, 3227-5886

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

SÃO PAULO

Chefe: Maria dos Anjos Marques Duso

e-mail: diregrsp@inpi.gov.br

Rua Tabapuã, 41 - 4º andar - Itaim-Bibi

São Paulo - SP - CEP: 04533-010

Telefone: (11) 3071-3434, 3071-3433

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

REPRESENTAÇÕES E POSTOS AVANÇADOS

Acre

Responsável: Amoisio Severiano Freitas

Secretaria de Desenvolvimento Ciência e Tecnologia

BR-364, Km 5, Zona A - Setor 3 Lote "1-A" -

Distrito Industrial - Rio Branco/ Acre - CEP: 69.917-100

Tel./FAX: (68) 3229-6349, 3229-4259, 3229-5556

Horário de Atendimento: 8h às 12h

14h às 17h30

Alagoas

Responsável: Jarbas Agostinho dos Santos

Secretaria do Desenvolvimento Econômico

Av. Da Paz, N.1108 - Centro

Maceió /AL - CEP: 57022-050

Tel.: (82) 3315-1721, 3315-1719, 3315-1720

Horário de Atendimento: 8h às 16h30

Amapá

Responsável: Rosenilda Creuza Silva de Souza

Junta Comercial

Av. FAB, 1610 - Centro

Macapá/ AP - CEP: 68906-030

Tel.: (96) 3225-8650

Fax: (96) 3225-8654

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Amazonas

Responsável: Aliete Velloso da Silva

SEPLAN - Secretaria do Estado de Planejamento e

Desenvolvimento Econômico

Rua Major Gabriel, 1870 - Praça 14 de Janeiro

Manaus /AM - CEP: 69060-060

Tel.: (92) 2126-1235, 2126-1200

Bahia

Responsável: Flavio José Moreno

Rua Pedro R. Bandeira, 143 - 5º andar

Cidade Baixa - Salvador - Bahia

CEP: 40015-080

Tel.: (71) 3326-9597, 3242-5223

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Responsável: Isis Patrícia Motta

Av. Otávio Mangabeira, 6929 - Multi Shop Boca do Rio

CEP: 41715-000

Tel.: (71) 3281-4148

Horário de Atendimento: 8h às 16h30

Espírito Santo

Responsável: Edilamar Gorzaga

Rua Abigail do Amaral Cameiro, 191

Edifício Árabe - 3º andar - salas 312, 314 e 316

Enseada do Suã - Vitória - ES - CEP: 290055-907

Tel.: (27) 3235-7788

Fax: (27) 3315-9823

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Goiás

Responsável: Rosemar Rodrigues de Oliveira Marinari

JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DE GOIÁS

Rua 206 - Esquina 259 - Setor Universitário, Quadra 84, Lt.

5 à 8 Goiânia - GO CEP: 74640-310

Tel.: (62) 3202-2246, 3202-2262, 3261-4833 Ramal: 279

Horário de Atendimento: 8h às 18h

Maranhão

Responsável: Déa Lourdes Furtado de Oliveira

Secretaria de Estado da Indústria e Comércio

Av. Carlos Cunha s/nº - sala 210

Edifício Nagib Haickel - Calhau/ MA - CEP: 65065-180

Telefone: (98) 3235-8546, ramais 28 e 29

Horário de Atendimento: após às 13h

Mato Grosso

Responsável: Kenner Langner da Silva

Junta Comercial do Estado do Mato Grosso - JUSSEMAT

Av. Historiador Rubens de Mendonça, s/nº - CPA

Cuiabá/ MT - CEP: 78055-500

Tel.: (65) 3613-9520, 3613-9528

Horário de Atendimento: 8h às 12h

14h às 17h00

Mato Grosso do Sul

Responsável: Clenira Brandão de Souza

Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agrário, da

Produção, da Indústria, do Comércio e do

Turismo/SEPROTUR

Av. Desembargador José Nunes da Cunha-Parque dos

Poderes, Bloco 12 - CEP: 79031-310 - Campo

Grande/MS

Telefone: (67) 3318-5013

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Pará

Responsável: Paulo Fernando Campos Maciel

SEDECT - Secretaria Estado de Desenvolvimento Ciência

e Tecnologia

Av. Presidente Vargas, 1020 - Campina

Belém /PA - CEP: 66017-000

Telefone: (91) 4009-2534, 4009-2531

Horário de Atendimento: 8h às 13h

14h às 16h

Responsável: Francisco Montandon Guilhermino

SEFA - Secretaria Estadual da Fazenda

Av. Mendonça Furtado, 2797 - Fátima

Santarém /PA - CEP: 68005-020

Telefone: (93) 3063-5634

Horário de Atendimento: 8h30 às 13h

Paraíba

Responsável: Aline Nascimento Duarte

Secretaria de Turismo e Desenvolvimento Econômico

Rua Feliciano Cisne nº 50 - Jaguaribe

João Pessoa/PB - CEP: 58015-570

Telefone: (83) 3208-3922, 3208-3923, 3242-2545/2729

Horário de Atendimento: 12h às 16h30

Pernambuco

Responsável: Eduardo Andrade Bemfica

e-mail: bemfica@inpi.gov.br

Universitária Federal de Pernambuco - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Campus Universitário

Bairro - Engenho do Meio

Recife/PE - CEP: 50670-920

Telefone: (81) 3453-8145, 3271-1223

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Piauí

Responsável: Eliane Fatima Assunção Lima Souza

Secretaria de Desenvolvimento Econômico e Tecnológico

Rua Rui Barbosa, nº 805 - Centro - Central-Fácil/SEBRAE

Telefone: (86) 3216-3000 ramal 1403

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

(71) DANILO CHAGAS TASCHIN (BR/SP),
FERNANDO ALVES DE ATAIDE (BR/SP)
Número de Protocolo 18110023508 em 22/06/2011
10:44(SP).

(21) **PI 1102704-5 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) FUNDAÇÃO CPQD - CENTRO DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO EM
TELECOMUNICAÇÕES (BR/SP)
(74) ANA LÚCIA FORNI POPPI
Número de Protocolo 18110023987 em 27/06/2011
01:40(SP).

(21) **PI 1102705-3 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) AQUILEZ ALFREDO ESPINOZA DIAZ (BR/SP)
(74) ANDRA ASSESSORIA EM PROPRIEDADE
INTELCTUAL LTDA
Número de Protocolo 18110023981 em 27/06/2011
01:36(SP).

(21) **PI 1102706-1 A2** (22) 14/06/2011 **2.10**
(71) VULCABRAS/AZALEIA - RS, CALÇADOS E
ARTIGOS ESPORTIVOS S.A. (BR/RS)
(74) DAVID DO NASCIMENTO ADVOGADOS
ASSOCIADOS
Número de Protocolo 18110022357 em 14/06/2011
03:53(SP).

(21) **PI 1102707-0 A2** (22) 22/06/2011 **2.10**
(71) WHIRPOOL S.A. (BR/SP)
(74) CARINA S RODRIGUES
Número de Protocolo 18110023660 em 22/06/2011
03:58(SP).

(21) **PI 1102708-8 A2** (22) 15/06/2011 **2.10**
(71) ANA ALICE SANTOS DE MEDEIROS EPP.
(BR/SP)
Número de Protocolo 18110022446 em 15/06/2011
10:29(SP).

(21) **PI 1102709-6 A2** (22) 30/06/2011 **2.10**
(71) HYDRIL USA MANUFACTURING LLC (US)
(74) ARTUR FRANCISCO SCHAAL
Número de Protocolo 18110024616 em 30/06/2011
03:42(SP).

(21) **PI 1102710-0 A2** (22) 30/06/2011 **2.10**
(71) DEDINI S/A INDÚSTRIAS DE BASE (BR/SP)
(74) ANTONIO MAURICIO PEDRAS ARNAUD
Número de Protocolo 18110024652 em 30/06/2011
04:09(SP).

(21) **PI 1102711-8 A2** (22) 29/06/2011 **2.10**
(71) Lauro Eduardo Muller (BR/SP)
(74) MONICA LORON GUIMARÃES
Número de Protocolo 18110024313 em 29/06/2011
10:48(SP).

(21) **PI 1102712-6 A2** (22) 14/06/2011 **2.10**
(71) RODOLFO CÂNDIA ALBA JUNIOR (BR/SP)
(74) MARIA DO ROSÁRIO DE LIMA
Número de Protocolo 18110022283 em 14/06/2011
12:29(SP).

(21) **PI 1102713-4 A2** (22) 22/06/2011 **2.10**
(71) Cícero Francisco da Silva (BR/DF), José
Maurício Pires Gomes (BR/DF)
Número de Protocolo 12110000495 em 22/06/2011
02:37(DF).

(21) **PI 1102714-2 A2** (22) 28/06/2011 **2.10**
(71) Celsimar de Godoy (BR/SP)
(74) Interação Marcas e Patentes S/C Ltda.
Número de Protocolo 18110024150 em 28/06/2011
11:09(SP).

(21) **PI 1102715-0 A2** (22) 02/06/2011 **2.10**
(71) José Jue Ferreira de Almeida (BR/CE)
Número de Protocolo 13119000017 em 02/06/2011
10:24(CE).

(21) **PI 1102716-9 A2** (22) 01/06/2011 **2.10**
(71) Alberto Corrêa Mendonça (BR/GO)
Número de Protocolo 26110000170 em 01/06/2011
11:34(GO).

(21) **PI 1102717-7 A2** (22) 01/06/2011 **2.10**
(71) PPM Enterprise Ltda (BR/GO)
(74) Wagner José Da Silva
Número de Protocolo 26110000171 em 01/06/2011
02:24(GO).

(21) **PI 1102718-5 A2** (22) 06/06/2011 **2.10**
(71) José Luiz de Lima Filho (BR/PE)

Número de Protocolo 19110000126 em 06/06/2011
10:33(PE).

(21) **PI 1102719-3 A2** (22) 03/06/2011 **2.10**
(71) José Luiz de Lima Filho (BR/PE)
Número de Protocolo 19110000125 em 03/06/2011
04:16(PE).

(21) **PI 1102720-7 A2** (22) 30/06/2011 **2.10**
(71) ANSELMO ALMEIDA MONTEIRO JÚNIOR
(BR/SP)
Número de Protocolo 18110024510 em 30/06/2011
11:31(SP).

(21) **PI 1102721-5 A2** (22) 10/06/2011 **2.10**
(71) BOTICA COMERCIAL FARMACÊUTICA LTDA.
(BR/PR)
(74) ANDRÉ LUIS FLESCHE BRETANHA JORGE
Número de Protocolo 18110021857 em 10/06/2011
01:49(SP).

(21) **PI 1102722-3 A2** (22) 14/06/2011 **2.10**
(71) VETCO GRAY, INC. (US)
(74) ARTUR FRANCISCO SCHAAL
Número de Protocolo 18110022343 em 14/06/2011
03:48(SP).

(21) **PI 1102723-1 A2** (22) 28/06/2011 **2.10**
(71) TERMO NORTE ENERGIA LTDA. (BR/RO)
(74) EXCEL MARCAS E PATENTES LTDA
Número de Protocolo 18110024162 em 28/06/2011
11:52(SP).

(21) **PI 1102724-0 A2** (22) 08/06/2011 **2.10**
(71) TAKRAF GMBH (DE)
(74) ANTONIO MAURICIO PEDRAS ARNAUD
Número de Protocolo 18110021594 em 08/06/2011
04:02(SP).

(21) **PI 1102725-8 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) VANDERLEI CARRA; EDVALDO GUIO.
(BR/SP)
(74) SUL AMÉRICA MARCAS E PATENTES LTDA.
Número de Protocolo 18110024084 em 27/06/2011
04:16(SP).

(21) **PI 1102726-6 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) FORD GLOBAL TECHNOLOGIES, LLC (US)
(74) ALEXANDRE FUKUDA YAMASHITA
Número de Protocolo 18110024049 em 27/06/2011
03:57(SP).

(21) **PI 1102727-4 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) IFOX INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. ME
(BR/SP)
(74) EDUARDO CARNEIRO VASQUES
Número de Protocolo 18110024034 em 27/06/2011
03:31(SP).

(21) **PI 1102728-2 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**
(71) FUNDAÇÃO CPQD - CENTRO DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO EM
TELECOMUNICAÇÕES (BR/SP)
(74) ANA LÚCIA FORNI POPPI
Número de Protocolo 18110023984 em 27/06/2011
01:38(SP).

(21) **PI 1102729-0 A2** (22) 21/06/2011 **2.10**
(71) ROBERTO CARLO ENRIQUE TASCHERI
D'AUSILIO (BR/RJ)
(74) MARI ALBA PERITO
Número de Protocolo 18110023375 em 21/06/2011
02:24(SP).

(21) **PI 1102730-4 A2** (22) 21/06/2011 **2.10**
(71) CAIO ALEGRE DE ARAÚJO (BR/SP)
(74) ICAMP MARCAS E PATENTES LTDA
Número de Protocolo 18110023361 em 21/06/2011
12:59(SP).

(21) **PI 1102731-2 A2** (22) 21/06/2011 **2.10**
(71) MM COMPONENTES PARA IMPLEMENTOS
RODOVIÁRIOS LTDA (BR/SP)
(74) DANILO FERREIRA MACHADO
Número de Protocolo 18110023409 em 21/06/2011
03:40(SP).

(21) **PI 1102732-0 A2** (22) 21/06/2011 **2.10**
(71) MELLO INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE
EQUIPAMENTOS LTDA - ME (BR/SP)
(74) MARTINEZ & ASSOCIADOS S/S LTDA
Número de Protocolo 18110023395 em 21/06/2011
03:17(SP).

(21) **PI 1102733-9 A2** (22) 27/06/2011 **2.10**

(71) UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS -
UNICAMP (BR/SP)
(74) FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO
Número de Protocolo 18110024009 em 27/06/2011
02:40(SP).

(21) **PI 1102734-7 A2** (22) 14/06/2011 **2.10**
(71) RODOLFO CÂNDIA ALBA JUNIOR (BR/SP)
(74) MARIA DO ROSÁRIO DE LIMA
Número de Protocolo 18110022259 em 14/06/2011
11:27(SP).

(21) **PI 1102746-0 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Luiz Felipe Concordia Alves (BR/RS)
Número de Protocolo 16110003167 em 17/06/2011
02:39(RS).

(21) **PI 1102747-9 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Sulmaq Industrial e Comercial S/A (BR/RS)
(74) Lealvi Marcas e Patentes Ltda
Número de Protocolo 16110003170 em 17/06/2011
03:07(RS).

(21) **PI 1102748-7 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Sulmaq Industrial e Comercial S/A (BR/RS)
(74) Lealvi Marcas e Patentes Ltda
Número de Protocolo 16110003172 em 17/06/2011
03:08(RS).

(21) **PI 1102749-5 A2** (22) 06/07/2011 **2.10**
(71) Claudécir Machado Turossi (BR/RS)
Número de Protocolo 16110003520 em 06/07/2011
04:13(RS).

(21) **PI 1102750-9 A2** (22) 28/06/2011 **2.10**
(71) Marcos Antonio Pereira dos Santos (BR/PI)
Número de Protocolo 32110000094 em 28/06/2011
10:23(PI).

(21) **PI 1102751-7 A2** (22) 13/06/2011 **2.10**
(71) Gilberto Espanga Junior (BR/PR)
Número de Protocolo 15110001290 em 13/06/2011
01:55(PR).

(21) **PI 1102752-5 A2** (22) 30/06/2011 **2.10**
(71) Leandro Lobo Motteran (BR/MG)
(74) Wellington Dias
Número de Protocolo 14110002069 em 30/06/2011
02:20(MG).

(21) **PI 1102753-3 A2** (22) 13/06/2011 **2.10**
(71) Elo Sistemas Eletrônicos S/A (BR/RS)
(74) Sko Oyarzabal Marcas e Patentes S/S Ltda
Número de Protocolo 16110003059 em 13/06/2011
03:01(RS).

(21) **PI 1102754-1 A2** (22) 21/06/2011 **2.10**
(71) HUF HULSBECK & FURST GMBH & CO. KG.
(DE)
(74) Guerra Propriedade Industrial
Número de Protocolo 16110003233 em 21/06/2011
04:05(RS).

(21) **PI 1102755-0 A2** (22) 22/06/2011 **2.10**
(71) Eli Samuel Chastalo Filho (BR/PR)
(74) Eduardo Pereira da Silva
Número de Protocolo 15110001373 em 22/06/2011
03:37(PR).

(21) **PI 1102756-8 A2** (22) 20/06/2011 **2.10**
(71) Universidade Federal de Santa Catarina
(BR/SC)
Número de Protocolo 17110000803 em 20/06/2011
03:42(SC).

(21) **PI 1102757-6 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Marcos Aurélio Manoel (BR/SC)
Número de Protocolo 17110000798 em 17/06/2011
03:24(SC).

(21) **PI 1102758-4 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Sulmaq Industrial e Comercial S/A (BR/RS)
(74) Lealvi Marcas e Patentes Ltda
Número de Protocolo 16110003173 em 17/06/2011
03:09(RS).

(21) **PI 1102759-2 A2** (22) 15/06/2011 **2.10**
(71) Universidade Federal da Paraíba (BR/PB)
Número de Protocolo 31110000113 em 15/06/2011
09:13(PB).

(21) **PI 1102760-6 A2** (22) 17/06/2011 **2.10**
(71) Carlos Eudanio Mota Lourenço (BR/CE)
(74) Milton Gomes Monteiro

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

1.2

1.3

1.4

1.5

1.8

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PRODUTO NA FORMA DE KIT REAGENTE PARA MOLÉCULAS LIPOFÍLICAS

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº

Data de Depósito:

5. Prioridade:

☐ interna

☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

6.2

6.4

6.5

6.8

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**79**

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)☐ em anexo**9. Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	6 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	1 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	2 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Lista de Inventores				1 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): fls.**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Inventores (72)

6.1 NOME: Pabyton Gonçalves Cadena

6.2

6.4

6.5

6.7

6.1 NOME: Maria do Carmo de Barros Pimentel

6.2

6.3

6.5

6.7

6.1 NOME: Valdinete Lins da Silva

6.2

6.4

6.5

6.5

6.1 NOME: Alberto da Nova Araújo

6.2

6.3

6.4

6.5

6.7

6.1 NOME: Maria da Conceição Branco da Silva de Mendonça Montenegro

6.2

6.4

6.5

6.7

PRODUTO NA FORMA DE KIT REAGENTE PARA MOLÉCULAS LIPOFÍLICAS

RELATÓRIO DESCRITIVO

5 Campo da Invenção

A presente invenção contempla um kit reagente para moléculas lipofílicas, contendo como componente ativo o complexo de inclusão ciclodextrina - indicador estabilizado em solução tampão.

10 Antecedentes da Invenção

Os métodos usados para dosar moléculas lipofílicas como os ácidos biliares em preparações farmacêuticas e cosméticas comerciais são onerosos, sofisticados e envolvem etapas complexas de extração dos mesmos, dificultando o trabalho de órgãos de fiscalização, por exemplo, FDA e ANVISA que precisam esperar os resultados das análises para autuar o estabelecimento ou a indústria.

O kit reagente desta invenção torna mais simples, rápida e econômica a dosagem de ácidos biliares, podendo ser usado “*in loco*”, o que facilita o trabalho dos órgãos de fiscalização.

Algumas invenções buscaram o uso de complexos de inclusão com ciclodextrinas para aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos em água e melhorar a absorção dos mesmos pelos sistemas biológicos e conseqüentemente a sua atividade farmacológica ou para a liberação controlada do princípio ativo da formulação farmacêutica. A patente PCT WO 2004/017897 A2 (2004) descreve uma formulação aquosa de aripiprazol usado como antipsicótico na terapêutica de esquizofrenia, que foi obtida na forma de complexo de inclusão com β -ciclodextrina substituída para reduzir a irritação local causada pela injeção intramuscular deste fármaco. Uma aplicação amplamente utilizada de complexos de inclusão com ciclodextrinas é em formulações farmacêuticas para facilitar a solubilidade em água de

princípios ativos lipofílicos reduzindo seus efeitos indesejáveis, o que não acontece em relação ao uso de complexos de inclusão para dosagem de moléculas lipofílicas contidas nas formulações farmacêuticas e cosméticas. Quando utilizados, os componentes para formação do complexo são colocados simultaneamente com a molécula lipofílica a ser analisada como descrito por Afkhami et al. (2006) e Glazyrin et al. (2004).

Outras patentes, como PCT 00610134.9 de 2000 descreve um complexo de inclusão entre β -ciclodextrina ou γ -ciclodextrina e drospirenona, usado na menopausa e como contraceptivo, para aumentar a solubilidade em água pura ou com álcool para estabilizar a mistura farmacêutica, mas não usa tampão para estabilizar o complexo reduzindo os efeitos de umidade, temperatura e quantidade de água, condições experimentais relatadas pelo autor.

Não muito diferente das citadas acima, a patente PCT WO 98/42382 (1998) também descreve o uso preferencial de derivados de β -ciclodextrina para solubilização em água de fluoxetina e nor-fluoxetina usados como antidepressivos. O complexo foi preparado utilizando água ou uma mistura de água e um solvente orgânico hidrofílico. Que nestas condições, o complexo de inclusão formado pode sofrer efeitos de umidade, temperatura, luz, dentre outros, alterando a quantidade de fármaco na forma de complexo de inclusão desde que o mesmo está em equilíbrio dinâmico.

Entretanto, não foram encontrados registros de patentes sobre a aplicação de complexos de inclusão com ciclodextrinas como reagente ativo de kits para dosagem de moléculas lipofílicas.

Alguns trabalhos científicos citam a formação do complexo de inclusão beta-ciclodextrina-fenolftaleína para determinar a concentração de fluoxetina, mas esse complexo é formado instantaneamente por competitividade com o ácido biliar no próprio sistema de reação e a mistura é colocada imediatamente no espectrofotômetro para leitura da absorbância (Afkhami et al., 2006; Glazyrin et al., 2004). O pH das soluções de complexos de inclusão citados são ajustados com ácidos,

bases e alguns poucos usam solução tampão para ajustar o pH não para estabilizar o complexo.

Até o presente momento não foi registrada nem pensada a possibilidade de ter uma solução estável de complexos de inclusão β -ciclodextrina – indicador, que na presente invenção foi preparada a solução β -ciclodextrina- fenolftaleína, que possa ser guardada para usos posteriores. Os complexos de inclusão sempre foram produzidos “*in situ*” de forma instantânea e competitiva com a molécula a ser analisada e o indicador, como método indireto de análise de moléculas hidrofóbicas.

A patente JP 63256679 (A2), por exemplo, descreve a preparação de um sensor fluorescente no qual ocorre na superfície uma reação de ciclodextrinas ou seus derivados com grupos reativos de uma matriz polimérica, formando uma camada hidrofílica sobre a superfície hidrofóbica do filme.

Alguns trabalhos científicos reportam a aplicação de ciclodextrinas como eletrodos modificados de pasta de carbono para detecção de fenol (Favero et al., 2004; Tingry et al., 2006). Tem sido publicado também o uso de complexo de inclusão β -ciclodextrina- tetrametilbenzidina e ferroceno como parte ativa de um biossensor voltamétrico de polifenol oxidase (Tu e Chen, 2001).

Em função da demanda existente, a presente invenção resolve as atuais limitações do estado da técnica permitindo a formação de um complexo de inclusão ciclodextrina-indicador estabilizado em solução tampão que pode ser armazenado e usado para detectar e medir a concentração de moléculas lipofílicas presentes em preparações comerciais ou complexos de inclusão entre ciclodextrinas e medicamentos lipofílicos estabilizados em solução tampão em vez de água e co-solventes, prolongando o prazo de validade do medicamento.

Descrição da Invenção

Kit reagente contendo como componente ativo o complexo de inclusão de ciclodextrina-indicador em solução tampão para manter o pH específico para o

indicador utilizado e estabilizar o complexo de inclusão. A solução do kit reagente foi homogeneizada por agitação preferencialmente vigorosa após a adição de cada componente da mistura. A solução do kit reagente resultante, conservada em vidro escuro à temperatura ambiente, mantém 100% de suas características químicas e físico-químicas durante 60 dias e apresentou um tempo de meia-vida de 9-10 meses. A faixa de detecção dos ácidos biliares, usando a solução do kit reagente é bem definida. Não há interferências dos excipientes contidos nas formulações farmacêuticas e cosméticas testadas. Além de ser facilmente preparado, o kit reagente, ainda apresenta a grande vantagem e pode ser usado em larga ou micro escala.

10 Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras 1, 2 e 3.

1. Esquema do complexo de inclusão formado entre a ciclodextrina e indicador, no qual ciclodextrina (CD) a qual é misturada com o indicador (I) na presença de solução tampão (T), como mostra a figura 1;
- 15 2. Esquema da molécula lipofílica deslocando o indicador da cavidade da ciclodextrina no qual o complexo de inclusão ciclodextrina-indicador (CDI) em solução tampão (T) é misturado à amostra (A) que é uma molécula lipofílica a qual forma o complexo de inclusão (CDA);
- 20 3. Esquema do sistema de dosagem de moléculas hidrofóbicas com a solução do kit reagente o qual é composto por um dispositivo que contém módulo de análise (DA); módulo de leitura de resultados (LR) e módulo de transmissão (MT), o qual está conectado a um servidor a distancia com módulo de transmissão;

25 Uma modalidade preferida, conforme descrito na figura 1, descreve a preparação do complexo de inclusão entre a ciclodextrina e a molécula lipofílica do indicador em solução tampão no pH específico para o indicador utilizado, sob agitação preferencialmente vigorosa à temperatura ambiente.

Na presente invenção, preferimos formular o complexo de inclusão entre a β -ciclodextrina e a fenoltaleína como indicador em tampão bicarbonato, que não só

manteve o pH alcalino ideal para o indicador usado, como também funcionou como estabilizador do complexo de inclusão, requerido para a construção do kit reagente.

A fenolftaleína em solução tampão no pH alcalino apresenta cor de róseo a vermelho, mas ao formar o complexo de inclusão com a ciclodextrina (β -ciclodextrina-fenolftaleína), a solução fica incolor devido à entrada da fenolftaleína na cavidade lipofílica da molécula de ciclodextrina.

A segunda modalidade é representada na figura 2 que mostra a formação competitiva do complexo de inclusão entre a ciclodextrina e a molécula lipofílica contida na amostra, ocorrendo a substituição do indicador pela molécula lipofílica da amostra na cavidade da ciclodextrina, provocando a mudança de coloração devido ao pH da solução tampão na parte externa da molécula de ciclodextrina.

Para esta invenção, as moléculas lipofílicas utilizadas como amostras foram os ácidos biliares (ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico), os quais foram colocados em contato com a solução do kit reagente (complexo de inclusão β -ciclodextrina-fenolftaleína), em tampão carbonato de sódio a pH 10,5. A substituição da fenolftaleína da cavidade da molécula de β -ciclodextrina pelos ácidos biliares, formando os complexos de inclusão β -ciclodextrina-ácidos desoxicólico e/ou β -ciclodextrina-ácido ursodesoxicólico, fez com que a solução tamponada do kit reagente passasse de incolor para róseo, cuja intensidade foi proporcional a concentração desses ácidos biliares adicionadas a solução do kit reagente. Os testes comprovaram que os ácidos biliares testados podem ser mensurados numa faixa de linearidade bem definida de $6,1 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-3}$ mol/L.

Na referida invenção, também foi testado o alcalóide cafeína como molécula lipofílica e como reagente ativo o complexo de inclusão β -ciclodextrina-vermelho de metila em tampão carbonato de sódio a pH 10,5. A substituição do indicador vermelho de metila da cavidade da molécula de β -ciclodextrina pela cafeína formou por competitividade complexo de inclusão β -ciclodextrina-cafeína, causando mudança de coloração do meio reagente em tons de vermelho, cuja intensidade foi proporcional a concentração desse alcaloide adicionado a solução do kit reagente. Os testes

comprovaram que o alcaloide testado pode ser mensurado numa faixa de linearidade definida.

5 Numa modalidade preferida, conforme descrito na figura 3, um dispositivo de leitura, transmissão e recepção de sinais digitais e análise de resultados é utilizado para determinar a concentração de moléculas lipofílicas nas amostras testadas comparando a intensidade de coloração produzida pela amostra à coloração produzida por um padrão de concentração conhecida e um branco, cuja amostra foi substituída por água ou tampão. O leitor é composto de um transmissor (3G, ou outros) que transmite e recebe resultados de análises de um servidor à distância, permitindo que a
10 análise seja realizada “*in loco*”, facilitando à fiscalização ou a assistência das entidades competentes nas situações a longa distância.

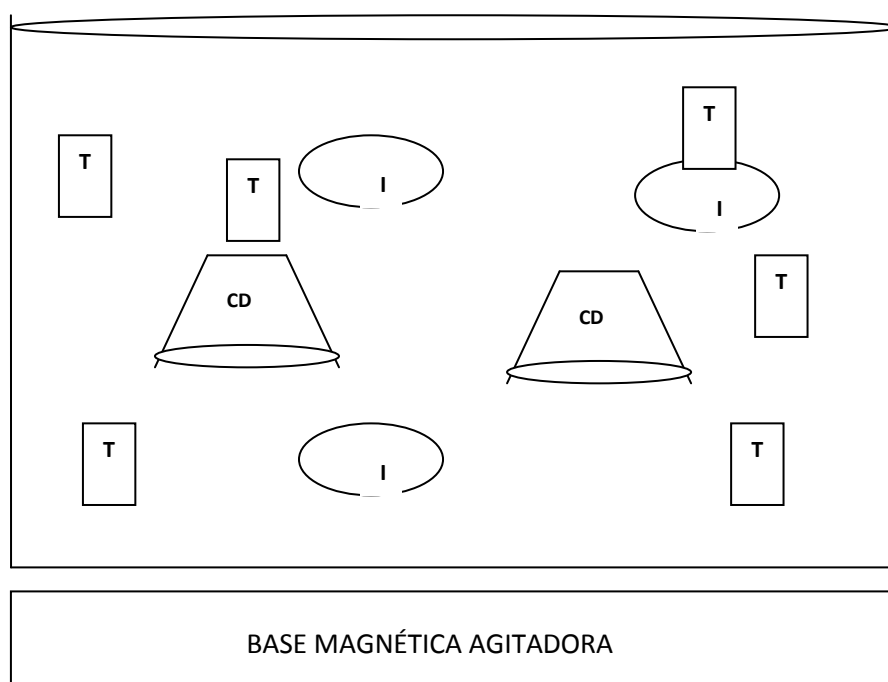
REIVINDICAÇÕES

1. Método para estabilizar o complexo de inclusão ciclodextrina-indicador utilizando solução tampão para manter o pH específico de cada indicador e estabilizar o complexo de inclusão.
5
2. Método como descrito na reivindicação 1, onde a ciclodextrina é β -ciclodextrina.
3. Método como descrito na reivindicação 1, onde o indicador é fenolftaleína.
- 10 4. Método como descrito na reivindicação 1, onde o complexo de inclusão β -ciclodextrina-fenolftaleína (β -CD-PHP) é preparado em solução tampão carbonato para manter o pH alcalino.
5. Produto na forma de kit reagente para dosagem de moléculas lipofílicas caracterizado por ser composto de uma solução de complexo de inclusão
15 ciclodextrina-indicador estabilizada como descrito na reivindicação 1.
6. Produto conforme a reivindicação 5, no qual as moléculas lipofílicas são ácidos biliares como ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico.
7. Produto conforme a reivindicação 5, no qual as moléculas lipofílicas são alcalóides como cafeína, nicotina, dentre outros.
- 20 8. Método de preparação do gel reagente para moléculas lipofílicas caracterizado por colocar a solução de complexo de inclusão ciclodextrina-indicador estabilizada pelo método descrito na reivindicação 1 dentro de uma matriz polimérica.
9. Método como descrito na reivindicação 8, onde a solução reagente
25 estabilizada é composta pelo complexo de inclusão β -ciclodextrina-fenolftaleína (β -CD-PHP) preparada em solução tampão carbonato para manter o pH alcalino.

10. Método como descrito na reivindicação 8, onde a matriz polimérica é alginato.
11. Método de preparação das fitas reagentes para moléculas lipofílicas caracterizado por colocar gel de complexo de inclusão ciclodextrina-indicador estabilizado pelo método descrito na reivindicação 8 sobre uma superfície sólida.
12. Método como descrito na reivindicação 11, onde o gel é composto pelo complexo de inclusão β -ciclodextrina-fenolftaleína (β -CD-PHP) em tampão carbonato e alginato.
13. Método como descrito na reivindicação 11, onde a superfície sólida é uma fita de papel tipo cartolina.
14. Método como descrito na reivindicação 11, onde a superfície sólida é uma fita de papel com cobertura composta por polímeros hidrofóbicos com poços de amostragem.
15. Processo de utilização de fitas reagentes descritas na reivindicação 11 como sensor ótico para dosagem de moléculas lipofílicas.
16. Processo como descrito na reivindicação 15, onde as moléculas lipofílicas são ácidos biliares, ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico.
17. Processo como descrito na reivindicação 15, onde as moléculas lipofílicas são cafeína, nicotina, dentre outras.
18. Processo como descrito na reivindicação 15, onde as fitas reagentes contem poços para controle, padrão e amostras.
19. Dispositivo de leitura, transmissão e análise de dosagem de moléculas lipofílicas caracterizado por ser um módulo de leitura (scan, por exemplo), um módulo de transmissão e recepção de sinais digitais e um módulo de análise que pode ser colocado à distância dos dois primeiros.

DISPOSITIVO (RESUMO)

A presente invenção refere-se a um produto na forma de kit reagente para
5 dosagem de moléculas lipofílicas que contém complexo de inclusão entre ciclodextrina
e indicador como componente ativo, estabilizado em solução tampão. Kit reagente
que pode ser usado em laboratórios de controle de qualidade de formulações
comerciais que contém moléculas lipofílicas, análise *"in loco"* de produtos comerciais
ou análises a longa distância para controle de qualidade ou fiscalização de produtos
10 comerciais, ou mesmo para monitoramento de pacientes, uma vez que a presente
invenção pode ser usada em diferentes modalidades, tais como sensor óptico que
pode ser analisado por dispositivos de análise, leitura e transmissão, o que facilita o
trabalho de órgãos de fiscalização ou laboratórios de controle de qualidade de
produtos comerciais.

Figura 1

5

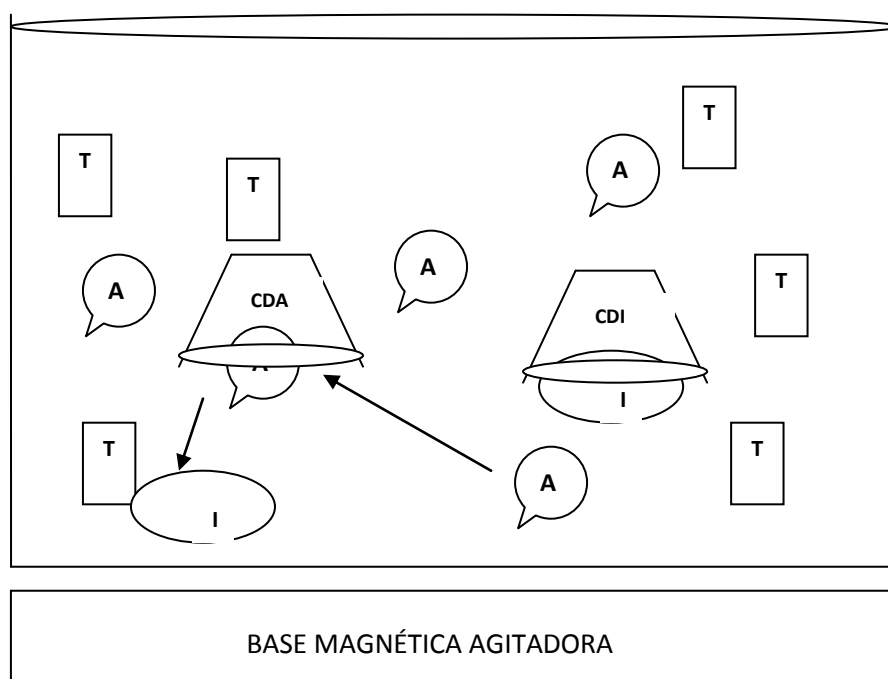
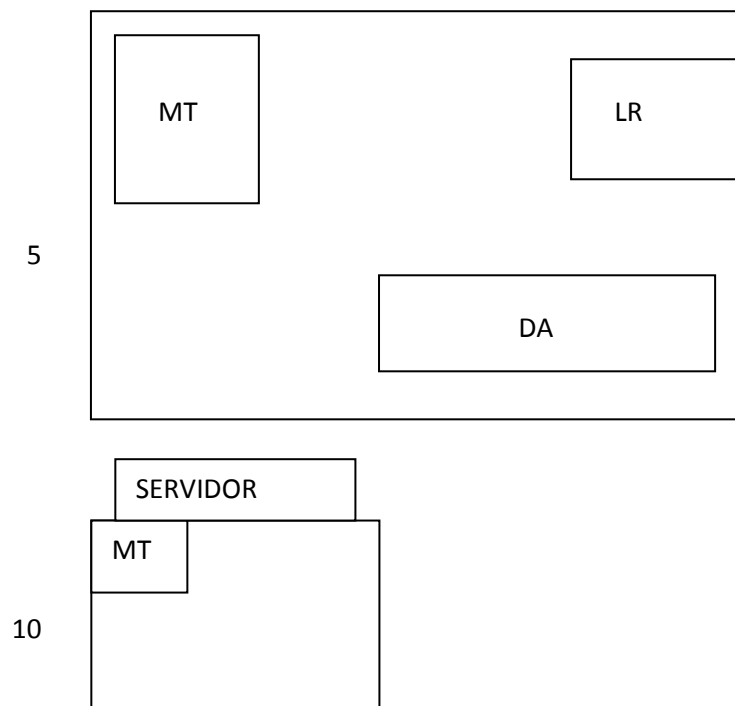
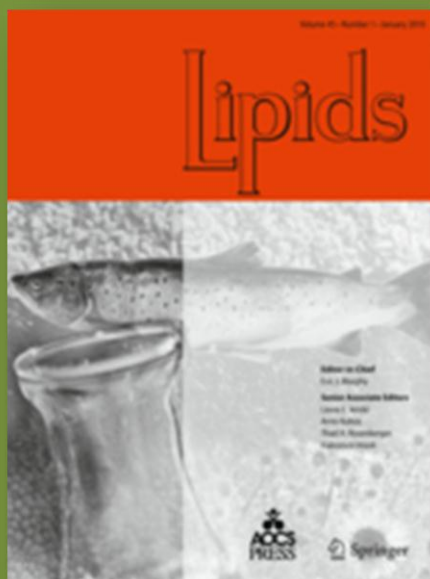
Figura 2

Figura 3



Capítulo 4

Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes



Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes

Journal:	<i>Lipids</i>
Manuscript ID:	LIPIDS-12-0065
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	24-Feb-2012
Complete List of Authors:	Cadena, Pabyton; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Pereira, Marcela; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Cordeiro, Rafaela; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Cavalcanti, Isabella; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Neto (in memoriam), Benício; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química Fundamental Pimentel, Maria; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Lima Filho, José; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA Silva, Valdinete; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química Santos-Magalhães, Nereide; Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Keywords:	Analytical biochemistry < Analytical Techniques, Biotechnology < Miscellaneous, Cholesterol < Specific Lipids, Phosphatidylcholine < Specific Lipids, Phospholipids < Specific Lipids, Bile acids < Specific Lipids

Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes

Pabyton G. Cadena^{a,b}, Marcela A. Pereira^a, Rafaela B. S. Cordeiro^a, Isabella M. F. Cavalcanti^a, Benício B. Neto (*in memoriam*), Maria do Carmo C. B. Pimentel^a, José Luiz Lima-Filho^a, Valdinete L. Silva^b, Nereide S. Santos-Magalhães^{a*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil;

^bLaboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade (LEAQ), UFPE, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brazil;

*Corresponding author

Pr. Nereide Stela Santos-Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia 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

Abstract

Based on the fact that quercetin (QUE) and resveratrol (RES) induce a synergic inhibition of the adipogenesis and increase apoptosis in adipocytes, and that sodium deoxycholate (SDC) has necrotic effects, the nanoencapsulation of QUE and RES into SDC-elastic liposomes is proposed as a new approach for dissolution of the subcutaneous fat. Constituent concentrations and the incorporation of drug cyclodextrin inclusion complexes on the stability of QUE/RES-loaded liposomes were studied. The best liposomal formulation produced, reduced the use of phosphatidylcholine and cholesterol in 17.7% and 68.4%, respectively. Liposomes had a mean diameter of 149 nm with a polydispersion index of 0.3. The zeta potential of liposomes was slightly negative (-13.3) due to the presence of SDC in the phospholipid bilayer. Encapsulation efficiency of QUE and RES into liposomes was almost 97%. In conclusion, QUE/ RES-loaded elastic liposomes are suitable for subcutaneous injection, thereby providing a new strategy for reduction of subcutaneous fat.

Keywords: Quercetin, Resveratrol, Sodium deoxycholate, Elastic liposomes,

Experimental design, nanotechnology

1. Introduction

The natural compounds quercetin (QUE) and resveratrol (RES) are both flavonoids that have effects on the biochemical and metabolic functions of adipocytes, such as the inhibition of adipogenesis and the induction of apoptosis. QUE and RES in association caused a reduction in cell viability of more than 70% in primary human adipocytes and 3T3-L1 murine adipocytes [1, 2]. The treatment of 3T3-L1 adipocytes with QUE attenuated adipogenesis and decreased the expression of adipogenesis-related factors and enzymes by up-regulating the levels of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase and its substrate. Finally, QUE induced apoptosis by modulation of the ERK and JNK pathways, down-regulating the expression of anti-apoptotic bcl-2 and activation of caspase-3 [3]. RES caused the inhibition of cell proliferation during early preadipocyte development; the inhibition of differentiation and lipid accumulation during later preadipocyte development; and the induction of lipolysis and apoptosis of mature adipocytes. RES also mediated the down-regulation of adipocyte specific transcription factors and enzymes via genes that modulate mitochondrial function [4]. Moreover, RES activated the expression of Sirt1, reducing lipid accumulation by the repression of PPAR γ in differentiated adipocytes [2].

Despite the action of QUE and RES in reducing adipocyte viability, there are few *in vivo* studies in this subject and the use of both these flavonoids for improving dissolution of subcutaneous fat is not described in the literature. In addition, QUE and RES have low aqueous solubility and low bioavailability [5]. In this way, liposomes offered advantages in the attempt to overcome all these limitations. Liposomes are self-assembled colloidal vesicles consisting of one or more concentric phospholipid bilayers organized around an aqueous inner compartment, and are used as nanocarriers for drugs, biomolecules and diagnostic agents [6, 7]. Cevc and Blume [8] introduced the first

elastic liposomes with high deformability (called Transfersomes[®]), which are formed by the association of phosphatidylcholine (PtdCho) with sodium cholate or sodium deoxycholate (SDC), thus improving drug delivery. The main difference between deformable and conventional liposomes is the high and stress-dependent adaptability of such deformable vesicles, which enables them to squeeze between the cells, despite their large average vesicle size [9]. As reported, SDC is one of the components of the subcutaneous “phosphatidylcholine injection” used to dissolve localised subcutaneous fat. SDC can also be used for treating lipomas and lipodystrophy [10, 11]. In this formulation, phosphatidylcholine acts as a buffer to delay and diminish the unopposed dramatic effect of SDC. The latter cause massive fat necrosis by its detergent effect and changes in the skin overlying the treatment region [10, 12].

In this framework, the present study proposes an innovative elastic liposomal formulation containing quercetin and resveratrol for the dissolution of subcutaneous fat. Two experimental designs were developed to identify the constraints and to study experimental conditions such as the concentration of phospholipids, the entrapment of QUE and RES in the phospholipid bilayer or their encapsulation in the aqueous phase of liposomes as cyclodextrin inclusion complexes. The release kinetics of QUE and RES were also investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (PtdCho) (Epikuron 200) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany), 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β -CD) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Cholesterol (C), stearylamine (SA), phenolphthalein (PHP), poly-L-lysine, osmium tetroxide, sodium deoxycholate (SDC),

quercetin (QUE) and resveratrol (RES) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile, chloroform, methanol and monobasic potassium phosphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade chemicals without any further purification and deionised water were used in all the experiments.

2.2. Methods

2.2.1. Apparent solubility and dissolution rate of QUE and RES

Excess amounts of QUE and RES were added to water, 50 mM potassium phosphate buffer solution (PP) at pH 7.4 or 50 mM phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 following which they were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ and shaken until reaching equilibrium. The content of QUE and RES was assessed by UV spectrophotometry (Pharmacia Ultraspec 3000 Pro spectrophotometer) at 370 and 307 nm, respectively. The solubility was determined using the QUE (0.31 – 20 $\mu\text{g/ml}$) and RES (0.02 – 20 $\mu\text{g/ml}$) standard curves, respectively. The dissolution constant was calculated from the cumulative amount of dissolved drug (μg) versus time (h) plots according to USP [13]. Data were fitted by linear regression analysis and the slope of the linear equation corresponds to the dissolution rate.

2.2.2. Inclusion complexes of SDC, QUE and RES with HP β -CD

Drug inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (SDC:HP β -CD; RES:HP β -CD and QUE:HP β -CD) were prepared at a 1:1 molar ratio using the co-precipitation technique [14, 15].

2.2.3. HPLC validation method for determining QUE and RES in elastic liposomes

Samples of elastic QUE and RES-loaded liposomes were diluted in methanol and injected into the HPLC system. Two different methods for determining QUE and RES were validated. The chromatographic system (FPLC ÄKTA purifier) operated by the software UNICORN 4.1 (Amersham Biosciences) consisted of a quaternary pump (model P-900), an auto sampler and a UV-900 detector (Amersham Biosciences). The chromatographic run was performed using a reverse phase C₁₈ column (125 Å, 3.9 x 300 mm i.d. particle 5 µm, Bondapak[®]) with 50 µl of the sample injection volume at 25°C. HPLC analysis of QUE (Method 1) was carried out using a mobile phase consisting of acetonitrile and methanol (4:6 v/v) at a flow rate of 1.2 ml/min and detection at 370 nm, while the assay of RES (Method 2) was performed using a mobile phase consisting of acetonitrile and methanol (6:4 v/v) at a flow rate of 0.3 ml/min and detection at 307 nm.

The method for quantifying QUE and RES in elastic liposomes was validated following the procedures presented by the European Medicines Agency (EMA, CPMP/ICH, 381, 95). Absorbance vs. concentrations curves were plotted using standard solutions of QUE or RES at concentrations ranging from 2 to 80 µg/ml and 1 to 50 µg/ml, respectively. Assays were performed in triplicate. The linearity of the standard curves was validated for each drug by the least square method and one-way analysis of variance (ANOVA), assuming $p < 0.05$. The limits of detection and quantification were also determined.

2.2.4. Preparation of elastic QUE/RES-loaded liposomes

SDC elastic liposomes containing QUE and RES entrapped in their phospholipid bilayer or SDC:HPβ-CD, RES:HPβ-CD or QUE:HPβ-CD) inclusion complexes encapsulated in their aqueous inner cavity were prepared using the thin lipid film

method [16, 17]. Briefly, a thin lipid film, named as organic phase (OP), consisting of PtdCho and C with or without SA was produced from a mixture of CHCl_3 :MeOH (3:1 v/v) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 rpm for 60 min. This film was then hydrated with 10 mL of an aqueous phase (AP) containing 50 mM potassium phosphate buffer (PP) at pH 7.4 or 50 mM phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4, resulting in the formation of multilamellar liposomes. This liposomal suspension was then sonicated (Vibra Cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s to form small unilamellar liposomes. SDC, QUE or RES were placed in the organic phase for the lipid film formation; and SDC:HP β -CD, RES:HP β -CD and QUE:HP β -CD were placed in the AP during the lipid film redispersion.

2.2.5. Experimental designs

At first, a two-level 2^{5-1} fractional experimental design was employed to optimize the formulation of liposomes. Factors of formulation that mainly influenced the physicochemical characteristics of liposomes such as constituent concentrations (PtdCho and C) and drug inclusion complexes with HP β -CD were evaluated at two levels and central point. The factors were defined as follows: Factor A = PtdCho (69.95, 82.32 and 94.69 mM); Factor B = C (18.74, 23.52 and 28.30 mM); Factor C = SDC in the organic phase (OP = 1.45 - 0.725 mM) or in the aqueous phase (AP = 1.45 - 0.725 mM); Factor D = QUE (OP = 0.66 - 0.33 mM and AP = 0.66 - 0.33 mM); Factor E = RES (OP = 0.88 - 0.44 mM and AP = 0.88 - 0.44 mM). The mean size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ mV) and drug encapsulation efficiency (EE%) of liposomes were used as the response variables of the design study. Next, a two-level 2^3 full experimental design was employed for studying the drug concentration effects and the co-encapsulation of QUE and RES (1:1 molar ratio) on the liposomal

physicochemical parameters evaluated at two levels and central point as mentioned above. The factors were defined as follows: Factor A = C (13.96, 18.74 and 23.52 mM); Factor B = SDC (1.45, 3.625 and 5.80 mM); Factor C = QUE and RES (1.54, 3.08 and 4.62 mM).

2.2.6. Physicochemical characterisation of elastic QUE/RES-loaded liposomes

Drug encapsulation efficiency (EE%) was determined through the ultrafiltration/ultracentrifugation technique using Ultrafree[®] units (Millipore, USA). After centrifugation of the samples (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8.776 g for 1 h at 4 °C, the contents of QUE and RES in the supernatant were measured by a validated HPLC method as described above. The EE% was determined as follow:

$$EE\% = \frac{[measuredDrug] - [unloadedDrug]}{[measuredDrug]} \quad (1)$$

In the liposomes containing QUE and RES co-encapsulated, the total EE% was defined as:

$$EE\% = \frac{1}{2} (EE\%_{QUE} + EE\%_{RES}) \quad (2)$$

The particle size and polydispersity index (PDI) of elastic liposomes were determined by standard photon correlation spectroscopy (Beckman-Coulter DelsaTM NanoS Particle analyser, Germany) at a fixed angle of 90°. The zeta potential (ζ mV) of liposomes was measured at 25°C using the electrophoresis technique (Zetatrak NC-148, Microtrac, USA).

2.2.7. Scanning electron microscopy of elastic QUE/RES-loaded liposomes

Samples for scanning electron microscopy (SEM) evaluation were obtained by dispersing a drop (20 μ l) of the liposomal formulation onto a coverslip containing poly-

L-lysine solution (0.01% w/v), dried at room temperature (25°C) and fixed with 2% osmium tetroxide vapour for 1 h at 4°C. The coverslip was then fixed on an SEM-stub using conductive double-sided tape, coated with a thin layer (100 nm) of gold/palladium in a vacuum sputtering, and examined (JSM-5600 microscope, Jeol, Japan) at 5 and 10 kV.

2.2.8. *In vitro* release kinetics of QUE and RES from elastic liposomes

The release kinetics of QUE and RES from elastic liposomes was performed using the dialysis sac technique (cellulose membrane, cut-off = 12,400 MW, Sartorius, Germany). For this purpose the sink conditions were established according to apparent solubility studies (item 2.2.1). An aliquot of 0.4 ml elastic liposomes was transferred to the dialysis sac, which was sealed and immersed in dark flasks containing 250 ml of 100 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.4). The release system was maintained under magnetic stirring (100 rpm) at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. At a predetermined sampling time, 1 mL aliquot of medium was drawn and replaced with the same volume of fresh release medium. QUE and RES content were measured by HPLC as described above. Results are expressed as the percentage of released drug as a function of time and values represent the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three assay replicates.

2.2.9. Statistical analysis

The statistical analyses of data were carried out using the Statistica 8.0[®] software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Apparent solubility and dissolution rate of QUE and RES

The results of the apparent solubility of QUE and RES in water, 50 mM PP buffer solution and 50 mM PBS at pH 7.4 are shown in Table 1. The solubility of QUE increased tenfold in PP buffer solution at 7.4 pH (3.2 $\mu\text{g/ml}$) with respect to its solubility in water (0.3 $\mu\text{g/ml}$). This result is explained by the slight ionization of QUE that occurred at pH 7.4 ($\text{pK}_a = 6.74$) [18]. These results corroborate those previously reported by Priprem et al. [19], where a QUE solubility of 0.7 $\mu\text{g/ml}$ in water and 4.3 $\mu\text{g/ml}$ in 7.4 pH buffer solutions at 37°C, respectively, was determined. On the other hand, no change in the solubility of RES was found in pH 7.4 buffer solutions because no ionization of the RES molecule that occurred at this pH ($\text{pK}_a = 9.3$) [20]. These results were not unexpected bearing in mind the pK_a values of these flavonoids. Further, as the QUE molecule has the potential to ionize phenolic hydroxyl groups, a pH-dependent solubility is to be expected. As previously described for a QUE dissolution study [21] at lower a pH, the free H^+ ion tends to keep QUE in its molecular state and its ionization is avoided. On the other hand, the concentration of H^+ ion decreases gradually with an increase in pH. Therefore, at high pH QUE behaves as a weak acid, which means that QUE is being ionized, leading to an increase in its solubility.

3.2. Inclusion complexes of SDC, QUE and RES with HP β -CD

The $K_{C_{1:1}}$ of SDC:HP β -CD was $2.12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. The $K_{C_{1:1}}$ of QUE:HP β -CD and RES:HP β -CD inclusion complexes were previously determined with values of $1.42 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and $1.82 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectively [22, 23].

3.3. HPLC validation method for determining QUE and RES in elastic liposomes

Two independent HPLC methods were validated to quantify QUE and RES in liposomes without drug extraction. The detection was carried out at different wavelengths, 370 nm for QUE and 307 nm for RES. The retention time of QUE was 3.56 min (Method 1) and 11.13 min for RES detection (Method 2). The standard curves for the linearity assays were plotted with five concentrations allowing the derivation of the following regression linear equations: $[QUE_{\mu\text{g/ml}}] = 3.86 (\pm 0.17) \times A - 13.31 (\pm 7.93)$ and $[RES_{\mu\text{g/ml}}] = 23.31 (\pm 0.33) \times A - 24.29 (\pm 9.6)$. The standard curves were validated by the least squares method showing correlation coefficients higher than 0.9975 and the one-way analysis of variance (ANOVA) showing F and p values of 57,133.04 and 0.0002 for QUE and 4,884.57 and less than 6×10^{-6} for RES, respectively. The limits of detection were 0.78 $\mu\text{g/ml}$ for QUE and 0.13 $\mu\text{g/ml}$ for RES, respectively. The corresponding limits of quantification were 2.59 and 0.43 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

3.4. Properties of elastic QUE/RES-loaded liposomes

After the formulation, the macroscopic appearance of the liposomal dispersions was observed. Liposomal formulations exhibited a milky appearance with a typically bluish reflection characteristic of nanometric dispersed vesicles [17]. Table 2 shows the effect of the PP or PBS buffers on the properties of liposomes. No significant differences in mean size between PP-liposomes with or without SA and PBS-liposomes with SA were observed using the Tukey test ($p < 0.05$). However, PBS-liposome without SA showed the largest mean size. A slight increase in the mean diameter of the liposomes without SA occurred, probably due to an increase of the vesicle aggregation, given the low zeta potential of liposomes. Suitable PDI values were obtained in all

formulations. Based on these results, PP-liposomes were thus chosen for nanoencapsulation of drugs.

The physicochemical characteristics of elastic QUE/RES-loaded liposomes are shown in Table 2. Elastic liposomes with SA showed smaller sizes than those without SA. With reference to the PDI value, no significant differences were observed. QUE-loaded liposomes showed a statistically significant difference in mean size ($p < 0.05$), but no significant differences were found in the PDI. QUE-loaded liposomes with SA presented the lowest average diameter. In addition, It was also observed that the SA influenced the UV absorptivity of QUE (data not shown), resulting in a reduction of more than 10% in EE%. Among the formulations produced with QUE, liposomes without SA were chosen for further experiments because they showed a higher EE%, as well as maintaining drug stability during the manufacturing process. Furthermore, the mean size of liposomes was compatible with the subcutaneous injection (> 100 nm), allowing them to remain at the site of injection [24]. In relation to the mean size, EE% and PDI, RES-loaded liposomes showed no statistical significant differences ($p < 0.05$). RES-loaded liposomes without SA were thus chosen, due to their higher EE% and also the co-encapsulation of QUE without being affected by SA.

3.5. Experimental designs

The nineteen experimental runs of the two-level 2^{5-1} fractional design and their responses are shown in Table 3. The experiments were randomly evaluated in order to nullify the effect of inappropriate nuisance variables. The preliminary runs (Table 2) were conducted initially to establish the feasible range of each formulation parameter. All liposomes had a mean size compatible with subcutaneous injection (> 100 nm), where the formulations prepared with the lower concentration of PtdCho (69.65 mM)

and SDC placed in the organic phase showed the lowest PDI values (Table 3). In addition, the high values of zeta potential were observed when SDC and RES were placed in the organic phase and the smallest PtdCho concentration (69.65 mM) was used. Finally, the greatest EE% was observed when SDC and RES were used in the organic phase ($p < 0.05$). The mean values of pH and absolute viscosity values of all liposomal formulations were 7.64 ± 0.07 and 0.372 ± 0.001 mPa.s, respectively.

Fig. 1 shows the scatter plots indicating the best liposomal formulations (runs 9 and 3), which have in common the lowest PtdCho concentration (69.65 mM), and SDC and RES placed in the organic phase. QUE high encapsulation efficiency was found regardless of its location in the organic or aqueous phase, allowing the choice of the organic phase in order to design a simple and less expensive liposomal formulation.

Based on these findings, a new experimental design was proposed, taking into account the variables C concentration and QUE and RES co-encapsulation in the presence of SDC. The SDC concentration was also studied as it can lead to an improvement in the zeta potential of liposomes. The experimental runs of the two-level 2^3 full experimental design and their responses are summarized in Table 4. The concentration of C was not statistically significant for all physicochemical characteristics and was used in a minor concentration (13.96 mM) for further experiments. These results are shown in Fig. 2. The formulation prepared with C, SDC, QUE and RES at 13.96, 5.8 and 4.62 mM (run 7) had the best parameters: high EE% ($97.5 \pm 0.06\%$), satisfactory values of mean size (149.4 ± 2.47 nm) and PDI (0.295 ± 0.011). These elastic liposomes were morphologically analysed by SEM, exhibiting well-dispersed vesicles without aggregation (Fig. 3a) and spherical-shaped particles (Fig. 3b). In addition, light fringes were observed, which could be misinterpreted as the

lamellar structure of liposomes. But this phenomenon is due to the fixation with osmium tetroxide vapour [25].

3.6. *In vitro* release kinetics of QUE and RES from elastic liposomes

As shown in Fig. 4, the *in vitro* release profiles of elastic QUE- and RES-loaded liposomes were compared. QUE was released from liposomes (56.3%) at 1 h, which corresponds to the burst effect. Next, a controlled release was verified from 56.3 to 98.29% for 57 h. For RES, the burst effect corresponded to 53.34% at 1 h, followed by a controlled release from 53.34 to 96.42%, reaching the maximum release at 54.5 h. The *in vitro* kinetic behaviour of QUE/RES-loaded liposomes seems to be suitable bearing in mind that an initial burst effect is required to quickly achieve levels as high as 100 μ M of QUE and RES, which are essential for the enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis [2].

4. Discussion

Treatments to dissolve subcutaneous fat based on the detergent action of SDC in lipid structures with high concentrations of phospholipid have been developed and commercialized, despite presenting several adverse effects [11]. As a result, there has been a renewed interest in developing new products to be used as an adjuvant in treatment with SDC. With this in mind, this study focused on the development and characterization of an innovative product based on elastic SDC liposomes containing QUE and RES co-encapsulated for subcutaneous administration.

It is well known that the stability of liposomes is dependent on both formulation and manufacturing method parameters. In the present study, the preformulation of liposomes varying the concentration of constituents and the phase of incorporation was

carried out. The encapsulation of QUE or RES into liposomes altered the mean size, PDI and surface charge in relation to unloaded liposomes (Table 1). The presence of stearylamine, adds positive charged character to phospholipid bilayers of liposomes, caused a decrease of about 10% in the encapsulation efficiency of quercetin ($p < 0.05$). However, high encapsulation efficiencies of QUE in liposomes prepared with SA (PtdCho:C:SA, 7:2:1) or without SA (PtdCho:C, 7:2) were attained ($86 \pm 5.2\%$ and $97.3 \pm 1.3\%$, respectively). Indeed, it has been shown that QUE exhibits a high affinity for liposomes as a result of its planar configuration, which can be easily intercalated into the organized bilayer structure of the phospholipid molecules forming the liposomes [26]. As previously reported, QUE-loaded liposomes prepared with a mixture of egg phosphatidylcholine and cholesterol at a 1:1 molar ratio and quercetin (2:1:1) presented encapsulation efficiencies ranging from 62% to 81% [19].

On the other hand, no effect of SA on the entrapment efficiency of RES in the phospholipid bilayer of liposomes was found. Furthermore, the entrapment of QUE or RES did not squeeze out stearylamine molecules from the phospholipid bilayer, since a positive surface charge (zeta potential varying from 21 to 26 mV) of liposomes was measured (Table 2). The liposomes prepared with SA containing drug:HP β -CD inclusion complexes showed the same zeta potential than uncomplexed drugs, but the liposomes prepared without SA showed smaller zeta potential values than those containing drug:HP β -CD inclusion complexes. Moreover, drug penetration into the phospholipid bilayer can modify the zeta potential of liposomes. As previously reported, neutral and positively charged liposomes were more localized in the regional lymph nodes than negatively charged liposomes after subcutaneous administration [27]. Based on these findings, the liposomes prepared without SA (negatively charged liposomes) were thus chosen for further experimental designs.

From the results, the co-encapsulation of QUE and Res in elastic SDC-liposomes was considered using a full 2^3 experimental design. In this study, the influence of liposome constituents and the incorporation of drugs into cyclodextrin inclusion complexes were evaluated. All liposomal formulations presented a particle size greater than 100 nm (Table 3), being therefore suitable for subcutaneous administration. The absorption of liposomes from the injection site after subcutaneous administration is size-dependent and governed by the transport of vesicles through the interstitial organized structure [24]. In fact, it was found that large liposomes (larger than 100 nm) will have more difficulty in passing through the interstitial structure and will remain at the site of injection. On the other hand, smaller vesicles can migrate through the aqueous channels in the interstitial structure and reach the lymphatic system.

No statistically significant differences in the physicochemical parameters of elastic SDC-liposomes with QUE and RES entrapped or encapsulated as cyclodextrin inclusion complexes were found. Similar results were obtained by Gillet et al. [9] for betametasone in HP γ CD and Crysmeb inclusion complexes encapsulated into elastic SDC-liposomes. The encapsulation of drug inclusion complexes was subsequently removed for further design experiments in order to obtain more simple formulations with reduced costs.

The liposomal formulations 9 and 3 had optimal physicochemical parameters (Fig.1), but differed in relation to C concentrations, which influence the rigidity of the phospholipid bilayer [28] and, as a result, the stability of liposomes. In contrast, SDC provides a more fluid bilayer as described by Chen et al. [29]. As the results of the influence of C and SDC concentrations on the physicochemical parameters of liposomes were inconclusive, a full 2^3 experimental design was developed with the aim of

encapsulating a large amount of drug. Again, the mean size of all liposomal formulations was higher than 100 nm (Table 4). The PDI of the chosen liposomes varied between 0.2 and 0.3 (formulation 7), indicating a narrow size distribution of vesicles and the homogeneity of the formulation. Moreover, liposomes prepared with high SDC concentrations exhibited a smaller size than those with small SDC concentrations. This reduction of the particle size diameter of elastic SDC-liposomes may be attributed to the increased flexibility and reduced surface tension of these vesicles. In addition, the final pH of all formulations of elastic SDC-liposomes was 7.4. Indeed, it has been reported the hydration of elastic SDC-liposomes prepared with pH 7.4 buffer solutions reduces the vesicle size and improves drug loading [29].

No significant effect of C concentrations on the physicochemical parameters was found (Fig. 2). On the contrary, the increase in SDC concentration caused a slight increase in the zeta potential (a statistically significant positive effect), due to the presence of SDC molecules negatively charged at the surface of liposomes.

The typical elastic SDC-liposomes obtained in this study were able to entrap 23 times more quercetin and resveratrol (4620 μM) than the formulations reported in the literature (100 μM). Yang et al. [2] studied the combined effects of QUE and RES treatment (both at 100 μM) on 3T3-L1 cells and found a decrease in their viability ($73.5 \pm 0.9\%$) and an increase in apoptosis ($310.3 \pm 9.6\%$), which was more pronounced than the treatment with QUE or RES alone. In addition, Park et al. [1] studied the effects of QUE and RES (100 μM) associated with genistein (50 μM) on early- and mid-phase maturing, and lipid-filled mature 3T3-L1 cells. A decrease in cell viability and an induction of apoptosis were observed. Based on these findings, the association of QUE and RES in liposomes is justified by the enhancement of their synergistic effects.

In relation to SDC, the concentration used to dissolve localised fat is 42 mg/ml, which has necrotic effects and causes various adverse events [10]. In the present study the SDC concentration entrapped in liposomes was 2.4 mg/ml, which is less than that used to dissolve localised fat. However, a possible necrotic effect of the elastic liposomal formulations produced cannot be ruled out.

Experimental designs showed that a reduction in the PtdCho and C concentrations of 17.68% and 68.36%, respectively, can be achieved for manufacturing stable liposomes containing three times more nanoencapsulated SDC, QUE and RES (formulation 7). This formulation presented a mean size and PDI values of 150 nm and 0.29, respectively, a zeta potential slightly negative (-14 mV) and EE% higher than 97%. On this basis, the liposomes prepared with PtdCho, C and SDC (69.65, 13.96 and 5.8 mM, respectively) containing QUE and RES at 4.62 mM were chosen for the *in vitro* release kinetics.

In vitro release kinetic studies have been used as a surrogate indicator of *in vivo* drug availability [29], especially for poorly water-insoluble drugs such as QUE and RES. In this study, the kinetics showed an initial drug burst effect, which was considered important for attaining higher levels of QUE and RES (>100 μ M). The complete release of drugs was attained at 60 h (Fig. 4). QUE and RES were entrapped in the phospholipid bilayer of liposomes and the presence of SDC probably enhanced lipid fluidity thus permitting enhanced drug leakage, as previously observed [30]. Our results corroborate those of Chen et al. [29] for the faster kinetic profile of fenofibrate from elastic (PtdCho/SDC) than conventional (PtdCho/C) liposomes.

Conclusion

This study offered a new elastic SDC-liposomal formulation containing co-encapsulated QUE and RES. The experimental design permitted to the optimization of elastic QUE/RES-loaded liposomes with suitable physicochemical properties and kinetic drug profiles for subcutaneous injection. This elastic SDC-liposome formulation thus displayed promising characteristics for further upcoming experiments. Currently, *in vitro* and *in vivo* studies are being undertaken in our laboratory to evaluate the potential effectiveness of the liposomal formulation in dissolving localized subcutaneous fat.

Acknowledgements

The first author is grateful to the Foundation for Science and Technology Development of the Pernambuco State of Brazil – FACEPE for a PhD 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. Also much appreciated was the collaboration with the Institute of Technologies of the Northeast Brazil - CETENE.

Abbreviations

AP – Aqueous phase with HP β -CD;

C – Cholesterol;

EE% – Encapsulation efficiency

OP – Organic phase;

PBS – Phosphate buffered saline;

PtdCho – Soya phosphatidylcholine;

PDI – Polydispersity index;

PP – Potassium phosphate buffer;

QUE – Quercetin;

RES – Resveratrol;

SA – Stearylamine;

SDC – Sodium deoxycholate;

Greek Letters

ζ – Zeta potential;

HP β -CD – 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin.

References

1. Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Baile CA (2008) Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11: 773-783.
2. Yang J-Y, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA (2008) Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 82: 1032-1039.
3. 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 Bioph Res Co* 373: 545-549.
4. Baile CA, Yang JY, Rayalam S, Hartzell DL, Lai CY, Andersen C, Della-Fera MA (2011) Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann NY Acad Sci* 1215: 40-47.
5. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J (2008) Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm* 363: 183-191.
6. Lasic DD (1998) Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnol* 16: 307-321.

7. Jo SM, Lee HY, Kim JC (2008) Glucose-sensitive liposomes incorporating hydrophobically modified glucose oxidase. *Lipids* 43: 937-943.
8. Cevc G, Blume G (1992) Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *BBA - Biomembranes* 1104: 226-232.
9. Gillet A, Grammenos A, Compère P, Evrard B, Piel G (2009) Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *Int J Pharm* 380: 174-180.
10. Duncan D, Rubin JP, Golitz L, Badylak S, Kesel L, Freund J, Duncan D (2009) Refinement of technique in injection lipolysis based on scientific studies and clinical evaluation. *Clin Plast Surg* 36: 195-209.
11. Salti G, Ghersetich I, Tantussi F, Bovani B, Lotti T (2008) Phosphatidylcholine and sodium deoxycholate in the treatment of localized fat: A double-blind, randomized study. *Dermatol Surg* 34: 60-66.
12. Klein SM, Schreml S, Nerlich M, Prantl L (2009) In vitro studies investigating the effect of subcutaneous phosphatidylcholine injections in the 3T3-L1 adipocyte model: Lipolysis or lipid dissolution? *Plast Reconstr Surg* 124: 419-427.
13. USP, The United States Pharmacopeia. The National Formulary, USP 32, NF 27, Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2009.
14. Cadena PG, Oliveira EC, Araújo AN, Montenegro MCBSM, Pimentel MCB, Lima Filho JL, Silva VL (2009) Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein- β -cyclodextrin inclusion complex. *Lipids* 44: 1063-1070.
15. Loftsson T, Duchêne D (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329: 1-11.

16. Cavalcanti IMF, Mendonça EAM, Lira MCB, Honrato SB, Camara CA, Amorim RVS, Filho JM, Rabello MM, Hernandez MZ, Ayala AP, Santos-Magalhães NS (2011) The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *Eur J Pharm Sci* 44: 332-340.
17. Lira MCB, Ferraz MS, da Silva DGVC, Cortes ME, Teixeira KI, Caetano NP, Sinisterra RD, Ponchel G, Santos-Magalhães NS (2009) Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J. Incl Phenom Macro* 64: 215-224.
18. Arshad N, Janjua NK, Ahmed S, Khan AY, Skibsted LH (2009) Electrochemical investigations of antioxidant interactions with radical anion and dianion of 1,3-dinitrobenzene. *Electrochim Acta* 54: 6184-6189.
19. Priprem A, Watanatorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S (2008) Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine NBM* 4: 70-78.
20. Deak M, Falk H (2003) On the Chemistry of the Resveratrol Diastereomers. *Monatsh Chem* 134: 883-888.
21. Sahoo NG, Kakran M, Shaal LA, Li L, Müller RH, Pal M, Tan LP (2011) Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. *J Pharm Sci* 100: 2379-2390.
22. Jullian C, Moyano L, Yañez C, Olea-Azar C (2007) Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochim Acta A* 67: 230-234.
23. Lu Z, Cheng B, Hu Y, Zhang Y, Zou G (2009) Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chem* 113: 17-20.

24. Oussoren C, Storm G (2001) Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliver Rev* 50: 143-156.
25. Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y (2011) Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm* 417: 138-150.
26. Van Dijk C, Driessen AJM, Recourt K (2000) The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem Pharmacol* 60: 1593-1600.
27. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G (1997) Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *BBA - Biomembranes* 1328: 261-272.
28. Angelini G, Chiarini M, De Maria P, Fontana A, Gasbarri C, Siani G, Velluto D (2011) Characterization of cationic liposomes. Influence of the bilayer composition on the kinetics of the liposome breakdown. *Chem Phys Lipids* 164: 680-687.
29. Chen Y, Lu Y, Chen J, Lai J, Sun J, Hu F, Wu W (2009) Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. *Int J Pharm* 376: 153-160.
30. Kawano K, Onose E, Hattori Y, Maitani Y (2009) Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro antitumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone. *Mol Pharmacol* 6: 98-104.

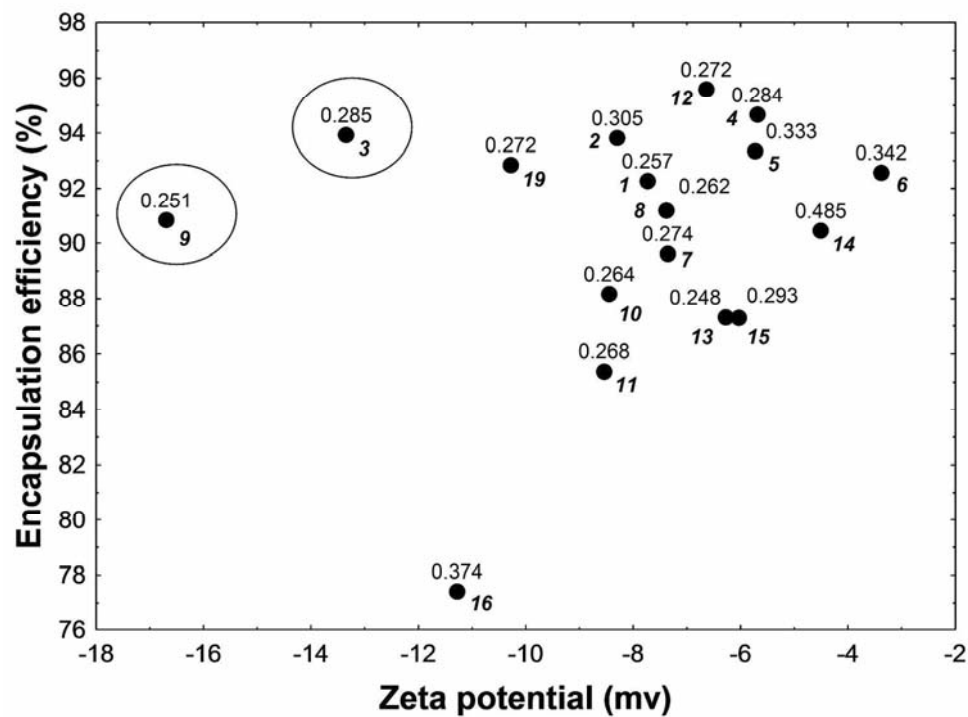
List of Figures

Fig. 1. Scatter plot of the formulations produced using a 2^{5-1} fractional experimental design and effects of response variables zeta potential, encapsulation efficiency and polydispersity index (formulation number indicated above).

Fig. 2. Scatter plot of the formulations produced using a 2^3 full experimental design and effects of response variables zeta potential, polydispersity index, quercetin and resveratrol concentrations (formulation number indicated above).

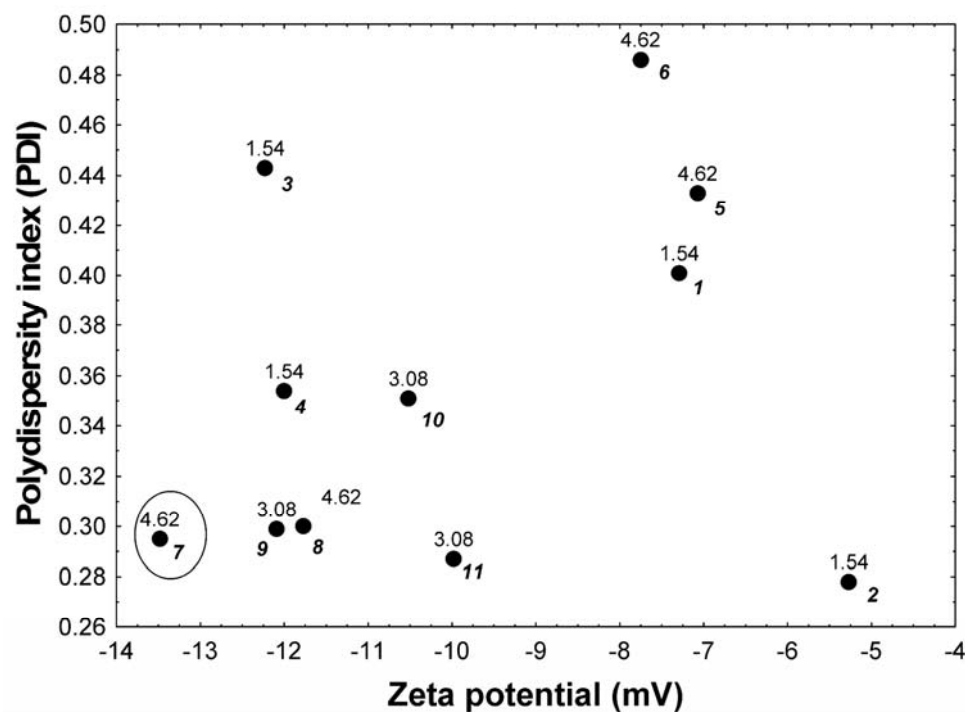
Fig. 3. SEM micrographs of elastic QUE/RES-loaded liposomes.

Fig. 4. *In vitro* kinetic profile of QUE/RES-loaded liposomes in pH 7.4 phosphate buffer solution at 37 °C.



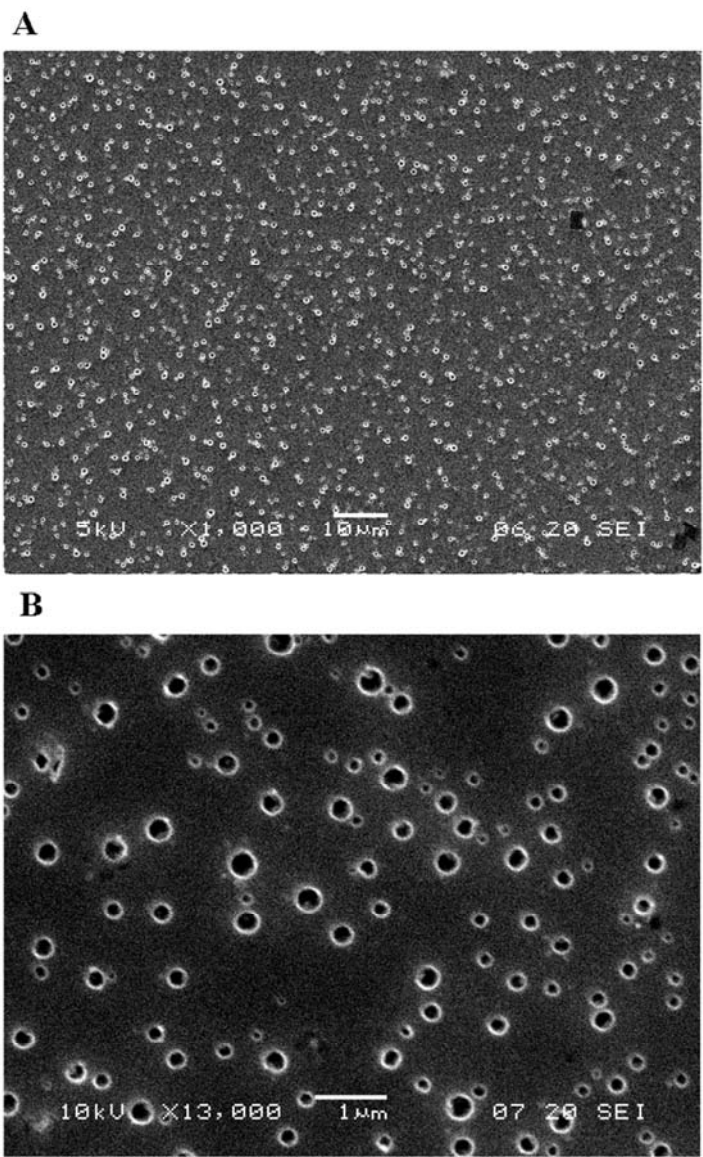
Scatter plot of the formulations produced using a 2^{5-1} fractional experimental design and effects of response variables zeta potential, encapsulation efficiency and polydispersity index (formulation number indicated above).

1031x773mm (96 x 96 DPI)

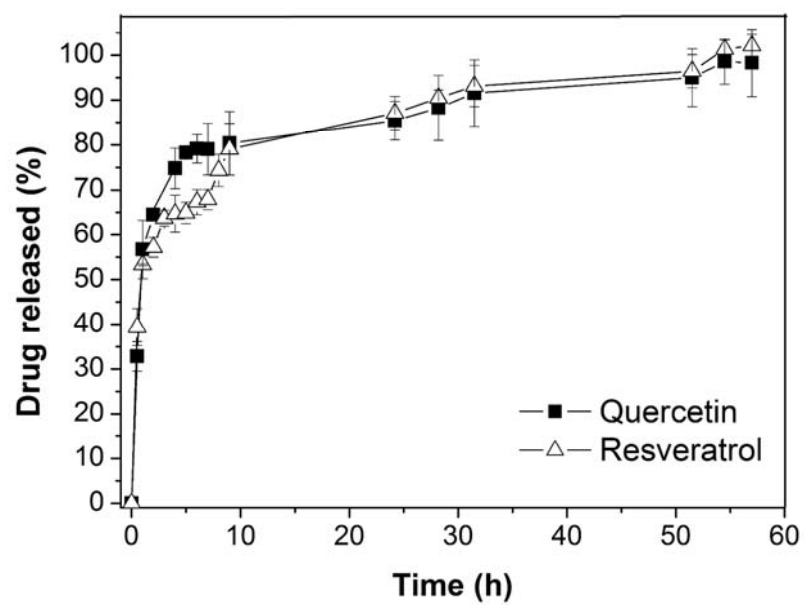


Scatter plot of the formulations produced using a 2^3 full experimental design and effects of response variables zeta potential, polydispersity index, quercetin and resveratrol concentrations (formulation number indicated above).

1036x773mm (96 x 96 DPI)



SEM micrographs of elastic QUE/RES-loaded liposomes.
132x214mm (127 x 127 DPI)



In vitro kinetic profile of QUE/RES-loaded liposomes in pH 7.4 phosphate buffer solution at 37 °C.
594x419mm (150 x 150 DPI)

Tables.

Table 1. The apparent solubility and dissolution rate of QUE and RES at 37°C.

Drug/Solvent	Solubility (µg/ml)	Dissolution rate ×10 ² (µg.h ⁻¹)
QUE		
Water	0.3	0.09
PP	3.2	2.00
PBS	2.2	1.00
RES		
Water	21.0	8.00
PP	20.0	7.00
PBS	21.0	9.00

PP = 50 mM phosphate potassium buffer (pH = 7.4); PBS = 50 mM phosphate buffer saline (pH = 7.4).

Table 2. Pre-formulation study of SDC elastic liposomes containing QUE, RES or inclusion complexes using different buffer solutions.

Liposomal Formulations*	Mean size (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
PtdCho-C-SA-PP	117.1 $\pm$ 10.1 ^a	0.291 ^{ab}	21.87 $\pm$ 1.55	ND
PtdCho-C-SA-PBS	130.6 $\pm$ 10.3 ^a	0.346 ^b	32.42 $\pm$ 0.74	ND
PtdCho-C-PP	133.3 $\pm$ 11.1 ^a	0.327 ^{ab}	-5.17 $\pm$ 0.96	ND
PtdCho-C-PBS	166.7 $\pm$ 20.6 ^b	0.280 ^a	0.47 $\pm$ 0.01	ND
PtdCho-C-SA-SDC	110.8 $\pm$ 13.4 ^a	0.324 ^a	21.68 $\pm$ 2.72	ND
PtdCho-C-SDC	134.7 $\pm$ 3.6 ^b	0.301 ^a	-13.3 $\pm$ 3.5	ND
PtdCho-C-SA-SDC:HP β CD	106.5 $\pm$ 10.8 ^a	0.320 ^a	20.99 $\pm$ 2.64	ND
PtdCho-C-SDC:HP β CD	123.6 $\pm$ 8.5 ^{ab}	0.314 ^a	-8.94 $\pm$ 0.24	ND
PtdCho-C-SA-QUE	110.1 $\pm$ 9.3 ^a	0.347 ^a	25.93 $\pm$ 1.87	86.0 $\pm$ 5.20 ^a
PtdCho-C-QUE	124.9 $\pm$ 2.1 ^b	0.298 ^a	-3.72 $\pm$ 1.37	97.3 $\pm$ 1.30 ^b
PtdCho-C-SA-QUE:HP β CD	146.1 $\pm$ 5.6 ^c	0.298 ^a	22.86 $\pm$ 1.67	93.9 $\pm$ 1.76 ^b
PtdCho-C-QUE:HP β CD	126.2 $\pm$ 1.4 ^b	0.272 ^a	-10.01 $\pm$ 2.76	95.5 $\pm$ 0.58 ^b
PtdCho-C-SA-RES	118.8 $\pm$ 9.5 ^a	0.321 ^a	22.91 $\pm$ 1.46	96.4 $\pm$ 2.64 ^a
PtdCho-C-RES	142.5 $\pm$ 5.1 ^b	0.327 ^a	-0.47 $\pm$ 0	98.3 $\pm$ 0.86 ^a
PtdCho-C-SA-RES:HP β CD	120.7 $\pm$ 1.7 ^a	0.272 ^a	21.02 $\pm$ 1.40	93.8 $\pm$ 0.86 ^a
PtdCho-C-RES:HP β CD	115.0 $\pm$ 14.3 ^a	0.337 ^a	-6.95 $\pm$ 1.96	95.5 $\pm$ 1.92 ^a

*Molar ratio (mol/mol%): PC:CH (3.5:1), PC:CH:SA (7:2:1); [SDC = 1.45]; [QUE = 0.66]; [RES = 0.88]; ^{a-c}Mean values from three replicates. Average with different letters differs statistically by Tukey test (p < 0.05); ND = not determined.

Table 3. Two-level 2^{5-1} fractional experimental design of elastic liposomes containing QUE and RES or inclusion complexes.

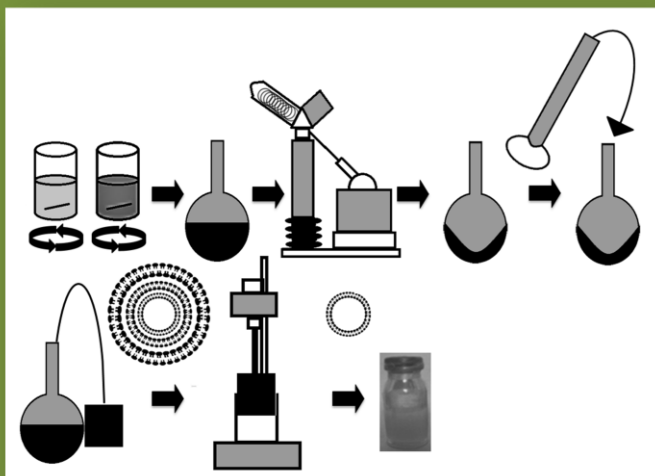
Runs	PtdCho (mM)	C (mM)	SDC (mM)	QUE* (mM)	RES* (mM)	Size (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
1	69.95	18.74	OP - 1.45	OP - 0.66	AP - 0.88	128.3 $\pm$ 1.78	0.257	-7.73 $\pm$ 0.68	92.26 $\pm$ 0.52
2	94.69	18.74	OP - 1.45	OP - 0.66	OP - 0.88	139.5 $\pm$ 6.04	0.305	-8.29 $\pm$ 0.30	93.82 $\pm$ 0.18
3	69.95	28.30	OP - 1.45	OP - 0.66	OP - 0.88	133.6 $\pm$ 3.24	0.285	-13.34 $\pm$ 1.36	93.92 $\pm$ 0.14
4	94.69	28.30	OP - 1.45	OP - 0.66	AP - 0.88	122.5 $\pm$ 4.82	0.284	-5.68 $\pm$ 0.92	94.66 $\pm$ 0.08
5	69.95	18.74	AP - 1.45	OP - 0.66	OP - 0.88	131.5 $\pm$ 3.95	0.333	-5.72 $\pm$ 0.50	93.34 $\pm$ 0.25
6	94.69	18.74	AP - 1.45	OP - 0.66	AP - 0.88	164.5 $\pm$ 3.52	0.342	-3.38 $\pm$ 1.20	92.56 $\pm$ 0.21
7	69.95	28.30	AP - 1.45	OP - 0.66	AP - 0.88	129.1 $\pm$ 1.89	0.274	-7.35 $\pm$ 1.23	89.62 $\pm$ 0.75
8	94.69	28.30	AP - 1.45	OP - 0.66	OP - 0.88	133.3 $\pm$ 2.48	0.262	-7.38 $\pm$ 1.15	91.18 $\pm$ 0.21
9	69.95	18.74	OP - 1.45	AP - 0.66	OP - 0.88	129.7 $\pm$ 2.48	0.251	-16.69 $\pm$ 0.85	90.84 $\pm$ 0.70
10	94.69	18.74	OP - 1.45	AP - 0.66	AP - 0.88	129.4 $\pm$ 2.71	0.264	-8.44 $\pm$ 1.29	88.17 $\pm$ 0.15
11	69.95	28.30	OP - 1.45	AP - 0.66	AP - 0.88	139.5 $\pm$ 3.42	0.268	-8.54 $\pm$ 0.20	85.37 $\pm$ 0.41
12	94.69	28.30	OP - 1.45	AP - 0.66	OP - 0.88	135.9 $\pm$ 2.03	0.272	-6.64 $\pm$ 0.69	95.59 $\pm$ 0.06
13	69.95	18.74	AP - 1.45	AP - 0.66	AP - 0.88	133.3 $\pm$ 1.78	0.248	-6.28 $\pm$ 1.59	87.30 $\pm$ 0.82
14	94.69	18.74	AP - 1.45	AP - 0.66	OP - 0.88	138.2 $\pm$ 1.89	0.485	-4.51 $\pm$ 0.90	90.45 $\pm$ 0.25
15	69.95	28.30	AP - 1.45	AP - 0.66	OP - 0.88	145.7 $\pm$ 0.59	0.293	-6.03 $\pm$ 0.23	87.29 $\pm$ 1.15
16	94.69	28.30	AP - 1.45	AP - 0.66	AP - 0.88	123.6 $\pm$ 3.79	0.374	-11.28 $\pm$ 0.99	77.41 $\pm$ 0.39
17	82.32	23.52	OP - 0.725	OP - 0.33	OP - 0.44	130.0 $\pm$ 6.33	0.283	-9.98 $\pm$ 0.93	89.41 $\pm$ 0.11
			AP - 0.725	AP - 0.33	AP - 0.44				
18	82.32	23.52	OP - 0.725	OP - 0.33	OP - 0.44	133.3 $\pm$ 5.05	0.284	-7.47 $\pm$ 0.80	93.58 $\pm$ 0.56
			AP - 0.725	AP - 0.33	AP - 0.44				
19	82.32	23.52	OP - 0.725	OP - 0.33	OP - 0.44	130.1 $\pm$ 2.26	0.272	-10.28 $\pm$ 0.98	92.85 $\pm$ 0.19
			AP - 0.725	AP - 0.33	AP - 0.44				

*Co-encapsulation of QUE and RES in the phospholipid bilayer or aqueous phase.

Table 4. Two-level 2³ full experimental design and physicochemical properties of elastic QUE/RES-loaded liposomes.

Runs	C (mM)	SDC (mM)	QUE + RES* (1:1, mM)	Size (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
1	13.96	1.45	1.54	153.11 ± 9.86	0.401 ± 0.079	-7.29 ± 0.97	98.53 ± 0.27
2	23.52	1.45	1.54	143.48 ± 4.87	0.278 ± 0.027	-5.27 ± 0.52	98.42 ± 0.12
3	13.96	5.80	1.54	124.93 ± 8.41	0.443 ± 0.093	-12.23 ± 0.84	97.55 ± 0.07
4	23.52	5.80	1.54	123.40 ± 3.85	0.354 ± 0.038	-12.00 ± 0.31	98.60 ± 0.06
5	13.96	1.45	4.62	142.00 ± 7.95	0.433 ± 0.089	-7.07 ± 0.37	99.50 ± 0.04
6	23.52	1.45	4.62	146.62 ± 9.82	0.486 ± 0.083	-7.75 ± 0.44	97.89 ± 0.02
7	13.96	5.80	4.62	149.43 ± 2.47	0.295 ± 0.011	-13.48 ± 0.25	97.49 ± 0.06
8	23.52	5.80	4.62	125.50 ± 2.57	0.300 ± 0.011	-11.77 ± 0.93	99.02 ± 0.05
9	18.74	3.625	3.08	141.07 ± 1.44	0.299 ± 0.014	-12.09 ± 0.53	98.73 ± 0.04
10	18.74	3.625	3.08	129.33 ± 6.14	0.351 ± 0.051	-10.52 ± 1.34	99.34 ± 0.00
11	18.74	3.625	3.08	120.99 ± 2.54	0.287 ± 0.016	-9.98 ± 0.82	98.42 ± 0.09

*Co-encapsulation of QUE and RES in the phospholipid bilayer.



Capítulo 5

Produto nanotecnológico de uma formulação lipossomal elástica para o tratamento da obesidade, lipoma, lipodistrofia e gorduras subcutâneas

PATENTES, DESENHOS INDUSTRIAIS, CONTRATOS, PROGRAMAS DE COMPUTADOR, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS, TOPOGRAFIA DE CIRCUITO INTEGRADO

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Nº 2147

28 de Fevereiro de 2012

SEÇÃO I

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Dilma Rousseff

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

Ministro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

Fernando Pimentel

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



PRESIDENTE

Jorge de Paula Costa Ávila

VICE-PRESIDENTE

Ademir Tardelli

CHEFE DE GABINETE

Josefina Sales de Oliveira

DIRETORIA DE COOPERAÇÃO PARA O

DESENVOLVIMENTO

Denise Nogueira Gregory

PROCURADORIA FEDERAL no INPI

Mauro Sodré Maia

DIRETORIA DE PATENTES

Julio César Castelo Branco Reis Moreira

DIRETORIA DE MARCAS

Vinicius Bogéa Câmara

DIRETORIA DE CONTRATOS, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS

E REGISTROS

Breno Bello de Almeida Neves

DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO

Leonardo de Paula Luiz

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Órgão Oficial do INSTITUTO NACIONAL DA

PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Lei nº 5648, de 11.12.70 art. 9º e decreto nº 68.104, de

22.01.71, art. 24

SEDE DO INPI

MV - Mayrink Veiga nº 9, Centro - CEP: 20090-910

PM - Praça Mauá nº 7, Centro - CEP: 20081-240

Tel.: PABX (21) 3037-3000

PROCURADORIA

MV - 22º andar

Tel.: (21) 3037-3731, 3037-3732

Fax: (21) 3037-9841

DIRMA - Diretoria de Marcas

MV - 25º andar

Tel.: (21) 3037-3528

Fax: (21) 3037-3247

DIRPA - Diretoria de Patentes

MV - 20º andar

Tel.: (21) 3037-3592, 3037-3715, 3037-3049

Fax: (21) 3037-3194

DICIG - Diretoria de Contratos, Indicações Geográficas e

Registros

PM - 12º andar

Tel.: (21) 3037-3646, 3037-3608, 3037-3648

Fax: (21) 3037-3175

DIRAD - Diretoria de Administração

MV - 3º andar

Tel.: (21) 3037-3114

DICOD - Diretoria de Cooperação para o Desenvolvimento

MV - 27º andar

Tel.: (21) 3037-3044

DIVISÕES REGIONAIS

BRÁSILIA

Chefe: Antonio Carlos Pereira Coelho

e-mail: direg-df@inpi.gov.br

SAS - Quadra 2, Lote 1/A

Brasília - DF - CEP: 70070-020

Tel.: (61) 3224-1114

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

CEARÁ

Chefe: Alberto Moreira da Rocha

e-mail: diregce@inpi.gov.br

Rua Doutor Mário Martins Coelho, nº 36

Aldeota - Fortaleza - CE - CEP: 60170-280

Tel.: (85) 3261-1372, 3261-1695

Fax: (85) 3268-1495

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

MINAS GERAIS

Chefe: José Renato Carvalho Gomes

e-mail: jrenato@inpi.gov.br

Avenida Amazonas nº 1.909

Santo Agostinho - Belo Horizonte - MG - CEP: 30180-002

Tel.: (31) 3291-5614, 3291-5623

Fax: (31) 3291-5449

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

PARANÁ

Chefe: Renee Fernando Senger

e-mail: diregpr@inpi.gov.br

Rua Marechal Deodoro, 344, 16º andar

Edifício Atalaia, Centro, Curitiba - PR

CEP: 80010-909

Telefone: (41) 3322-4411

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

RIO GRANDE DO SUL

Chefe: Maria Isabel de Toledo Andrade Cunha

e-mail: diregrs@inpi.gov.br

e-mail: bel@inpi.gov.br

Av. José de Alencar, 521 - Cobertura 902 - Bairro Menino

Jesus. Porto Alegre - RS - CEP: 90880-481

Telefone: (51) 3226-6909, 3226-6422, 3227-5886

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

SÃO PAULO

Chefe: Maria dos Anjos Marques Duso

e-mail: diregsp@inpi.gov.br

Rua Tabapuã, 41 - 4º andar - Itaim-Bibi

São Paulo - SP - CEP: 04533-010

Telefone: (11) 3071-3434, 3071-3433

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

REPRESENTAÇÕES E POSTOS AVANÇADOS

Acre

Responsável: Amoisio Severiano Freitas

Secretaria de Desenvolvimento Ciência e Tecnologia

BR-364, Km 5, Zona A - Setor 3 Lote "1-A" -

Distrito Industrial - Rio Branco/ Acre - CEP: 69.917-100

Tel./FAX: (68) 3229-6349, 3229-4259, 3229-5556

Horário de Atendimento: 8h às 12h

14h às 17h30

Alagoas

Responsável: Jarbas Agostinho dos Santos

Secretaria do Desenvolvimento Econômico

Av. Da Paz, N.1108 - Centro

Maceió /AL - CEP: 57022-050

Tel.: (82) 3315-1721, 3315-1719, 3315-1720

Horário de Atendimento: 8h às 16h30

Amapá

Responsável: Rosenilda Creuza Silva de Souza

Junta Comercial

Av. FAB, 1610 - Centro

Macapá/ AP - CEP: 68906-030

Tel.: (96) 3225-8650

Fax: (96) 3225-8654

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Amazonas

Responsável: Aliete Velloso da Silva

SEPLAN - Secretaria do Estado de Planejamento e

Desenvolvimento Econômico

Rua Major Gabriel, 1870 - Praça 14 de Janeiro

Manaus /AM - CEP: 69060-060

Tel.: (92) 2126-1235, 2126-1200

Bahia

Responsável: Flavio José Moreno

Rua Pedro R. Bandeira, 143 - 5º andar

Cidade Baixa - Salvador - Bahia

CEP: 40015-080

Tel.: (71) 3326-9597, 3242-5223

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Responsável: Isis Patrícia Motta

Av. Otávio Mangabeira, 6929 - Multi Shop Boca do Rio

CEP: 41715-000

Tel.: (71) 3281-4148

Horário de Atendimento: 8h às 16h30

Espírito Santo

Responsável: Edilamar Gorzaga

Rua Abigail do Amaral Carneiro, 191

Edifício Árabe - 3º andar - salas 312, 314 e 316

Enseada do Suã - Vitória - ES - CEP: 290055-907

Tel.: (27) 3235-7788

Fax: (27) 3315-9823

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Goiás

Responsável: Rosemar Rodrigues de Oliveira Marinari

JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DE GOIÁS

Rua 206 - Esquina 259 - Setor Universitário, Quadra 84, Lt.

5 à 8 Goiânia - GO CEP: 74640-310

Tel.: (62) 3202-2246, 3202-2262, 3261-4833 Ramal: 279

Horário de Atendimento: 8h às 18h

Maranhão

Responsável: Déa Lourdes Furtado de Oliveira

Secretaria de Estado da Indústria e Comércio

Av. Carlos Cunha s/nº - sala 210

Edifício Nagib Haickel - Calhau/ MA - CEP: 65065-180

Telefone: (98) 3235-8546, ramais 28 e 29

Horário de Atendimento: após às 13h

Mato Grosso

Responsável: Kenner Langner da Silva

Junta Comercial do Estado do Mato Grosso - JUSSEMAT

Av. Historiador Rubens de Mendonça, s/nº - CPA

Cuiabá/ MT - CEP: 78055-500

Tel.: (65) 3613-9520, 3613-9528

Horário de Atendimento: 8h às 12h

14h às 17h00

Mato Grosso do Sul

Responsável: Clenira Brandão de Souza

Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agrário, da

Produção, da Indústria, do Comércio e do

Turismo/SEPROTUR

Av. Desembargador José Nunes da Cunha-Parque dos

Poderes, Bloco 12 - CEP: 79031-310 - Campo

Grande/MS

Telefone: (67) 3318-5013

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Pará

Responsável: Paulo Fernando Campos Maciel

SEDECT - Secretaria Estado de Desenvolvimento Ciência

e Tecnologia

Av. Presidente Vargas, 1020 - Campina

Belém /PA - CEP: 66017-000

Telefone: (91) 4009-2534, 4009-2531

Horário de Atendimento: 8h às 13h

14h às 16h

Responsável: Francisco Montandon Guilhermino

SEFA - Secretaria Estadual da Fazenda

Av. Mendonça Furtado, 2797 - Fátima

Santarém /PA - CEP: 68005-020

Telefone: (93) 3063-5634

Horário de Atendimento: 8h30 às 13h

Paraíba

Responsável: Aline Nascimento Duarte

Secretaria de Turismo e Desenvolvimento Econômico

Rua Feliciano Cisne nº 50 - Jaguaribe

João Pessoa/PB - CEP: 58015-570

Telefone: (83) 3208-3922, 3208-3923, 3242-2545/2729

Horário de Atendimento: 12h às 16h30

Pernambuco

Responsável: Eduardo Andrade Bemfica

e-mail: bemfica@inpi.gov.br

Universitária Federal de Pernambuco - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Campus Universitário

Bairro - Engenho do Meio

Recife/PE - CEP: 50670-920

Telefone: (81) 3453-8145, 3271-1223

Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Piauí

Responsável: Eliane Fatima Assunção Lima Souza

Secretaria de Desenvolvimento Econômico e Tecnológico

Rua Rui Barbosa, nº 805 - Centro - Central-Fácil/SEBRAE

Telefone: (86) 3216-3000 ramal 1403

Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

(21) PI 1104833-6 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) GENERAL ELECTRIC COMPANY (US) (74) CAROLINA NAKATA Número de Protocolo 18110042713 em 03/11/2011 03:51(SP).	(22) 29/07/2011 (71) Ademir Silva de Gouvea (BR/PR) (74) Senior's Marcas e Patentes Ltda Número de Protocolo 15110001633 em 29/07/2011 12:10(PR).	(22) 04/11/2011 (71) SATURNO PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO FUTURO LTDA ME (BR/SP) (74) VALERIA CRUZ Número de Protocolo 18110042894 em 04/11/2011 03:20(SP).
(21) PI 1104834-4 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) JULIANO FANOEL MARRAS (BR/BA), FRANCO BACCIN (BR/SP) (74) BEERRE ASSESSORIA EMPRESARIAL LTDA Número de Protocolo 18110042651 em 03/11/2011 01:43(SP).	(21) PI 1104939-1 A2 2.10 (22) 29/07/2011 (71) Leonardo Cesar Ferreira (BR/PR) Número de Protocolo 15110001632 em 29/07/2011 10:37(PR).	(21) PI 1104953-7 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) BTP TECNO S.R.L. (IT) (74) SÍMBOLO MARCAS E PATENTES LTDA. Número de Protocolo 18110044694 em 18/11/2011 03:54(SP).
(21) PI 1104835-2 A2 2.10 (22) 25/11/2011 (71) ENGENE ENGENHARIA GENÉTICA LTDA (BR/SP) Número de Protocolo 18110045686 em 25/11/2011 12:21(SP).	(21) PI 1104940-5 A2 2.10 (22) 26/07/2011 (71) Andre Luiz Barcellos (BR/PR) (74) Marcos Antonio Nures Número de Protocolo 15110001601 em 26/07/2011 01:28(PR).	(21) PI 1104954-5 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) EDJAIR GOMES DA SILVA (BR/SP) (74) AGUINALDO MOREIRA Número de Protocolo 18110044595 em 18/11/2011 12:18(SP).
(21) PI 1104836-0 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) OTA TOMIO (AR) (74) JOSÉ CARLOS FERREIRA Número de Protocolo 18110042639 em 03/11/2011 01:08(SP).	(21) PI 1104941-3 A2 2.10 (22) 26/07/2011 (71) José Luiz de Lima Filho (BR/PE) Número de Protocolo 19110000196 em 26/07/2011 11:12(PE).	(21) PI 1104955-3 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) HYGINO FRACHETTI (BR/SP) (74) MODAL MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110044593 em 18/11/2011 12:14(SP).
(21) PI 1104837-9 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP), UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP (BR/SP), FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP (BR/SP) (74) MARIA APARECIDA DE SOUZA Número de Protocolo 18110042628 em 03/11/2011 12:37(SP).	(21) PI 1104942-1 A2 2.10 (22) 21/07/2011 (71) Bartolomeu Julio Barbosa (BR/PE), Edmilson de Azeredo Coutinho (BR/PE) Número de Protocolo 19110000193 em 21/07/2011 02:12(PE).	(21) PI 1104956-1 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) ARAGUASSÚ ÓLEOS VEGETAIS INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. (BR/MT) (74) SUL AMÉRICA MARCAS E PATENTES LTDA. Número de Protocolo 18110044619 em 18/11/2011 01:57(SP).
(21) PI 1104838-7 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) JOSÉ CARLOS CANDIDO RAMALHO (BR/SP) (74) SCORPIONS MARCAS E PATENTES S/C LTDA Número de Protocolo 18110042689 em 03/11/2011 03:34(SP).	(21) PI 1104943-0 A2 2.10 (22) 26/07/2011 (71) Vsevolod Myrmine (BR/PR) Número de Protocolo 15110001608 em 26/07/2011 02:46(PR).	(21) PI 1104957-0 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) GUILHERME RACZ LESCURA E OUTROS (BR/SP), GUILHERME RACZ LESCURA (BR/SP), JUSCELINA PINTO DE FREITAS COSTA (BR/SP), LUIS GUSTAVO MATOS DE OLIVEIRA (BR/SP) (74) LUCIENE BATISTA DE ALMEIDA Número de Protocolo 18110044614 em 18/11/2011 01:29(SP).
(21) PI 1104839-5 A2 2.10 (22) 25/11/2011 (71) MARCELO MONTEIRO DE BARROS (BR/SP) Número de Protocolo 18110045678 em 25/11/2011 11:44(SP).	(21) PI 1104944-8 A2 2.10 (22) 29/07/2011 (71) Neumirton Fernandes Vasconcelos (BR/CE) Número de Protocolo 13110000307 em 29/07/2011 03:26(CE).	(21) PI 1104958-8 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) ILARIO BOCALETTO (BR/SP) (74) BEERRE ASSESSORIA EMPRESARIAL LTDA Número de Protocolo 18110044653 em 18/11/2011 03:08(SP).
(21) PI 1104840-9 A2 2.10 (22) 25/11/2011 (71) MARCELO MONTEIRO DE BARROS (BR/SP) Número de Protocolo 18110045679 em 25/11/2011 11:52(SP).	(21) PI 1104945-6 A2 2.10 (22) 28/07/2011 (71) Germano Pisetta Júnior (BR/PR) Número de Protocolo 15110001631 em 28/07/2011 03:29(PR).	(21) PI 1104959-6 A2 2.10 (22) 24/11/2011 (71) WHIRLPOOL S.A (BR/SP) (74) CARINA S. RODRIGUES Número de Protocolo 18110045628 em 24/11/2011 04:22(SP).
(21) PI 1104841-7 A2 2.10 (22) 27/09/2011 (71) MAGNETI MARELLI S.P.A. (IT) (74) ADVOCACIA PIETRO ARIBONI S/C Número de Protocolo 18110037662 em 27/09/2011 04:01(SP).	(21) PI 1104946-4 A2 2.10 (22) 27/07/2011 (71) Julio Cesar da Cunha (BR/SC) (74) A Provincia Marcas e Patentes Ltda Número de Protocolo 15110001614 em 27/07/2011 11:23(PR).	(21) PI 1104960-0 A2 2.10 (22) 24/11/2011 (71) JOÃO RUTH (BR/SP) Número de Protocolo 18110045587 em 24/11/2011 03:57(SP).
(21) PI 1104842-5 A2 2.10 (22) 27/09/2011 (71) OPTICOS S.R.L. (IT) (74) ANTONIO MAURICIO PEDRAS ARNAUD Número de Protocolo 18110037683 em 27/09/2011 04:07(SP).	(21) PI 1104947-2 A2 2.10 (22) 27/07/2011 (71) Gilson Ruon (BR/SC) (74) Jean Carlo Rosa Número de Protocolo 15110001611 em 27/07/2011 11:00(PR).	(21) PI 1104961-8 A2 2.10 (22) 24/11/2011 (71) EUGENIO VICTOR FOLMANN (BR/SP) Número de Protocolo 18110045607 em 24/11/2011 04:13(SP).
(21) PI 1104843-3 A2 2.10 (22) 25/11/2011 (71) CETREL S/A (BR/BA) (74) TINOCO SOARES & FILHO LTDA Número de Protocolo 18110045760 em 25/11/2011 03:18(SP).	(21) PI 1104948-0 A2 2.10 (22) 28/07/2011 (71) Fundação Universidade de Brasília (BR/DF), Fundação Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA (BR/RS) Número de Protocolo 12110000581 em 28/07/2011 03:11(DF).	(21) PI 1104962-6 A2 2.10 (22) 24/11/2011 (71) SOUZA MEIRA & CIA LTDA-ME (BR/SP) (74) CLISSIE BAZAN CORRAL SILVA Número de Protocolo 18110045585 em 24/11/2011 03:56(SP).
(21) PI 1104936-7 A2 2.10 (22) 29/07/2011 (71) ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA (BR/PR) Número de Protocolo 15110001638 em 29/07/2011 02:53(PR).	(21) PI 1104949-9 A2 2.10 (22) 29/07/2011 (71) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (BR/CE) Número de Protocolo 13110000302 em 29/07/2011 10:52(CE).	(21) PI 1104965-0 A2 2.10 (22) 03/06/2011 (71) S90 Energias Renovaveis LTDA. (BR/SC) (74) Nilvan Paulo Mingurtanse Número de Protocolo 17110000708 em 03/06/2011 04:12(SC).
(21) PI 1104937-5 A2 2.10 (22) 20/09/2011 (71) Manuel Correia Ribeiro (BR/MS) Número do Aviso de Recebimento SZ972071690BR	(21) PI 1104950-2 A2 2.10 (22) 18/11/2011 (71) RODOLFO VASONE (BR/SP) (74) LOGOS MARCAS E PATENTES S/S LTDA. Número de Protocolo 18110044570 em 18/11/2011 11:00(SP).	(21) PI 1104966-9 A2 2.10 (22) 03/06/2011 (71) Artergrill Industria e Comércio de Grelhas e Espetos Ltda. ME (BR/SC) (74) Nilvan Paulo Mingurtanse Número de Protocolo 17110000719 em 03/06/2011 04:35(SC).
(21) PI 1104938-3 A2 2.10	(21) PI 1104952-9 A2 2.10	(21) PI 1104967-7 A2 2.10



< Uso exclusivo do INPI >



PI1104941-3

129

Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

1.2
1.3
1.4
1.5
1.8

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PRODUTO NANOTECNOLÓGICO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL ELÁSTICA PARA O TRATAMENTO DA OBESIDADE, LIPOMA, LIPODISTROFIA E GORDURAS SUBCUTÂNEAS

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

6.2
6.4
6.5
6.8

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	14 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	2 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	3 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Lista de Inventores				1 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 22 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

DADOS DOS INVENTORES

1. NOME: Pabyton Gonçalves Cadena



2. NOME: Nereide Stela Santos Magalhães



3. NOME: Maria do Carmo de Barros Pimentel



4. NOME: Valdinete Lins da Silva



5. NOME: Rafaela Batista da Silva Cordeiro



6. NOME: Marcela Araújo Pereira



PRODUTO NANOTECNOLÓGICO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL ELÁSTICA PARA
O TRATAMENTO DA OBESIDADE, LIPOMA, LIPODISTROFIA E GORDURAS SUBCUTÂNEAS

RELATÓRIO DESCRITIVO

5

Campo da Invenção

A presente invenção contempla formulações de lipossomas elásticos em escala nanométrica contendo como componentes ativos combinados o desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol e/ou seus complexos de inclusão com ciclodextrinas estabilizados em solução tampão para o tratamento de obesidade, lipoma, lipodistrofia e gorduras subcutâneas por via injetável sem a necessidade de remoção posterior desta gordura. Adicionalmente, esta invenção também apresenta métodos para a preparação destas formulações.

15

Antecedentes da Invenção

O acúmulo de gordura subcutânea pode ocasionar problemas tanto de ordem clínica quanto estética. Atualmente, existem diversos tratamentos disponíveis, mas normalmente envolvem métodos cirúrgicos bastante invasivos ou tratamentos com uma série de efeitos colaterais. Diante do exposto, a presente invenção propõe um produto inovador para a dissolução de gordura subcutânea com o efeito sinérgico de 2 fármacos ou mais fármacos, cujas atividades podem ser potencializadas pela presença do desoxicolato de sódio, o que evita a necessidade de posterior remoção desta gordura.

25

Várias doenças envolvem o acúmulo de gordura subcutânea, dentre elas a principal é a obesidade por ser um sério problema de saúde pública e também por estar implicada em uma série de doenças tais como a diabetes tipo II, hipertensão, doenças coronarianas e câncer, sendo esta caracterizada pelo aumento do tecido adiposo (YANG et al. 2008). Lipomas são neoplasias de células adiposas maduras

ocasionadas pelo acúmulo de tecido gorduroso que pode se estender por via intramuscular, normalmente são removidos de forma cirúrgica (Rotunda et al. 2005). A Lipodistrofia é ocasionada por terapia com antivirais devido aos seus efeitos colaterais, principalmente, em pacientes soropositivos e caracteriza-se pelo acúmulo anormal de gordura subcutânea (Avram et al. 2005). Finalmente, a gordura subcutânea pode apresentar-se como um problema estético de forma que diversos tratamentos são utilizados para a sua redução e/ou remoção. Dentre eles a lipoaspiração e a cirurgia clássica demandam grande tempo de recuperação, métodos invasivos podendo provocar sérias sequelas ou até mesmo levar o paciente a óbito.

Diante do exposto acima, um tratamento bastante usado na dissolução de gorduras subcutâneas é a utilização do desoxicolato de sódio, este é um dos componentes da injeção de fosfatidilcolina já patenteada (PI 04189639A, WO2008008468A2, WO2008066775A2) e do Lipostabil®. Inicialmente, o princípio ativo desta formulação era atribuído a fosfatidilcolina, mas Rotunda et al. (2004) observou que o desoxicolato de sódio administrado isoladamente possuía o mesmo efeito que a primeira. Este método utilizando injeções para a dissolução de gorduras subcutâneas é erroneamente conhecido como Mesoterapia, e foi desenvolvido na Europa para posteriormente ser difundido para os Estados Unidos e Brasil. Esta técnica foi inicialmente utilizada na remoção de celulite (BRYANT, 2004).

Certas patentes e artigos científicos apresentam a utilização do desoxicolato de sódio e/ou Lipostabil® para o tratamento de lipomas, lipodistrofia, obesidade e gorduras subcutâneas, mas estas formulações apresentam sérios efeitos colaterais como edema, eritema, dor, ardor ou sensibilidade no local de aplicação. Estas também não se apresentam na forma de lipossomas, ou como complexos de inclusão com ciclodextrinas, nem combinadas com flavonoides o que poderia reduzir estes efeitos colaterais.

O artigo científico publicado por Rittes et al. (2001) apresenta o uso da injeção de fosfatidilcolina (250 mg/5mL) para a dissolução de bolsas de gordura periorbitais sendo a pioneira neste tipo de tratamento com posterior uso da injeção de fosfatidilcolina (250mg/ 5mL) no tratamento de gordura subcutânea.

Os artigos científicos publicados por Rotunda et al. (2004) e Bechara et al (2006 e 2007) demonstram a utilização do Lipostabil® e do desoxicolato de sódio (Fosfatidilcolina 5%, desoxicolato de sódio 4,75%, álcool benzílico 0,9%, água 100mL) para o tratamento de lipomas onde houve uma redução de mais de 75% na área tratada, mas também observou-se uma série de efeitos colaterais como edema, coceira, eritema e queimaduras.

O artigo científico publicado por Salti et al. (2008) relata a administração de injeções subcutâneas de fosfatidilcolina/desoxicolato de sódio em 37 pacientes do sexo feminino portadoras de lipodistrofia onde observou-se uma redução de 91,9% da gordura local, mas também observou-se uma série de efeitos colaterais como dor durante a injeção, eritema, queimaduras, edema, coceira no local da injeção, tontura, mal estar e diarreia.

O artigo científico publicado por Rotunda et al. (2004) descreve uma formulação mais simples que o Lipostabil® para o tratamento de gordura subcutânea com a seguinte composição: Fosfatidilcolina (5% p/v), desoxicolato de sódio (4,75% p/v), álcool benzílico (0,9% p/v) e água (100 mL).

A patente PCT WO 2005/117900 A1 (2005) descreve a composição e método para a remoção não cirúrgica de gordura subcutânea utilizando detergentes farmacologicamente ativos. A formulação é composta de desoxicolato de sódio e fosfatidilcolina com injeção diretamente no local de tratamento sem a necessidade de remoção posterior da gordura.

A patente PCT WO 2006/007675 A1 (2006) descreve a composição de uma formulação usando agentes tensoativos (0,5-10%) como o ácido cólico e o ácido desoxicólico, álcool benzílico 0,3-1%, co-solvente tais como o glicol e o sorbitol (5-10%) e sua ação sobre a gordura subcutânea e flacidez da pele.

O artigo científico publicado por SCHULLER-PETROVIC et al. (2008) apresenta uma formulação baseada no medicamento Lipostabil®, este último utilizado para o tratamento de embolia gordurosa, para a dissolução de gordura subcutânea com a seguinte composição Fosfatidilcolina, (46,5 mg), Desoxicolato de sódio (25,3 mg),

Álcool benzílico (9 mg), Cloreto de sódio (3,6 mg), Hidróxido de sódio (2,53 mg), DL- α -Tocoferol (0,15 mg), Álcool etílico (3 mg) e Água (907,8 mg).

As patentes PCT WO 2008/008468 A2 (2008) e PCT WO 2008/066775 A2 (2008) descrevem composição, método e aparato para o tratamento de gordura subcutânea ou outras alterações do tecido adiposo que afetam a aparência da camada de pele sobrejacente propondo diversas combinações de concentrações entre fosfatidilcolina e desoxicolato de sódio, este último variando entre 22 e 42 mg/mL.

As ciclodextrinas podem estabilizar soluções supersaturadas de fármacos aumentando a solubilidade. Esta também aumenta a taxa de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade de fármacos. Ciclodextrinas são formadas de oligossacarídeos cíclicos consistindo de 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), 8 (γ -ciclodextrina) ou mais unidades de glicose unidas por ligações α -(1,4) (LOFTSSON E DUCHÊNE, 2007). Em solução aquosa possuem uma estrutura cilíndrica com exterior hidrofílico e interior hidrofóbico capaz de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas dentro de sua cavidade hidrofóbica, tais como fármacos, indicadores, pequenos ânions, ácidos carboxílicos, álcoois (TAWARAH e KHOURI, 2000). Estas moléculas ficam ligadas por forças intermoleculares não covalentes (DEL VALLE, 2004; BREWSTER e LOFTSSON, 2007). A literatura não apresenta formulações baseadas em desoxicolato de sódio complexado a ciclodextrinas para a dissolução de gorduras subcutâneas.

A patente US 20070071706 (2007) descreve formulações farmacêuticas para o tratamento de gordura subcutânea onde o autor propõe a utilização do desoxicolato como agente emulsificante e a ciclodextrina como agente para aumentar a permeabilidade de outros fármacos. Esta formulação não utiliza o complexo de inclusão desoxicolato de sódio/ciclodextrina, nem faz menção à utilização destes por via injetável.

Neste contexto, os lipossomas, um dos sistemas de liberação controlada de fármacos mais utilizados, podem ser caracterizados como vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou

vários compartimentos aquosos internos do meio externo podendo proteger o fármaco da luz e da degradação por outros processos. Podem ser usados como sistema transportador visando direcionar o fármaco para a célula alvo e evitar locais indesejáveis onde o fármaco exerça toxicidade. Estes podem se apresentar em escala nanométrica, uma área interdisciplinar de pesquisa e desenvolvimento que envolve a

5 manufatura, processamento e aplicação de substâncias ou dispositivos que possuem uma ou mais dimensões em escala nanométrica (TORCHILIN, 2005; MOZAFARI et al. 2008).

Uma grande vantagem dos lipossomas em escala nanométrica, com relação a

10 outros sistemas transportadores de fármacos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente, quando estes são formados de lipídeos pertencentes à família de lipídeos naturais. Além disso, 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

15 farmacológicos (BATISTA et al., 2007; FANG et al., 2006; FRÉZARD et al., 2005).

O desoxicolato de sódio pode ser utilizado como tensoativo aniônico na formação de lipossomas, estes são conhecidos como lipossomas elásticos ou transferossomas®, mas estas formulações nunca foram usadas na dissolução de gorduras, nem possuem fármacos encapsulados com esta aplicação, o desoxicolato de

20 sódio também não se apresenta na forma complexada com ciclodextrinas. A principal vantagem dos lipossomas elásticos é a sua deformabilidade e maior penetração no estrato córneo. Certas patentes e artigos científicos descrevem o processo de produção destas vesículas.

A patente PCT WO 2011/022707A1 descreve formulações lipossomais

25 compostas de um ou mais fosfolipídeos e um ou mais tensoativos não iônicos para o tratamento de desordens no metabolismo de ácidos graxos, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Esta patente caracteriza-se com transferossomas®, mas não possui o desoxicolato de sódio em sua composição.

O artigo científico publicado por Gillet et al. (2009) descreve o processo de preparação de lipossomas contendo a betametasona, um anti-inflamatório, encapsulada em lipossomas elásticos cujo tensoativo é o desoxicolato de sódio na proporção de 13% (m/m) para aplicação tópica. Este artigo demonstra que é possível
5 produzir lipossomas contendo o desoxicolato de sódio encapsulado, mas não apresenta seu uso com ciclodextrinas.

A patente US 6150500 (2000) descreve uma preparação para a aplicação de agentes terapêuticos dotados de estruturas de membrana, consistindo de transferossomas® em escala nanométrica ou micrométrica contendo fosfolipídeos
10 (0,1-30%) e tensoativos na proporção de 5:5:1 até 1:500 para atravessar barreiras naturais tais como a pele, o que não inclui aplicações por via subcutânea injetável. O autor sugere a incorporação de insulina nestes transferossomas® como aplicação.

Recentemente descobriu-se que flavonoides como a quercetina, resveratrol e genisteína possuem ação apoptótica e antiadipogênica em tecido adiposo. Estes
15 flavonoides não podem ser aplicados diretamente *in vivo*, pois são rapidamente metabolizados em mais de 90%, e possuem baixa estabilidade, sendo necessário a sua proteção pela incorporação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Alguns trabalhos científicos demonstraram a aplicação combinada dos flavonoides em questão, tais como o de Yang et al. (2008), que estudou os efeitos de
20 quercetina (100 μ M) e resveratrol (100 μ M) combinados em linhagens de células 3T3-L1 e observou um decréscimo na acumulação de lipídeos de $73,5 \pm 0,9\%$ e aumento na apoptose de $310,3 \pm 9,6\%$ maior que a utilização destes compostos isoladamente. Park et al. (2008) também estudou os efeitos combinados de quercetina (100 μ M), resveratrol (100 μ M) e genisteína (50 μ M) em adipócitos jovens e maduros (3T3-L1)
25 provocando apoptose. Não foi observado este efeito quando os compostos eram utilizados isoladamente.

A quercetina possui como mecanismo de ação sobre adipócitos o decréscimo do potencial de membrana pela redução da regulação de poli (ADP-Ribose) polimerase, bcl-2 e ativação da caspase 3, consequentemente iniciando um processo

de apoptose pela inibição da mitogênese celular. A quercetina também induz lipólise em adipócitos, pois é potente inibidora de fosfodiesterase, uma enzima que hidrolisa o AMPc com consequente inativação de proteínas quinases. Devido à inibição da atividade da fosfodiesterase há um aumento da lipólise no adipócito (Raylam et al., 2008).

Resveratrol pode reduzir a adipogênese e a viabilidade em pré-adipócitos. Estes efeitos não são apenas regulados pela redução de fatores de transcrição e enzimas, mas também por genes que regulam a função mitocondrial. Adicionalmente, resveratrol aumenta a lipólise e reduz a lipogênese em adipócitos maduros. O uso de resveratrol também tem mostrado a redução na síntese de lipídeos em fígado de rato e adipócitos 3T3-L1. Ele também inibiu a proliferação em pré-adipócitos dependentes de SIRT-1 e sinergicamente aumentou a produção de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) induzindo apoptose em adipócitos humanos. A diferenciação dos pré-adipócitos e a indução de vias metabólicas do metabolismo dos lipídeos incluem a expressão de genes específicos tais como PPAR γ , C/EBP α , proteínas de ligação-1c (SREBP-1c), sintases de ácidos graxos (FAS) e lipoproteínas, indicando que o resveratrol pode alterar a massa de gordura afetando diretamente as vias que envolvem a adipogênese (BAILE et al., 2011). O Resveratrol também altera a expressão de genes que modulam a função mitocondrial, pois ativa a nicotinamida adenina dinucleotídeo-dependente de acetilase SIRT1, uma das sete sirtuínas de mamíferos envolvidas na homeostase de glicose e no metabolismo lipídico (BAUR, 2010a; b; DAL-PAN et al., 2010; SZKUDELKA e SZKUDELSKI, 2010). Esta ativação da SIRT1 pelo resveratrol parece prevenir a obesidade ao induzir o metabolismo mitocondrial oxidativo de ácidos graxos e também diminuir a resistência à insulina em camundongos submetidos a uma dieta de alto valor calórico.

Certas patentes e artigos científicos já apresentaram o uso de formulações lipossomais e dos fármacos quercetina, resveratrol, mas com constituintes e aplicações diferentes das propostas nesta invenção além de não utilizarem o desoxicolato de sódio nem sua forma complexada a ciclodextrinas.

A patente PCT WO 2011/042482 A1 (2011) propõe o uso de polifenóis livres e em associação, incluindo pterostilbeno, quercetina e resveratrol, para o tratamento de diferentes tipos de câncer (pulmão, mama, próstata, tecido conjuntivo, osso, cérebro e músculos). O autor também apresenta a possibilidade de utilização de sistemas de liberação controlada tais como lipossomas, micropartículas, cápsulas, dendrímero, etc. Não há reivindicação de produtos em escala nanométrica.

A patente BR PI 0903103-0 A2 (2011) apresenta preparação de suplemento alimentar na forma de cápsulas ou comprimidos a base de queratina, quercetina e rutina a serem usados como compostos energéticos auxiliando nas atividades esportivas.

A patente PCT WO 2010/124540 A1 (2010) descreve a preparação de uma formulação de lipossomas elásticos contendo resveratrol (0,5-10%), fosfolípídeo (0,5-10%) e tensoativo (0,1-30%), sem a presença de quercetina e desoxicolato de sódio.

A patente PCT WO 2010/0006026 A2 (2010) descreve um método de controle da função renal através do uso de uma formulação por via oral ou parenteral a base de quercetina, vitamina C e vitamina B3 e opcionalmente ácido fólico como antioxidantes na proporção de 1:0.2-2.5:0.02-1, respectivamente. Esta formulação aumenta a filtração glomerular e reduz a atividade da creatinina quinase. Esta formulação não é caracterizada como um produto lipossomal nem possui resveratrol ou desoxicolato de sódio em sua composição.

A patente BR PI 0805667-6 A2 (2010) apresenta uma formulação com resveratrol encapsulado em lipossomas em escala nanométrica e/ou impregnado em prata. Este produto pode ser aplicado por via oral ou tópica e ainda na fabricação de medicamentos dermocosméticos e nutracêuticos.

A patente BR PI 0705319-3 A2 (2009) descreve processo de preparação para obtenção de complexo de inclusão de resveratrol e β -ciclodextrina com ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, cardioprotetora, neuroprotetora e/ou quimiopreventiva de câncer. Esta também não contém quercetina nem desoxicolato de sódio.

A patente US 20090104255 (2009) descreve uma formulação pro-lipossomal incorporada em comprimidos revestidos ou cápsulas para compostos policíclicos, aromáticos, antioxidantes ou anti-inflamatórios para protegê-los da degradação no trato gastrointestinal administrados por via oral. Dentre estes compostos são utilizados a quercetina e o resveratrol. A formulação lipossomal é composta de fosfolípidos tais como fosfatidilcolina e etanolamina, esfingosina e ceramidas, colesterol e estearilamina na sua composição, o que confere carga final positiva. Essa formulação apresenta uma desvantagem com relação à presente invenção, pois há uma interação entre a quercetina e estearilamina reduzindo a eficiência de encapsulação do fármaco.

A patente BR PI 0701220-9 A2 (2008) apresenta métodos de síntese de derivados da rutina e quercetina e reivindica composição cosmética e farmacêutica com esses compostos com função fotoprotetora à radiação UVA, UVB e UVC.

A patente PCT WO 2007/008548 A2 (2007) descreve formulações para uso sistêmico à base de flavonas, estilbenos, flavononas, isoflavonas, catequinas, chalconas, taninos ou antocianidinas e nicotinamidas para a prevenção de distúrbios metabólicos incluindo a obesidade. Dentre os compostos apresentados encontram-se a quercetina e o resveratrol com concentração maior ou igual a 200 mg e suas formas derivadas incluindo também preparações lipossomais furtivas (de longa circulação sanguínea) utilizando o PEG (1000-5000 Da, 5% mol/%) em escala nanométrica até micrométrica. A patente não apresenta os constituintes da formulação lipossomal. Estes lipossomas diferem dos propostos nesta invenção por serem de longa circulação (furtivos) diferente dos de ação locais e elásticos que possuem composição e método de produção mais simples, além disso, não apresentam o desoxicolato de sódio em sua composição como tensoativo ou fármaco. Ainda concentração de fármaco proposta é muito menor (1,2 mg/mL).

A patente PCT WO 2006/062544 A1 (2006) descreve uma formulação pró-lipossomal revestida com quitosana incorporados em comprimidos revestidos ou cápsulas contendo polifenóis, incluindo o resveratrol como agente anti-inflamatório e antioxidante. Esta não utiliza a quercetina em suas formulações e, consequentemente, não possui o efeito sinérgico com o resveratrol.

A patente PCT WO 2005/082407 A1 (2005) descreve a composição e método de produção de formulações tópicas a base de quercetina e resveratrol (2 a 75 μ M, 1:1) ou quercetina e genisteína para o tratamento de câncer oral. Esta formulação apresenta componentes ativos na proporção de 25-75% sendo o restante formado por excipientes.

A patente BR PI0405375 A (2004) descreve a aplicação de trans-resveratrol ou outros derivados estilbenos no tratamento de lipodistrofia ginóide. Segundo o qual o produto fitoterápico medicamentoso ou cosmético para uso tópico é aplicado em distúrbios do tecido conjuntivo adiposo subcutâneo, particularmente lipodistrofia ginóide ou celulite, onde uma ou mais substâncias presentes no produto em questão inibe a atividade de estrógenos no tecido subcutâneo; estas substâncias são em particular, bloqueadores totais ou parciais de receptores de estrógenos. O produto em questão não apresenta quercetina em sua composição nem se apresenta como fórmula lipossomal.

Diante do exposto acima, o uso de lipossomas elásticos contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol como componentes ativos e/ou seus complexos de inclusão por via subcutânea ou tópica poderá aumentar a eficácia do tratamento para obesidade, lipoma, lipodistrofia e gorduras subcutâneas diminuindo a toxicidade, através da redução da dose terapêutica, das propriedades anti-inflamatórias dos flavonoides e da liberação controlada do princípio ativo. Adicionalmente, pela primeira vez são combinados componentes com propriedades necróticas, apoptóticas e lipolíticas em um único sistema de liberação controlada de fármacos.

Descrição da Invenção

Lipossomas elásticos em escala nanométrica contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol e seus complexos de inclusão com ciclodextrinas foram preparados utilizando o método de hidratação do filme lipídico como se segue: Fosfatidilcolina e colesterol, em quantidades suficientes para formar um lipossoma, foram dissolvidos em uma mistura de solventes orgânicos. Estes foram posteriormente

evaporados formando um filme lipídico delgado. Posteriormente, este filme foi hidratado com um tampão produzindo lipossomas multilamelares. Finalmente, estes lipossomas foram sonicados formando lipossomas unilamelares (escala nanométrica). O desoxicolato de sódio e os fármacos quercetina e resveratrol, em quantidades
5 suficientes para serem bioativos, podem ser adicionados diretamente aos constituintes lipídicos ou dissolvidos no tampão de hidratação complexados a ciclodextrinas nas mesmas concentrações.

Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras de 1 a 5.

- 10 1. Estrutura do desoxicolato de sódio em sua forma ácida;
2. Estrutura química do desoxicolato em sua forma de sal de sódio;
3. Estrutura química da quercetina;
4. Estrutura química do resveratrol;
- 15 5. Esquema de produção dos lipossomas em sua escala nanométrica no qual fosfatidilcolina e colesterol formam um filme lipídico delgado, este é posteriormente hidratado por um tampão e sonificado para produzir lipossomas em escala nanométrica. Os fármacos podem ser adicionados diretamente no filme lipídico bem como no tampão de hidratação complexados a ciclodextrinas. Legenda: PC = Fosfatidilcolina, CH = Colesterol, CD =
20 Ciclodextrina, SDC = Desoxicolato de sódio, QUE = Quercetina, RES = Resveratrol, MLV = Vesícula multilamelar grande e SUV = Vesícula unilamelar pequena.
6. Esquema dos lipossomas produzidos em escala nanométrica com os fármacos na fase orgânica e ou complexados a ciclodextrinas no tampão de hidratação;
- 25 Uma modalidade preferida, conforme descrito na figura 5, descreve a preparação dos lipossomas elásticos em escala nanométrica. Na presente invenção, foi preferido utilizar como tampão de hidratação, o tampão fosfato de potássio em pH fisiológico com força iônica crescente à medida que maiores concentrações de

desoxicolato de sódio são usadas, pois melhorou a estabilização e também permitiu a produção de lipossomas com características físico-químicas adequadas. Adicionalmente, o tampão fosfato salina (PBS) também pode ser utilizado.

5 O fosfolípideo, fosfatidilcolina, naturalmente forma lipossomas em meio aquoso, mas estes não se apresentam em escala nanométrica, sendo necessária a utilização de técnicas específicas para o preparo.

O colesterol utilizado nas formulações possui como função o aumento da rigidez da bicamada lipídica aumentando sua estabilidade.

10 A ciclodextrina utilizada tem como função permitir a solubilização dos fármacos hidrofóbicos em meio aquoso (tampão de hidratação) para posterior incorporação aos lipossomas. A ciclodextrina utilizada nesta modalidade pode ser a hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Finalmente quando os fármacos são incorporados aos lipossomas tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa, complexados a ciclodextrinas, isto é caracterizado como co-encapsulação.

15 A concentração de desoxicolato de sódio (Figuras 1 e 2) utilizada nas formulações lipossomais é menor que a utilizada nas formulações derivadas do Lipostabil® (42 mg/mL) para reduzir os efeitos colaterais decorrentes da necrose imediata após a injeção ou aplicação. Adicionalmente, não é descartado o efeito benéfico de necrose nem de retração da pele após a aplicação, evitando a cirurgia
20 corretiva.

Devido à presença do desoxicolato de sódio houve uma redução na viscosidade para $0,35 \pm 0,01$ cp da suspensão lipossomal o que melhora seu uso na forma injetável. Adicionalmente a presença do desoxicolato de sódio confere propriedades elásticas às formulações lipossomais produzidas devido à redução na tensão superficial das
25 vesículas.

A associação de quercetina (Figura 3) e resveratrol (Figura 4) encapsulados em lipossomas elásticos em escala nanométrica pode promover um efeito sinérgico o que potencializa o efeito apoptótico e lipolítico, já bem documentado na literatura. A concentração encapsulada destes fármacos na presente invenção foi de até 23 vezes

maior que a relatada na literatura (100 μ M), a qual comprovadamente apresentou efeitos apoptóticos e lipolíticos em adipócitos humanos. Adicionalmente, a quercetina e o resveratrol devido ao seu potente efeito antiinflamatório podem reduzir efeitos colaterais provenientes de possíveis necroses. Finalmente, a genisteína, outro fármaco com propriedades lipolíticas e apoptóticas, pode ser adicionada as formulações.

O tamanho médio das vesículas nas formulações lipossomais foi de 150 nm sendo este compatível com o diâmetro das seringas utilizadas para injeção subcutânea e também para a permanência no local da injeção devendo ser maior que 100 nm.

A segunda modalidade é representada na figura 5 mostrando os diferentes tipos de lipossomas produzidos em escala nanométrica com os fármacos encapsulados na fase orgânica e/ou aquosa complexados a ciclodextrinas.

A tabela a seguir apresenta os resultados obtidos em uma série de formulações lipossomais elásticas produzidas demonstrando o tamanho das vesículas em escala nanométrica e as altas eficiências de encapsulação dos componentes ativos da formulação.

Tabela: Exemplos de formulações lipossomais elásticas produzidas

<i>Composição</i>	<i>Tamanho médio (nm)</i>	<i>Índice de polidispersão</i>	<i>Carga de superfície ζ (mv)</i>	<i>Eficiência de encapsulação (%)</i>
<i>Formulações com fármacos separados</i>				
PC-CH-SA-QUE	110,1 ± 9,3	0,347 ± 0,077	+25,93 ± 1,87	86,00 ± 5,20
PC-CH-QUE	124,9 ± 2,1	0,298 ± 0,022	-3,72 ± 1,37	97,30 ± 1,30
PC-CH-SA-CD-QUE	146,1 ± 5,6	0,298 ± 0,025	+22,86 ± 1,67	93,89 ± 1,76
PC-CH-CD-QUE	126,2 ± 1,4	0,272 ± 0,008	-10,01 ± 2,76	95,50 ± 0,58
PC-CH-SA-RES	118,8 ± 9,5	0,321 ± 0,046	+22,91 ± 1,46	96,43 ± 2,64
PC-CH-RES	142,5 ± 5,1	0,327 ± 0,019	-0,47 ± 0,00	98,28 ± 0,86
PC-CH-SA-CD-RES	120,7 ± 1,7	0,272 ± 0,049	+21,02 ± 1,40	93,75 ± 0,86
PC-CH-CD-RES	115,0 ± 14,3	0,337 ± 0,053	-6,95 ± 1,96	95,46 ± 1,92
PC-CH-SA-SDC	110,8 ± 13,4	0,324 ± 0,089	+21,68 ± 2,72	ND
PC-CH-SDC	134,7 ± 3,6	0,301 ± 0,095	-13,3 ± 3,50	ND
PC-CH-SA-CD-SDC	106,5 ± 10,8	0,320 ± 0,025	+20,99 ± 2,64	ND
<i>Formulações com fármacos combinados na fase orgânica e ou aquosa (Houve variação nas concentrações dos constituintes lipossomais)</i>				
PC ¹ -CH ¹ -SDC-QUE-CD:RES	128,3 ± 1,78	0,257 ± 0,017	-7,73 ± 0,68	92,26 ± 0,052
PC ³ -CH ¹ -SDC-QUE-RES	139,5 ± 10,64	0,305 ± 0,046	-8,29 ± 0,30	93,82 ± 0,18
PC ¹ -CH ³ -SDC-QUE-RES	133,6 ± 3,24	0,285 ± 0,016	-13,34 ± 1,36	93,92 ± 0,14
PC ³ -CH ³ -SDC-QUE-CD:RES	122,5 ± 10,78	0,284 ± 0,016	-5,68 ± 0,92	94,66 ± 0,083
PC ¹ -CH ¹ -CD:SDC-QUE-RES	131,5 ± 11,87	0,333 ± 0,095	-5,72 ± 1,16	93,34 ± 0,025
PC ³ -CH ¹ -βCD:SDC-QUE-CD:RES	164,5 ± 26,58	0,342 ± 0,103	-3,38 ± 2,31	92,56 ± 0,21
PC ¹ -CH ³ -CD:SDC-QUE-CD:RES	129,1 ± 1,89	0,274 ± 0,010	-7,35 ± 1,23	89,62 ± 0,75
PC ³ -CH ³ -CD:SDC-QUE-RES	133,3 ± 2,48	0,262 ± 0,022	-7,38 ± 1,15	91,18 ± 0,21
PC ¹ -CH ¹ -SDC-CD:QUE-RES	129,7 ± 2,48	0,251 ± 0,031	-16,69 ± 0,85	90,84 ± 0,70
PC ³ -CH ¹ -SDC-CD:QUE-CD:RES	129,4 ± 2,71	0,264 ± 0,025	-8,44 ± 1,29	88,17 ± 0,15
PC ¹ -CH ³ -SDC-CD:QUE-CD:RES	139,5 ± 3,42	0,268 ± 0,025	-8,54 ± 0,20	85,37 ± 0,41
PC ³ -CH ³ -SDC-CD:QUE-RES	135,9 ± 1,86	0,272 ± 0,015	-6,64 ± 0,69	95,59 ± 0,06
PC ¹ -CH ¹ -CD:(SDC-QUE-RES)	133,3 ± 2,03	0,248 ± 0,016	-6,28 ± 1,96	87,30 ± 0,82
PC ³ -CH ¹ -CD:SDC-CD:QUE-RES	138,2 ± 17,85	0,485 ± 0,050	-4,51 ± 1,60	90,45 ± 0,25
PC ¹ -CH ³ -CD:SDC-CD:QUE-RES	145,7 ± 36,12	0,293 ± 0,031	-6,03 ± 0,23	87,29 ± 1,15
PC ³ -CH ³ -CD:(SDC-QUE-RES)	123,6 ± 3,79	0,374 ± 0,038	-11,28 ± 0,99	77,41 ± 0,39
PC ² -CH ² -Fármacos-CD:Fármacos	130,0 ± 6,33	0,283 ± 0,057	-9,98 ± 0,93	89,41 ± 0,11
PC ² -CH ² -Fármacos-CD:Fármacos	133,3 ± 5,05	0,284 ± 0,038	-7,47 ± 0,80	93,58 ± 0,56
PC ² -CH ² -Fármacos-CD:Fármacos	130,1 ± 2,26	0,272 ± 0,012	-10,28 ± 0,98	92,85 ± 0,19
<i>Formulações com fármacos combinados com concentração variável</i>				
PC-CH ¹ -SDC ¹ -(QUE-RES) ¹	153,1 ± 11,25	0,401 ± 0,079	-7,29 ± 0,97	98,53 ± 0,270
PC-CH ³ -SDC ¹ -(QUE-RES) ¹	143,5 ± 4,87	0,278 ± 0,027	-5,27 ± 1,73	98,42 ± 0,120
PC-CH ¹ -SDC ³ -(QUE-RES) ¹	124,9 ± 8,41	0,443 ± 0,118	-12,23 ± 0,84	97,55 ± 0,067
PC-CH ³ -SDC ³ -(QUE-RES) ¹	123,4 ± 10,58	0,354 ± 0,116	-12,00 ± 1,31	98,60 ± 0,063
PC-CH ¹ -SDC ¹ -(QUE-RES) ³	142,0 ± 12,39	0,433 ± 0,089	-7,07 ± 0,37	99,50 ± 0,037
PC-CH ³ -SDC ¹ -(QUE-RES) ³	146,6 ± 14,32	0,486 ± 0,083	-7,75 ± 0,44	97,89 ± 0,016
PC-CH ¹ -SDC ³ -(QUE-RES) ³	149,4 ± 2,47	0,295 ± 0,011	-13,48 ± 0,25	97,49 ± 0,064
PC-CH ³ -SDC ³ -(QUE-RES) ³	125,5 ± 2,57	0,300 ± 0,011	-11,77 ± 1,25	99,02 ± 0,052
PC-CH ² -SDC ² -(QUE-RES) ²	141,1 ± 1,44	0,299 ± 0,014	-12,09 ± 0,53	98,73 ± 0,038
PC-CH ² -SDC ² -(QUE-RES) ²	129,3 ± 6,14	0,351 ± 0,051	-10,52 ± 1,34	99,34 ± 0,005
PC-CH ² -SDC ² -(QUE-RES) ²	120,9 ± 2,54	0,287 ± 0,016	-9,98 ± 0,82	98,42 ± 0,086

PC = Fosfatidilcolina, Ch = Colesterol, CD = Ciclodextrina, SDC = Desoxicolato de sódio, QUE = Quercetina, RES = Resveratrol e ND = Não determinado. ^{1,2,3} = Equivalente a concentrações crescentes.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos constituídos de fosfatidilcolina e colesterol em escala nanométrica com sais biliares e flavonoides bioativos
5 incorporados a fase orgânica e/ou seus complexos de inclusão com ciclodextrinas no tampão de hidratação;
2. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos em escala nanométrica segundo a reivindicação 1 onde a fosfatidilcolina e o colesterol formam um filme lipídico por
10 evaporação do solvente com sais biliares e/ou flavonoides, seguido de hidratação com tampão fosfato de potássio ou fosfato salina;
3. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos em escala nanométrica segundo a reivindicação 1 onde a fosfatidilcolina e o colesterol formam um filme lipídico por
15 evaporação do solvente, seguido de hidratação com tampão fosfato de potássio ou potássio salina contendo os sais biliares e flavonoides complexados a ciclodextrinas;
4. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos em escala nanométrica segundo a reivindicação 1 por co-encapsulação segundo reivindicações 3 e 4;
5. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos em escala nanométrica segundo a reivindicação 1 onde o sal biliar é o desoxicolato de sódio para a bioatividade
20 desta invenção ou ácido cólico e/ou outros sais biliares para outras bioatividades, encapsulados na fase orgânica e/ou complexado a ciclodextrinas no tampão de hidratação;
6. MÉTODO de preparação de lipossomas em escala nanométrica segundo a reivindicação 1 onde os flavonoides foram quercetina e resveratrol e/ou genisteína
25 encapsulados na fase orgânica e/ou complexados a ciclodextrinas no tampão de hidratação;
7. MÉTODO de preparação de lipossomas elásticos em escala nanométrica, segundo a reivindicação 1 onde existe a possibilidade de escalonamento industrial.

8. PRODUTO nanotecnológico a base de uma formulação lipossomal elástica injetável caracterizada por ser composto de fosfatidilcolina, colesterol, sal biliar, flavonoides e/ou seus complexos de inclusão com ciclodextrinas para o tratamento de obesidade, lipomas, lipodistrofia e gorduras subcutâneas com fins estéticos;

5 9. PRODUTO nanotecnológico a base de uma formulação lipossomal elástica injetável segundo a reivindicação 8, na qual o sal biliar é o desoxicolato de sódio;

10 10. PRODUTO nanotecnológico a base de uma formulação lipossomal elástica injetável segundo a reivindicação 8 onde os flavonóides são quercetina e resveratrol e/ou genisteína;

11. PRODUTO nanotecnológico a base de uma formulação lipossomal elástica injetável segundo a reivindicação 8 onde o tamanho das vesículas estão dentro da faixa de 100 a 400 nm adequada para formulações injetáveis e para permanência no local de aplicação;

15 12. PRODUTO nanotecnológico a base de uma formulação lipossomal elástica injetável segundo a reivindicação 8 onde as formulações podem ser utilizadas em sua forma líquida ou líofilo reidratado em água;

RESUMO

PRODUTO NANOTECNOLÓGICO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL ELÁSTICA PARA O TRATAMENTO DA OBESIDADE, LIPOMA, LIPODISTROFIA E GORDURAS SUBCUTÂNEAS. A presente invenção contempla um produto nanotecnológico de uma
5 formulação lipossomal elástica para o tratamento da obesidade, lipoma, lipodistrofia e gorduras subcutâneas utilizando o desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol como componentes ativos, sem a necessidade de posterior remoção desta gordura. Os fármacos citados já possuem ação comprovada contra adipócitos podendo ser
10 empregados por via injetável, além de uma inovadora utilização de forma combinada com seus efeitos sinérgicos para potencializar sua bioatividade.

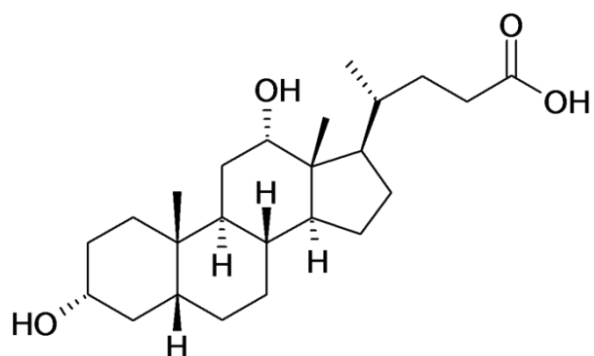
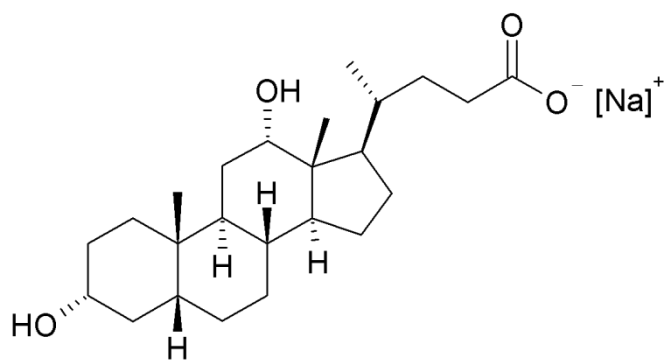
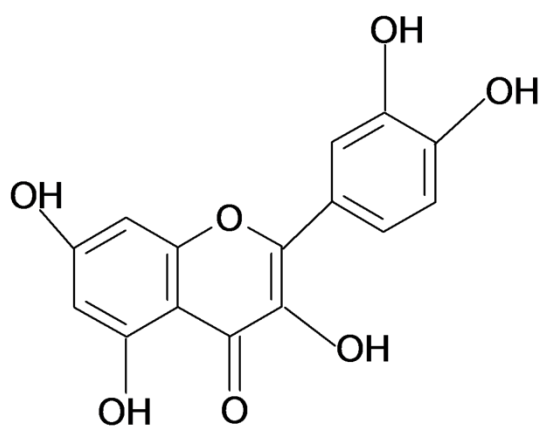
Figura 1**Figura 2****5 Figura 3**

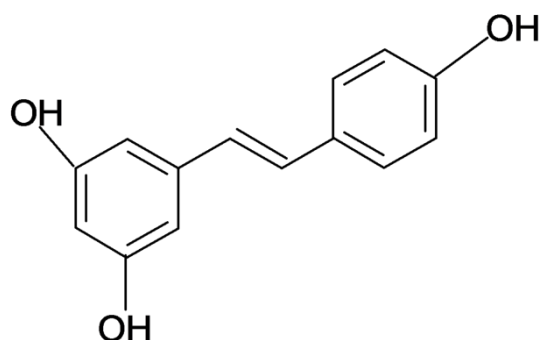
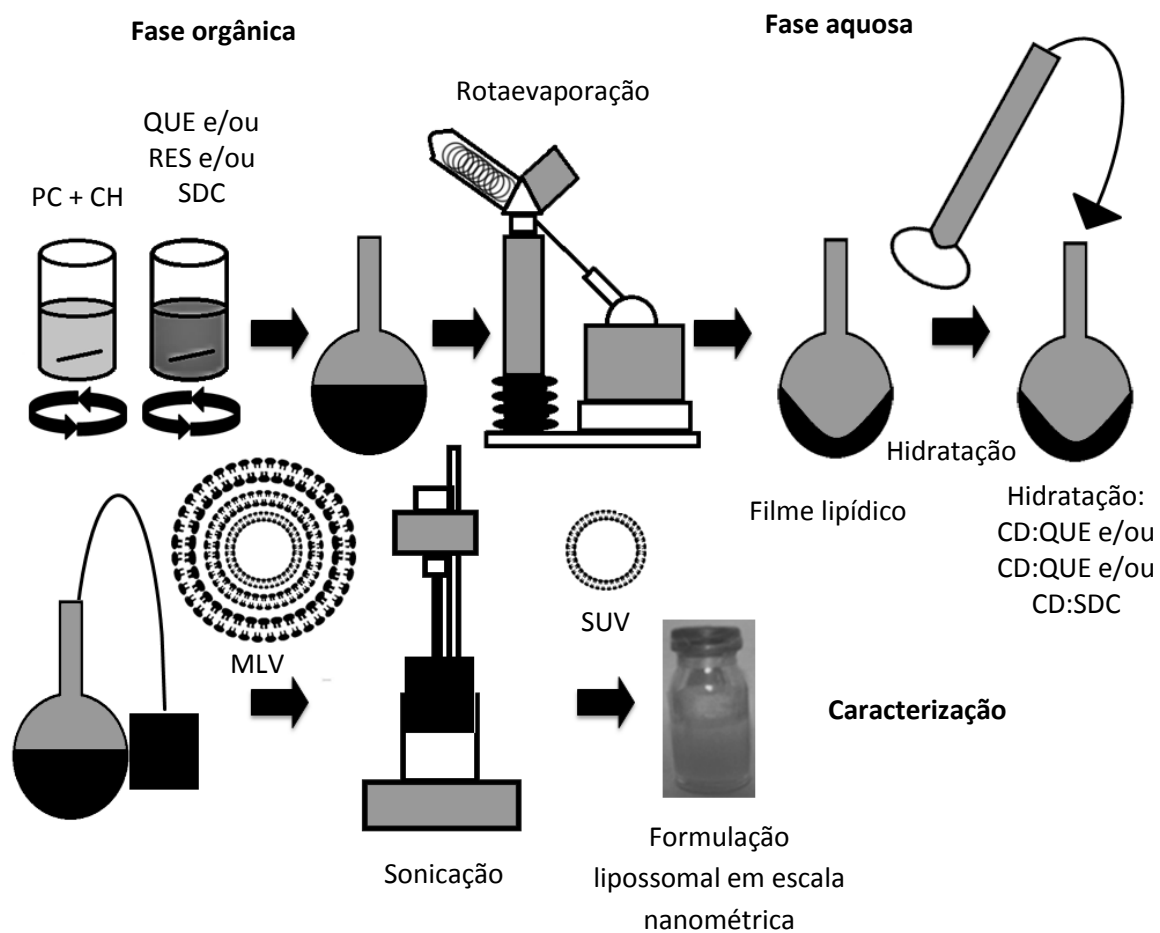
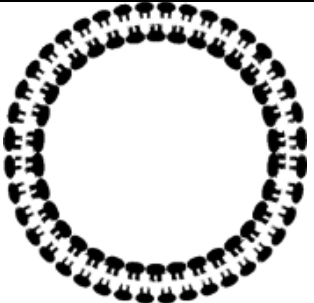
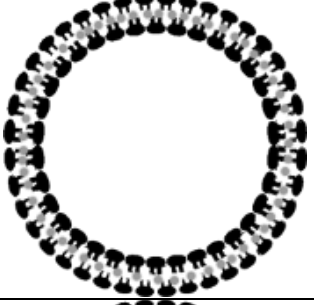
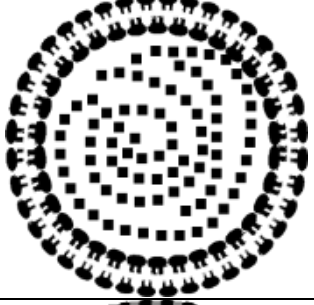
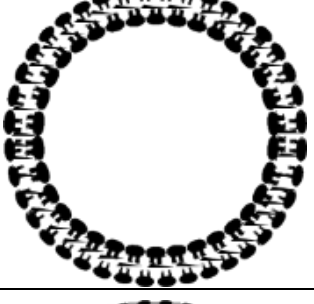
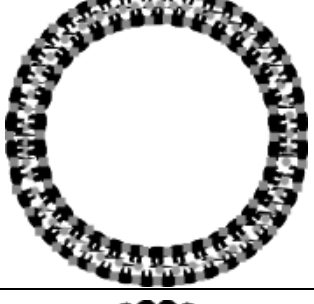
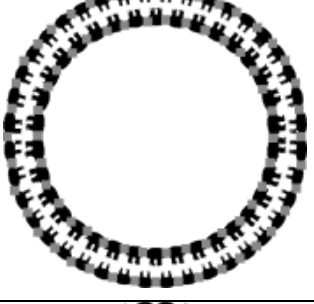
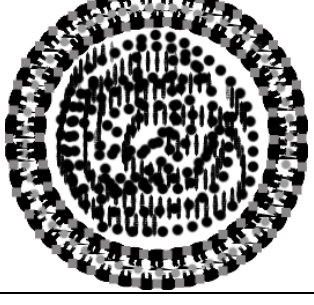
Figura 4**Figura 5**

Figura 6

	Esquema de um lipossoma Branco		Esquema de um lipossoma com resveratrol encapsulado na fase aquosa complexado a ciclodextrinas.
	Esquema de um lipossoma com quercetina encapsulada na fase orgânica.		Esquema de um lipossoma com o desoxicolato de sódio encapsulado na fase aquosa complexado a ciclodextrinas.
	Esquema de um lipossoma com resveratrol encapsulado na fase orgânica.		Esquema de um lipossoma com quercetina, resveratrol e desoxicolato de sódio encapsulados na fase orgânica.
	Esquema de um lipossoma com o desoxicolato de sódio encapsulado na fase orgânica.		Esquema de um lipossoma com quercetina, resveratrol e desoxicolato de sódio encapsulados na fase aquosa complexados a ciclodextrinas.
	Esquema de um lipossoma com quercetina encapsulada na fase aquosa complexada a ciclodextrinas.		Esquema de um lipossoma com os fármacos encapsulados na fase orgânica e complexados a ciclodextrinas na fase aquosa



Capítulo 6

Conclusões, Perspectivas e Anexos

1. CONCLUSÕES

A presente Tese procurou contribuir para o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e de baixo custo para a determinação de sais biliares em solução através de sua complexação com ciclodextrinas. Diante da formação destes complexos de inclusão com o desoxicolato de sódio, estes foram usados na produção de lipossomas contendo quercetina e resveratrol livres e também complexados a ciclodextrinas. Diante do exposto, foram observadas as seguintes conclusões:

- A reação de complexação competitiva utilizando ciclodextrina e fenolftaleína, um kit reagente, se mostrou efetiva para a determinação analítica dos ácidos biliares e de suas constantes de equilíbrio;
- Os parâmetros termodinâmicos mostraram altos valores negativos de ΔH indicando que o processo de inclusão é exotérmico e com contribuição das forças de van der Waals e ΔS foi positivo originado do relaxamento da camada de solvatação que envolvia os ácidos biliares e a cavidade da ciclodextrina. Em todos os casos ΔG foi negativo indicando que a formação dos complexos de inclusão foi espontânea;
- O método espectrofotométrico para a determinação dos ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico foi validado segundo metodologia proposta pela ANVISA e EMEA. O mesmo apresentou boa linearidade e precisão podendo ser aplicado para análise de matérias primas e das formulações farmacêuticas testadas ou que contenham os ácidos biliares propostos em sua composição;
- A reação de complexação competitiva também foi aplicada na construção de sensores químicos ópticos;
- Também foi possível a produção de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e quercetina ou resveratrol;
- Diferentes formulações lipossomais em escala nanométrica foram produzidas com o desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol incorporados na fase orgânica, fase aquosa - complexados a ciclodextrinas e em ambas as fases por co-encapsulação;
- Foi possível a produção de formulações lipossomais em escala nanométrica contendo desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol no mesmo lipossoma com tamanho entre 100 e 200 nm, PDI de $\approx 0,3$, potencial zeta negativo e eficiência de encapsulação maior que 90%;
- Devido à alta eficiência de encapsulação obtida com a encapsulação de QUE a RES na fase orgânica pela otimização por planejamento fatorial, optou-se por não utilizar

complexos de inclusão com ciclodextrinas nas próximas formulações para reduzir o custo de produção dos lipossomas;

- As micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura apresentaram lipossomas com morfologia esférica, com tamanho em escala nanométrica e sem agregação.
- As formulações lipossomais desenvolvidas apresentaram tamanho maior que 100 nm, o que poderá possibilitar a permanência no local de aplicação, também possuem tamanho compatível com o calibre de agulhas hipodérmicas para serem injetáveis.
- Houve liberação controlada de quercetina e resveratrol por mais de 50 horas a partir dos lipossomas e em ambos os casos, houve liberação de mais de 96% do fármaco nananoencapsulado;
- Na melhor formulação produzida, quercetina e resveratrol foram co-encapsulados para permitir um efeito sinérgico de ambos os fármacos em uma futura utilização dos lipossomas;
- As formulações lipossomais elásticas produzidas são adequadas para a injeção subcutânea, proporcionando assim uma nova estratégia para redução de gordura subcutânea.

2. PERSPECTIVAS

1. Artigos em produção:
 - 1.1. Uma revisão sistemática e meta-análise estão sendo realizadas para estudar os efeitos do desoxicolato de sódio na dissolução de gorduras localizadas;
2. Estudo experimental em desenvolvimento:
 - 2.1. A presença do desoxicolato de sódio, quercetina e resveratrol na mesma formulação lipossomal pode interferir na liberação controlada de cada um destes fármacos; desta forma a influência sobre a cinética de liberação está sendo avaliada;
 - 2.2. Os ensaios de estabilidade longa duração dos lipossomas contendo os fármacos encapsulados estão sendo realizados;
 - 2.3. A formulação lipossomal produzida, bem como seus constituintes separadamente será aplicada em adipócitos e tecido adiposo subcutâneo segundo metodologia de Schuller-Petrovic et al. (2008) e a citotoxicidade avaliada por MTT;
 - 2.4. O projeto será submetido ao comitê de ética animal da Universidade.
3. Sugestões para outros estudos:
 - 3.1. Analisar os efeitos da formulação lipossomal, dos complexos de inclusão com ciclodextrinas e flavonoides, bem como quercetina e resveratrol separadamente em adipócitos e tecido adiposo subcutâneo avaliando os possíveis efeitos necróticos e o grau de apoptose das células afetadas;
 - 3.2. Realizar estudos *in vivo* em ratos sob dieta normal e hipercalórica para observar a eficácia da formulação lipossomal sobre a gordura subcutânea e monitorar diversos parâmetros bioquímicos e fisiológicos de forma aguda – 1 administração seguida do sacrifício no dia seguinte e crônica – 3 administrações por 30 dias seguidos de sacrifício no dia seguinte.

3. ANEXOS

ANEXO A - Resumos publicados em anais de congressos

CADENA, P. G., PEREIRA, M.A., CORDEIRO, R.B.S., CAVALCANTI, I.M.F., BARROS NETO, B., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Encapsulation of quercetin and resveratrol in liposomes: A fractional factorial design study. 3rd Pharmaceutical Sciences for Future of Medicines, v. 3, 2011, Prague - Czech Republic.

CADENA, P. G., PEREIRA, M.A., CORDEIRO, R.B.S., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Nanoencapsulation of Quercetin and Resveratrol into Liposomes for Clinical Applications. XL Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, v. 40. Foz do Iguaçu – PR.

PEREIRA, M.A., CADENA, P. G., CORDEIRO, R.B.S., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Nanoencapsulation of resveratrol in sodium deoxycholate liposomes. XL Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, v.40, Foz do Iguaçu - PR.

CORDEIRO, R.B.S., CADENA, P. G., PEREIRA, M.A., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Simple HPLC Methods to Determine Quercetin and Resveratrol into Liposomes. XL Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, v.40, Foz do Iguaçu - PR.

CADENA, P.G., PIMENTEL, M.C.B., ARAUJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L. Colorimetric method for ursodeoxycholic acid (UDCA) determination: Kit reagent or optical sensor. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, v.39, Foz do Iguaçu - PR.

CARVALHO, P. O., SANTOS, J. G. N., CADENA, P. G., SILVA, V.L., SILVA, M. P. C., PIMENTEL, M.C.B. Spectrophotometric detection of caffeine by indicator cyclodextrin inclusion complex. V Jornada científica do LIKA, 2009, Sinater 2009, v.1, Recife – PE.

SANTOS, J. G. N., CARVALHO, P. O., CADENA, P. G., SILVA, V.L., PIMENTEL, M.C.B., SILVA, M. P. C. Use of cyclodextrin inclusion complexes for biomolecule determinations. V Jornada científica do LIKA, 2009, Sinater 2009, v.1, Recife – PE.

CADENA, P. G., OLIVEIRA, E.C., ARAUJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L. Spectrophotometric determination of ursodeoxycholic acid (UDCA) by β -cyclodextrin-phenolphthalein inclusion complex. XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, v. 38, Águas de Lindóia-SP

CADENA, P. G., SANTOS, J. G. N., ARAUJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L. Validation of a spectrophotometric method for deoxycholic acid determination in pharmaceuticals. 21st International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2009, v.21, Orlando – USA.

ANEXO B - Resumos expandidos publicados em anais de congressos

CADENA, P. G., PIMENTEL, M.C.B., PEREIRA, M.A., CORDEIRO, R.B.S., PADILHA, R. J. R., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Development of elastic liposomes for nanoencapsulation of quercetin and resveratrol. 8 World Meeting on Pharmaceutics, 2012, v. 8, Istambu – Turquia (Trabalho aceito).

CADENA, P. G., PEREIRA, M.A., CORDEIRO, R.B.S., CAVALCANTI, I.M.F., BARROS NETO, B., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L., SANTOS-MAGALHÃES N.S. Experimental design for coencapsulation of quercetin and resveratrol into sodium deoxycholate liposomes. 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, v.8, Ribeirão Preto – SP.

SILVA, C. M. B., SILVA, E. P. C., MATIAS, G. A., SANTOS, L. L., SILVA, N. E. R. E., COSTA, T. L., SILVA, R. P., CADENA, P. G. Fisiologia comparada dos vertebrados e sua abordagem em livros didáticos de biologia. X Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão (JEPEX 2010), 2010, v. 10, Recife – PE.

CADENA, P. G., ARAUJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L. Determinação das constantes de equilíbrio (K_c) e de estabilidade dos complexos de inclusão formados com a β -Ciclodextrina. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, v. 32, Fortaleza – CE.

CADENA, P. G., ARAUJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M., PIMENTEL, M.C.B., LIMA FILHO, J.L., SILVA, V.L. Estudo dos parâmetros termodinâmicos dos complexos de inclusão entre a β -Ciclodextrina e os ácidos desoxicólico e ursodesoxicólico. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, v. 32, Fortaleza – CE.

Lipids

Instructions to authors

1 Legal Requirements

The author(s) guarantee(s) that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright owner, the American Oil Chemists' Society; that the rights of third parties will not be violated, and that neither the AOCS nor the publisher will be held legally responsible should there be any claims for compensation. Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors. You will be asked to sign the copyright transfer statement after receipt of your accepted manuscript at Springer.

2 Open Choice Publication

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular 'subscription-based' article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication, or articles will be published as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

3 Editorial Procedure

Papers must present scientific results that are essentially new, have not been published previously, and are not intended

for publication elsewhere. They have to be written in English using either American or British spelling throughout, although the use of American spelling is preferred. Authors who have difficulty with English should obtain the assistance of colleagues more proficient in the language, e.g., in the English departments of their universities, in writing their manuscripts. All manuscripts are evaluated by the Editor-in-Chief prior to being assigned for peer review. Authors are required to submit the names and e-mail addresses of at least four individuals to serve as potential reviewers. Authors should submit their manuscripts to the Editorial Office online to facilitate even quicker and more efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times.

Please log directly onto
<http://mc.manuscriptcentral.com/lipids>
Upload your manuscript following the on-screen instructions.

Support:

If you face any problems while submitting your manuscript, please contact:
Manuscript Central: Support@ScholarOne.com

Papers that do not conform to the journal norms may be returned to the authors for revision before being considered for publication.

The author is responsible for the accuracy of the references.

Following review, all manuscripts requiring revision must be submitted in revised form within 3 months of receiving the decision letter. In extreme circumstances, authors may request, in writing, an extension of the deadline to complete their revisions by contacting the Editor-in-Chief. Manuscripts not returned within the 3 month period will be considered withdrawn. All decisions regarding rejected manuscripts are final. Rejected manuscripts will not be returned to the authors (except for original illustrations).

4 Manuscript Preparation

General Remarks *Lipids* is a journal of the American Oil Chemists' Society that publishes high-quality peer-reviewed papers and invited reviews in the general area of lipid research, including chemistry, biochemistry, clinical nutrition, and

metabolism. In addition, *Lipids* publishes papers establishing novel methods for addressing research questions in the field of lipid research.

Use of Animals in Research All studies involving use of vertebrate animals need to be approved by the authors' institution's Animal Care and Use Committee and conform to accepted standards. The protocol number for the study and clear statement of its approval by the authors' institution must be contained in the *Materials and Methods* section. Failure to do so will result in rejection of the manuscript without review.

Use of Human Subjects in Research All studies involving human subjects must be approved by the authors' institution's Institutional Review Board and must conform to accepted international standards and follow the Declaration of Helsinki. It must be clearly stated that written, informed consent by the subjects was given prior to their participation in the study. The protocol number for the study and clear statement of its approval by the authors' institution must also be contained in the *Materials and Methods* section. Failure to do so will result in rejection of the manuscript without review.

Types of Manuscripts Manuscripts may be submitted for publication as *Articles*, *Method Articles (Methods)*, *Communications*, *Reviews*, or *Letters to the Editor*. *Articles* are full-length manuscripts that are in-depth accounts of comprehensive studies and contain the major parts of a paper described in detail below, e.g. Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. *Communications* are concise and complete accounts of significant findings of a more limited scope and often have combined Results and Discussion sections. The total length of a *Communication* cannot exceed 1,500 words. *Communications* are considered using the same review standards as those for *Articles*; preliminary data are not acceptable and fragmentation of related results into several reports is strongly discouraged. *Letters to the Editor* are intended for discussion or reinterpretation of published data as well as for presentation of novel hypotheses. Manuscripts focused on the development of new methodology in the area of lipid biochemistry and lipid chemistry that are intended for publication in the

Methods section should be identified as such and are permitted to have a combined Results and Discussion section. *Lipids* publishes invited review articles on timely topics and authors who desire to submit an uninvited review article must first consult with the Editor-in-Chief before submitting a Review. Note that all manuscripts are subject to copy editing following their acceptance and prior to publication.

Nomenclature Authors are required to follow agreed upon recommendations of nomenclature and to strive for uniformity. Excessive use of acronyms is discouraged. Trivial names often are shorter and more commonly understood, but they may be used only after being introduced together with the systematic names. Valuable

guidance in the selection of accepted nomenclature is provided in the *Recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)* and of the IUB Commission of Editors of Biochemical Journals (CEBJ). Specific recommendations on lipid nomenclature were published by CBN in *Lipids* 12, 455–468 (1977).

Recommendations on the nomenclature of steroids can be found in *Biochemistry* 8, 2227–2242 (1969) and 10, 4994–4995 (1971). A compendium of relevant CBN and CEBJ documents [see also *J. Biol. Chem.* 261, 11 (1986)] was published in 1978 as *Biochemical Nomenclature and Related Documents* by CEBJ. Reprints of individual documents and advice on nomenclature use may be obtained gratis from the Director, Office of Biochemical

Nomenclature, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, P.O. Box Y, Oak Ridge, TN 37831, USA, phone +1-615-574-0808. General guidance on nomenclature also can be found in *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 6th edn., 1994, published by the Council of Biology Editors, Inc., Bethesda, MD 20814, USA.

Accepted Abbreviations The following is a list of acceptable abbreviations for many major lipids commonly referred to in *Lipids*. Although standard number-based nomenclature for fatty acids is preferable, the use of three-letter nomenclature is also acceptable. For phospholipids, the Lipid MAPS abbreviations are not acceptable, e.g. PE, PI etc..

Fatty acids

PAM	palmitic acid (16:0)
STA	stearic acid (18:0)
OLA	oleic acid (18:1n-9)
LNA	linoleic acid (18:2n-6)
ALA	alpha-linolenic acid (18:3n-3)
SDA	stearidonic acid (18:4n-3)
DGLA	dihomo-gamma-linolenic acid (20:3n-6)
ARA	arachidonic acid (20:4n-6)
EPA	eicosapentaenoic acid (20:5n-3)
DPAn-3	docosapentaenoic acid (22:5n-3)
DPAn-6	docosapentaenoic acid (22:5n-6)
DHA	docosahexaenoic acid (22:6n-3)
PUFA	polyunsaturated fatty acid(s)
MUFA	monounsaturated fatty acid(s)
SFA	saturated fatty acid(s)

Phospholipids (PL)

CerPCho	sphingomyelin
PtdIns	phosphatidylinositol
PtdIns-4-P	phosphatidylinositol 4-phosphate
PtdIns-4,5-P ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PtdSer	phosphatidylserine
PtdOH	phosphatidic acid
PtdGro	phosphatidylglycerol
Ptd ₂ Gro	cardiolipin
ChoGpl	choline glycerophospholipids (contains all 3 subclasses)
EtnGpl	ethanolamine glycerophospholipids (contains all 3 subclasses)
PtdCho	1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine or phosphatidylcholine
PtdEtn	1,2-diacyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine or phosphatidylethanolamine
PakCho	1- <i>O</i> -alkyl-2-acyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PakEtn	1- <i>O</i> -alkyl-2-acyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
PlsCho	1- <i>O</i> -alkenyl-2-acyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine or choline plasmalogen
PlsEtn	1- <i>O</i> -alkenyl-2-acyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine or ethanolamine plasmalogen

Sphingolipids

Cer	ceramide
CerPCho	sphingomyelin
CerGal	galactocerebroside
CerGlu	glucocerebroside
CerLac	lactosylcerebroside

Neutral Lipids (NL)

TAG	triacylglycerol(s)
DAG	diacylglycerol(s)
MAG	monoacylglycerol(s)
FFA	unesterified fatty acids

Sterols

C	cholesterol
CE	cholesteryl esters

Other chemical nomenclature should conform to the practice of Chemical Abstracts (see Index Guide, 1977, and Supplement 1977–1979). Authors are also referred to the *ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd ed., published by the

American Chemical Society (1997), 1155 Sixteenth St. N.W., Washington, DC 20036, USA.

Enzymes should be identified by the name and EC number recommended by the

Enzyme Commission. EC numbers should be given on first mention in the abstract and in the text. *Enzyme Nomenclature, Recommendations (1992) of the IUPAC-IUB*, is available from Academic Press, New York and London.

Isotopically labeled compounds should be identified by the isotope number given as superscript prefix to the atomic symbol of specific nuclides, e.g. [^{14}C]16:0. In compound names and abbreviations, the symbol of the isotope, in brackets, immediately precedes the name of the labeled part of the structure, e.g. [1- ^{14}C]16:0. Isotopic deuterium substitution can also be indicated according to *Chemical Abstracts* by the italicized, lowercase letter *d* following the compound name.

Chemical formulae and names as well as the names of organisms must be unambiguous and in accordance with the relevant international recommendations, cf. "IUPAC (1993) *Quantities, Units and Symbols, in Physical Chemistry*, 2nd edn. Blackwell Scientific, Oxford" and "ISO (1993) *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology*," Geneva. Trade names should be avoided: abbreviations and uncommon symbols should be explained at first mention.

Genus and species names should be in italics. The common names of animals should not be capitalized.

Drugs are named using their international (generic) name in the text, but the proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in the *Experimental Procedures* section.

DNA sequences must be submitted to GenBank (NCBI -National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) or to the EMBL Nucleotide Sequence Data Base (EBI -European Institute of Bioinformatics, Cambridge, UK) and accession numbers must be provided when the paper is accepted.

Proprietary substances and materials, and instruments. The correct designation and the manufacturer's name should be given. Where the manufacturer is not well known, the address should also be included.

Units and abbreviations. Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. liter (l) for volume].

Title Page The title page should include:

- The name(s) of the author(s) (an asterisk indicates the corresponding author)
- A concise and informative title that reflects the major outcome of the work (limited to 120 characters)
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s) where the work was done and for authors who have moved note the current address of those individuals
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract Each paper must have an abstract stating the objectives of the research, the experimental approach, the principal new results, and the major conclusions. Note that there are no divisions denoting these different parts in the abstract. All abstracts must be self-contained and suitable for reproduction by abstracting services. Abstracts for *Articles* can not exceed **250** words. Abstracts for *Communications* can not exceed **175** words. *Letters to the Editor* can be published with a very short abstract.

Key words Key words (6-10) that describe the subject matter of their manuscript need to be supplied after the Abstract for indexing purposes.

Abbreviations and Symbols All abbreviations and acronyms should be arranged alphabetically and need to be defined in an unnumbered footnote to the title. Authors are required to follow the conventions of the CBE style manual, 6th edition. An extensive compilation of recommendations and symbols appears each year in the first issue of *Journal of Biological Chemistry*. The use of acronyms and abbreviations should be limited to avoid confusion by the reader and all acronyms and abbreviations need to be defined after their first use in the manuscript. **Note that** neither acronyms nor abbreviations should be pluralized, e.g. PUFAs. Rather it is pluralized within the sentence structure; hence PUFA is either plural or singular based upon the sentence structure in which it is contained.

In addition, a list of **symbols** should follow the abstract if such a list is needed. Symbols must be written clearly. The international system of units (SI units) should be used. Do not confuse mathematical symbols with abbreviations. An excellent discussion of this topic is found on page 102 of above mentioned *ACS Style Guide*.

Lipids discourages the use of footnotes, however essential **footnotes** to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

The **Introduction** should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature. The last paragraph of the Introduction should contain information with regards to why the work was done, how it was done, the general outcomes of the work, and lastly the major impact of this work in the field. Although this section of the Introduction is similar to the abstract, it provides the reader a bridge between the review of the literature and the major thrust of the work contained herein.

The **Materials and Methods** section follows the Introduction and should provide enough information to ensure the reproducibility of the experimental work. Published methods should be referred to by literature citation of the original procedure and of pertinent published modifications to any method. Use of chemical formulas for simple agents is encouraged. Repetitive

descriptions of similar procedures should be avoided. The identity and purity of new compounds must be adequately documented. Spectral data and other physical characteristics of new compounds should be listed concisely. Ratios of components, such as mixtures of solvents, should be given by placing slashes between the component names and colons between the numerals, e.g., chloroform/methanol/water (65:25:4, by vol). This section should end with a section devoted to the statistical methods used to evaluate the data contained herein.

The **Results** section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided. Combination of the **Results** and **Discussion** can only be done in *Communications* and *Methods Articles* focused on presenting a new methodology. For all other *Articles*, the **Results** and **Discussion** must be separate sections in the manuscript.

The **Discussion** should be an interpretation of the results and a comparison of these results to what is reported in the literature. Authors are encouraged to discuss the significance of their work relative to other studies found in the literature as well as highlight potential mechanisms accounting for their observations. Authors should not merely recapitulate the results in the **Discussion** section.

Acknowledgements. This section should acknowledge individuals and entities that permitted the work in the manuscript to occur. These acknowledgements should be as brief as possible. Granting agencies and other funding sources should be recognized in this section and the names of funding organizations should be written in full.

Conflict of Interest. Authors are required to disclose any commercial or other associations that might pose a conflict of interest in connection with submitted material. All funding sources supporting the work and institutional or corporate affiliations of the authors should be acknowledged.

References. The list of references should include only works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. "Personal communications" or "Unpublished data" should only be mentioned in the text.

If available, the Digital Object Identifier (DOI) can be added at the end of the reference in question.

Example:

Ward J, Robinson PJ (2004) How to detect hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Eur Radiol* 14 : 29-36. DOI 10.1007/s00330-004-1450-y

A paper published online but not yet in print can be cited using the DOI :

Ward J, Robinson PJ (2004) How to detect hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Eur Radiol* DOI 10.1007/s00330-004-1450-y

References should be *numbered in the order in which they appear in the text and listed in numerical order*. Journal titles should be abbreviated according to CASSI (Chemical Abstracts Service Source Index) abbreviations for journal titles. The punctuation style for all references in the manuscript must follow the following examples:

Journal articles

Turner EM, Miller E, Smith DE (1975) Temperature and Diet Effects on Trout. *J Biol Chem* 250:108–115

Books

Mossoba MM, Kramer JKG, Brenna JT, McDonald RE (2006) *Lipid Analysis and Lipidomics: New Techniques and Applications*, AOCS Press Champaign

Multiauthor books

McMaster CR, Jackson RJ (2003) *Lipids: cellular glue or are they more than that?* In: Daum G (ed) *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*, Springer Berlin Heidelberg

Patents

Karnofsky GB, Hansotte RJ (1982) Process for Extracting Oleaginous Seed Materials. Particularly Cottonseed with Aqueous Alcohol. U.S. Patent 4,359,417

Webpage

National Institute of Health (accessed Jan. 2003) Menopausal Hormone Therapy. <http://www.nih.gov/PHTindex.htm>

Illustrations and Tables All figures (photographs, graphs, or diagrams) and tables should be cited in the text, and each numbered consecutively throughout. Lowercase letters (a, b, etc.) should be used to refer to figure parts in the text, Figure 1a and labeling of the figure itself should be in lowercase.

Size of figures. The figures should either match the width of the column (8.6 cm) or be 13.1 cm or 17.6 cm wide. The maximum length is 23.6 cm.

Figure lettering. Lettering should be consistent with *Lipids* format, i.e., terms such as *cis*, *trans*, *n*-hexane, *E. coli*, and the like should be italicized; spaces are used between numerals and dimensions (30 min, not 30min); subscripts or superscripts are reduced in size; and no blank spaces are left adjacent to slashes, e.g. chloroform/methanol. Mathematical variables should be italicized. Abbreviations in figures should conform to journal style and must be consistent with those used in the text [mL, h, min, s, d, *P*(probability), *g*(gravity), m.p., b.p., °C, kg, g, wt, wt%, vol, ca., vs., mol%].

Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the

main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Tables need to have a title and a legend explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for statistically significant values and other statistical data). Terms such as “trace amounts” should be defined, and statistical data treatment, if applicable, should be included.

Structural formulae and schemes should be prepared carefully. Structures should be numbered in boldface Arabic numerals. Within a scheme, the numbering should be done from left to right, line by line, independent of the sequence of mentioning in the text.

Equations Equations should be numbered sequentially by Arabic numbers in parentheses. The words equation and equations should be abbreviated Eq. and Eqs. followed by the number except at the beginning of a sentence.

5 Technical instructions for preparing your manuscript

Text and figures must be sent as separate files.

Text

1. Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text. Other style options:
 - for textual emphasis use italic types.
 - for special purposes, such as for mathematical vectors, use **boldface** type.
2. Use the automatic page numbering function to number the pages.
3. Do not use field functions.
4. For indents use tab stops or other commands, not the space bar.
5. Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.
6. Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.
7. Place any figure legends or tables at the end of the article.
8. Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text.

Data Formats Springer offers a template that can be used with Word 2003 and higher versions at *Springer.com*. See: Our services for: *Authors. Text*. Save as: RTF (Rich Text Format) or Microsoft Word compatible formats. Figures: EPS or TIFF.

Illustrations The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name (one file for each figure) should include the figure number. Figure legends should be included in the text at the end and not in the figure file.

- **Scan resolution:** Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 1200 dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.
- **Color illustrations:** Store color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.
- **Vector graphics:** Fonts used in the vector graphics must be embedded. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size.

6 Electronic Supplementary Material

Electronic supplementary material (ESM) for an article in the journal will be published in SpringerLink provided the material is:

- submitted to the Editor(s) in electronic form together with the paper and is subject to peer review
 - accepted by the journal's Editor(s)
- ESM may consist of
- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings
 - information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
 - large original data that relate to the paper, e.g. additional tables, illustrations (color and black & white), etc.

After acceptance by the journal's Editor(s), ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version

7 Proofreading

Authors should make their proof corrections on a printout of the PDF file or use the online correction facilities provided with the proof. They should check that the text is complete and that all figures and tables are included. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article. **The author is entitled to formal corrections only. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher.**

8 Offprints, Free copy

You will receive a PDF file of your article free of charge. Orders for offprints can be placed in your personal web access until your article will be printed in an issue. Access information regarding your personal website will be mailed to you after receipt of your manuscript at Springer.

<http://www.springer.com/journal/11745>

Lipids

Editor-in-Chief: E. J. Murphy

ISSN: 0024-4201 (print version)

ISSN: 1558-9307 (electronic version)

Journal no. 11745

Springer Berlin Heidelberg