



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MICHELY LAIANY VIEIRA MOURA**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS LIPOSSOMAIS CONTENDO  
DIOSGENINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTETOR**

**TERESINA**

**2016**

**MICHELY LAIANY VIEIRA MOURA**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS LIPOSSOMAIS CONTENDO  
DIOSGENINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOPROTETOR**

Dissertação, como requisito complementar, para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

**Orientador: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia P. de Oliveira**

**TERESINA - PIAUÍ  
2016**

**Universidade Federal do Piauí**  
**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde**

M929d Moura, Michely Laiany Vieira.  
Desenvolvimento de nanossistemas lipossomais contendo diosgenina e avaliação do efeito cardioprotetor / Michely Laiany Vieira Moura. – – Teresina, 2016.  
114 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.  
“Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim.”  
Bibliografia

1. Diosgenina. 2. Nanotecnologia. 3. Ação cardioprotetora. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615

**MICHELY LAIANY VIEIRA MOURA**

**Desenvolvimento de nanossistemas lipossomais contendo diosgenina e avaliação do efeito cardioprotetor**

Dissertação, como requisito complementar, para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

**Orientador: Prof.ª. Dra. Hercília Maria Lins Rolim**

**Co-Orientadora: Prof.ª. Dra. Aldeídia P. de Oliveira**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dra. Hercília Maria Lins Rolim (Orientadora)**

---

**Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (Membro Interno)**

---

**Prof. Dra. Eilika Andreia Feitosa Vasconcelos (Membro Externo)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA**

Prof. Dr. Pedro Vilarinho castelo Branco

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

## **LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

### **Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) - UFPI**

Responsável: Prof. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

### **Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada (NANOSFAR) – UFPI**

Responsável: Prof. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

### **Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE**

Responsável: José Luis de Lima Filho

Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901- Recife – PE

### **Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm) - UFPE**

Responsável: Nereide Stela Santos Magalhães

Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901- Recife – PE

### **Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais (NPPM) – UFPI**

Responsável: Aldeídia Pereira de Oliveira

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

**CHARLES CHAPLIN**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por representar meu porto seguro nos momentos em que os caminhos mostravam-se árduos, por ser a luz superior que me forneceu forças.*

*À Professora Dra. **Hercília Maria Lins Rolim**, minha orientadora, por ter me introduzido no universo da nanotecnologia, possibilitando a realização deste trabalho.*

*À Professora Dra. **Aldeídia Pereira de Oliveira** por transmitir com sabedoria, entusiasmo e paciência todos os conhecimentos necessários.*

*A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPI** pelos conhecimentos e vivências compartilhados e à **Profª. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães** da Universidade Federal do Pernambuco por ter cedido tão gentilmente a infraestrutura do Laboratório de nanotecnologia farmacêutica (LNFarm – LIKA) para formulação e caracterização dos lipossomas e a **Dra. Claudia Quintino da Rocha** da Universidade Estadual Paulista pela determinação do teor e eficiência de incorporação da Diosgenina por uso da Cromatografia líquida de ultra eficiência - UHPLC.*

*Aos demais colaboradores, por dedicarem tempo para que esta pesquisa fosse desenvolvida, **Carla Kelly e Marcelo Bezerra**, do Núcleo de Plantas medicinais UFPI, **Milena, Marcela e Rafaela** do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica UFPE.*

*Aos todos os meus colegas de mestrado, em especial **Alexandre Xavier e Kassia Karolline**, por contribuírem diretamente para que este trabalho fosse realizado e pelas experiências compartilhadas.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.*

*A **Universidade Federal do Piauí** pela possibilidade de concretização de mais um desafio.*

*Minha família, por me fornecer o suporte necessário para seguir nessa jornada.*

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 objetivos específicos .....	19
<b>3 REFERENCIAL TEORICO</b> .....	<b>20</b>
3.1 Diosgenina .....	20
3.2 Potenciais aplicações terapêuticas da Diosgenina.....	21
3.3 Ação da Diosgenina no sistema cardiovascular.....	23
3.4 Diosgenina e ação antioxidante .....	25
3.5 Nanotecnologia: Lipossomas .....	26
Referências .....	31
<b>4 CAPÍTULO I: Atividade cardioprotetora de uma saponina esteroideal: uma prospecção tecnológica e científica</b> .....	<b>39</b>
Resumo .....	40
Abstract.....	40
Introdução .....	41
Metodologia .....	43
Resultados e discussão .....	43
Desenvolvimentos atuais e futuros .....	54
Referências .....	56
<b>5 CAPÍTULO II: Desenvolvimento da formulação lipossomal contendo uma saponina esteroideal e avaliação da atividade cardioprotetora</b> .....	<b>61</b>
Resumo .....	62
Abstract.....	63
Introdução .....	63
Metodologia .....	66
Resultados e discussão .....	69
Conclusão.....	78
Referências .....	79

<b>5 CAPÍTULO III: Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> de uma formulação lipossomal contendo Diosgenina.....</b>	<b>84</b>
Resumo .....	85
Abstract.....	86
Introdução .....	86
Metodologia .....	88
Resultados .....	94
Discussão .....	99
Conclusão.....	105
Referências .....	106
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>112</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BVS	Biblioteca Virtual de Saúde
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva inibitória capaz de remover 50% do radical
CEEA	Comitê de ética em experimentação com animais
CFM	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CH	China
CIP	Classificação Internacional de Patentes
CK-MB	Creatino fosfoquinase
CT	Colesterol total
D	Diosgenina livre
DCV	Doenças cardiovasculares
DL	Lipossomas convencionais carregados positivamente contendo Diosgenina
DL <sub>PEG</sub>	Lipossomas peguilados contendo Diosgenina
DPPH	2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil
ED	Disfunção endotelial
EPM	Erro padrão da média
EPO	European Patent Office
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
HDL	High density lipoproteins
HMG-CoA	3-hidroxi-3-mathyl-glutaril-coenzima-A

IgE	Imunoglobulina E
iNOS	Óxido nítrico sintetase
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IRC	Insuficiência renal crônica
IRS-1	Receptor de insulina substrato – 1
ISPO	Isoproterenol
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Low density lipoprotein
LUV	Large unilamellar vesicles
mitoK <sub>ATP</sub>	Canais K <sub>ATP</sub> mitocondriais
MLV	Vesículas multilamelares
MRM	Multiple reaction monitoring
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido nítrico
NO <sup>•</sup>	Radical Nitrito
NPS	Nitroprussiato de sódio
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCT	Patent cooperation treaty
PDI	Índice de polidispersão
PE	Polietileno
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKG	Proteína quinase G

PZ	Potencial zeta
RES	Sistema retículo endotelial
SUV	Small unilamellar vesicles
TG	Triglicerídeos
TP	Tamanho de partícula
UHPLC	Efficiency Ultra Performance Liquid Chromatography
ULV	Vesículas unilamelares
USPTO	United States Patents and Trademark Office
WIPO	World Intellectual Property Organization
WSMC	Transdiferenciação osteocondrogênica das células do músculo liso vascular
ZTC	Estreptozotocina
β - CD	β - Ciclodextrina

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b>	Estrutura química da Diosgenina ( $3\beta$ -hydroxy-5-spirostene).	44
<b>Figura 2</b>	Patentes Depositadas nos bancos de dados tecnológicos de acordo com o código de classificação internacional.	47
<b>Figura 3</b>	Países que apresentaram patentes sobre a diosgenina. CH = China; WO = PCT.	50
<b>Figura 4</b>	Distribuição do número de patentes registradas (depositadas) nas ultimas décadas.	51
<b>Figura 5</b>	Distribuição dos artigos por ano de publicação nas bases de dados (PubMed, Science Direct e Bireme).	52

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b>	Efeito da Diosgenina livre (D) e Diosgenina lipossomal (DL) sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratas normotensas não anestesiadas. Valores para média e desvio padrão de cinco experimentos. * $p < 0,05$ : Teste t-Student.	77
<b>Figura 2</b>	Traços originais do efeito produzido por D e DL sobre a pressão arterial em ratas normotensas não anestesiadas.	78

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método de DPPH•	95
<b>Figura 2</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método de ABTS•+	96
<b>Figura 3</b>	Avaliação do potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal	97
<b>Figura 4</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método do radical $\text{NO}^\bullet$	98
<b>Figura 5</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e	99

Diosgenina lipossomal pelo método de TBARS

<b>Figura 6</b>	Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução do radical DPPH•	100
<b>Figura 7</b>	Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução do radical ABTS•+	101
<b>Figura 8</b>	Potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal	102
<b>Figura 9</b>	Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na inibição da formação do radical nitrito (NO <sup>•</sup> )	103
<b>Figura 10</b>	Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução da peroxidação lipídica em decorrência das formas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	104

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1</b>	Número de patentes depositadas nos bancos de dados tecnológicos INPI, USPTO, EPO e WIPO por palavras-chave.	46
<b>Tabela 2</b>	Patentes relatando as aplicações tecnológicas da Diosgenina com aplicação no sistema cardiovascular depositadas nos bancos de dados INPI, USPTO, EPO e WIPO.	47
<b>Tabela 3</b>	Publicações sobre Diosgenina e aplicação no sistema cardiovascular em bancos de dados Science Direct, PubMed e Biblioteca virtual de saúde, 2010-2015.	52

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b>	Características das formulações lipossomais contendo Diosgenina (DL e DL <sub>PEG</sub> ).	72
-----------------	--	----

**Desenvolvimento de nanossistemas lipossomais contendo Diosgenina e avaliação do efeito cardioprotetor. MICHELY LAIANY VIEIRA MOURA.** Orientadora: Hercília Maria Lins Rolim. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, UFPI, 2016.

## RESUMO

A presente dissertação apresentou como intuito desenvolver uma formulação farmacêutica lipossomal contendo Diosgenina, assim como, investigar a atividade farmacológica em modelos animais de sistema cardiovascular *in vivo* e verificar a atividade antioxidante *in vitro*. O primeiro capítulo apresentou como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre a Diosgenina, suas aplicações farmacêuticas e as perspectivas sobre a aplicação em doenças do sistema cardiovascular. Bases periódicas como ScienceDirect, PubMed e Biblioteca Virtual em Saúde, foram utilizados, bem como as bases tecnológicas do Escritório Europeu de Patentes, Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Escritório Americano de Patentes e Marcas Registradas e no banco de dados Brasileiro Instituto Nacional de Propriedade Industrial. As palavras-chave utilizadas foram Diosgenina, sistema cardiovascular, hipertensão, aterosclerose e dislipidemias e suas correlações em Inglês e Português, com publicações de janeiro de 2010 a junho de 2015. A partir dos estudos analisados a Diosgenina apresenta-se como uma molécula promissora para aplicação farmacológica no sistema cardiovascular. O segundo capítulo apresentou como objetivo encapsular a Diosgenina em lipossomas convencionais e peguillados, os quais foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas e tempo de estabilidade, estes resultados mostraram-se satisfatórios para utilização destes nanossistemas em testes experimentais *in vivo* e *in vitro*. Depois de verificado as adequadas condições de estabilidade e eficiência de encapsulação os lipossomas contendo Diosgenina foram utilizados para avaliar a ação no Sistema Cardiovascular em testes experimentais *in vivo*. No presente estudo os lipossomas contendo Diosgenina não apresentaram resposta hipotensora esperada nas doses utilizadas de 1, 2 e 4 mg/Kg (i.v.). Contudo, traz-se a perspectiva que com o aumento do rendimento de Diosgenina incorporada em nanossistemas lipossomais, a resposta hipotensora esperada possa ser verificada. O terceiro capítulo apresentou como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da Diosgenina livre (D) e de Diosgenina incorporada em nanovesículas lipídicas, denominada de Diosgenina lipossomal (DL) por meio da eliminação do radical livre estável DPPH•, ABTS•+, potencial redutor, radical nitrito e peroxidação lipídica (TBARS), assim como, determinar a concentração efetiva inibitória capaz de remover 50% desses radicais dos testes antioxidantes envolvidos nesse estudo. A análise dos resultados mostrou baixos percentuais de inibição dos radicais DPPH•, ABTS•+ e potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal, não mostrando diferença estatística entre ambos, quando comparado ao controle trolox. No entanto, a Diosgenina tanto na sua forma livre quanto na sua forma lipossomal apresentou significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico e ao radical nitrito, evidenciado pelo cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE<sub>50</sub>). Também é possível perceber que a forma nanocarreada exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada. Desta forma, se faz necessário avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* no sentido que esta formulação possa ser caracteriza ou não com atividade antioxidante e sua aplicação para uso em processos oxidativos.

**Palavras-chave:** Diosgenina, ação cardioprotetora, nanotecnologia, lipossomas, antioxidante.

**Development of Liposomal nanosystems containing Diosgenin and evaluating the cardioprotective effect. MICHELY LAIANY VIEIRA MOURA.** Advisor: Hercília Maria Lins Rolim. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Pharmaceutical Technology Center, UFPI, 2016.

## **ABSTRACT**

This thesis presented the intention to develop a pharmaceutical liposomal formulation containing Diosgenin, as well as investigate the pharmacological activity in animal models of cardiovascular system in vivo and verify the antioxidant activity in vitro. The first chapter introduced aimed at making a systematic review of the Diosgenin, their pharmaceutical applications and perspectives on the application in the cardiovascular system diseases. periodic basis as ScienceDirect, PubMed and Virtual Health Library were used as well as the European Office of the technological bases Patent Office, World Intellectual Property Organization, the Office US Patent and Trademark Office and the Brazilian database National Institute of Property Industrial. The keywords used were Diosgenin, cardiovascular system, hypertension, atherosclerosis and dyslipidemia and their correlations in English and Portuguese, with January 2010 publications June 2015. From the studies analyzed Diosgenin is presented as a promising molecule for pharmacological application in the cardiovascular system. The second chapter presented as objective encapsulate Diosgenin in conventional liposome and pegylated, which were characterized as their physicochemical properties and stability time, these results were satisfactory for use of nanosystems in experimental tests in vivo and in vitro. Once verified the proper conditions for stability and encapsulation efficiency liposomes containing Diosgenin were used to evaluate the action on the cardiovascular system in experimental tests in vivo. In the present study Diosgenin-containing liposomes showed no hypotensive response expected at dosages of 1, 2 and 4 mg/kg (i.v.). However, it brings up the prospect that with the increase of the yield Diosgenin incorporated into liposomal nanosystems, the hypotensive response expected can be verified. The third chapter introduced to evaluate the antioxidant potential in vitro free Diosgenin (D) and Diosgenin incorporated in nanovesicles lipid, called Diosgenin liposomal (DL) through the elimination of the stable free radical DPPH •, ABTS • +, potential reducer radical nitrite and lipid peroxidation (TBARS) as well as determining inhibitory effective concentration capable of removing 50% of these radicals antioxidants tests involved in this study. The results showed low percentage of inhibition of DPPH •, ABTS • + and potential reducer Diosgenin free and liposomal Diosgenin, showing no statistical difference between the two when compared to trolox control. However, diosgenin both in free form and in their liposomal form showed significant antioxidant potential across the lipid peroxidation by reactive forms associated thiobarbituric acid and the radical nitrite, evidenced by calculating their median effective concentrations (EC50). You can also see that the nanocarreada form exhibited greater antioxidant potential in relation to its isolation. Thus, it is necessary to evaluate the antioxidant capacity in vivo in the sense that this formulation can be characterized or not with antioxidant activity and its application for use in oxidation processes.

**Keywords:** Diosgenin, cardioprotective action, nanotechnology, liposomes, antioxidant.

## 1 INTRODUÇÃO

A Diosgenina é uma saponina esteróide que pode ser obtida de plantas do gênero *Dioscorea villosa*, *Costus speciosus* e *Trigonella foenum graecum*, apresentando-se com um dos principais constituintes bioativos regulando as funções fisiológicas. A Diosgenina tem sido indicada como tendo potencialmente várias aplicações práticas, uma vez que apresenta um impressionante perfil farmacológico, podendo ser utilizada no tratamento de diferentes patologias como hiperglicemia e hiperlipidemia (OKAWARA et al., 2013).

Na indústria farmacêutica têm-se estabelecido como material fonte para a produção de hormônios esteróides e utilizada na terapêutica de reposição hormonal em mulheres na menopausa por apresentar-se estruturalmente semelhante à progesterona e o estrogênio (OKAWARA et al., 2014; DIAS et al., 2007). E através de diferentes mecanismos apresenta atividade antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (PATEL et al., 2012). A Diosgenina como um fitoestrógeno é conhecida por apresentar ação anti-inflamatória, controle de dislipidemias e propriedades antioxidantes (RAJU; MEHTA, 2009).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Cada vez há maior evidência científica de que o estresse oxidativo desencadeia relevantes implicações sobre os mecanismos que culminam com o desenvolvimento da síndrome metabólica (BARBOSA et al., 2010). O excesso de radicais livres no organismo leva ao estresse oxidativo, o que pode estar associado às causas de doenças crônicas como, infarto do miocárdio, envelhecimento precoce e câncer (COSTA et al., 2013). As enzimas antioxidantes formam a primeira linha de defesa contra os danos no tecido cardíaco e um aumento do estresse oxidativo pode ser devido à depleção dos antioxidantes (CHEN et al., 2015).

A administração oral da Diosgenina é limitada devido à baixa solubilidade aquosa da molécula (0,7 ng/mL) e restrita pela biodisponibilidade oral absoluta. Administração oral de fármacos com baixa solubilidade aquosa e baixo perfil de dissolução resulta em incompleta absorção (OKAWARA et al., 2014). Segundo Chen et al., (2012), a solubilidade da Diosgenina diminui com o aumento da polaridade dos solventes alcoólicos. Uma opção adicional à administração oral seria a aplicação endovenosa de Diosgenina, no entanto como o fármaco é pouco solúvel em água, ele deveria ser solubilizado em etanol e injeções de álcool provocam irritações nos vasos sanguíneos, inviabilizando a técnica (CHEN et al., 2014).

Uma alternativa para transpor esta limitação seria a encapsulação da Diosgenina em nanossistemas carregadores de fármacos, a exemplo dos lipossomas. Lipossomas são

vesículas formadas por uma membrana concêntrica de fosfolipídios com centro aquoso, representam uma excelente forma de liberação controlada de fármacos devido sua flexibilidade estrutural variando suas características físico-químicas como o tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica. Devido sua biocompatibilidade são utilizados como ferramentas para liberação controlada de fármacos no sítio-alvo específico melhorando a farmacocinética e farmacodinâmica da molécula encapsulada (KOUDELKA et al., 2015; GUPTA et al., 2012).

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo caracterizadas como vesículas unilamelares pequenas - SUV (*small unilamellar vesicles*) e vesículas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Os carreadores de escala nanométrica têm mostrado bons resultados na encapsulação de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos. Os lipossomas são considerados excelentes plataformas para liberação de fármacos hidrofóbicos (carreados junto à bicamada lipídica) e hidrofílicos (veiculados no interior da vesícula aquosa), em particular apresentam tempo elevado no sangue facilitando a entrega do fármaco, de forma eficiente, para o seu sítio alvo-específico (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014; BATISTA et al., 2007).

No presente estudo a Diosgenina foi encapsulada em lipossomas convencionais carregados positivamente e lipossomas peguilados, os quais foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas, estabilidade e eficácia na encapsulação do fármaco. Desta forma foram avaliados os efeitos da administração endovenosa da formulação lipossomal contendo Diosgenina na modulação da função cardíaca, através da verificação da pressão arterial e frequência cardíaca, e foram realizados testes *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação farmacêutica lipossomal contendo Diosgenina, assim como, investigar a atividade farmacológica em modelos animais de sistema cardiovascular *in vivo* e verificar a atividade antioxidante *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica, através de busca nos bancos de depósitos de patentes e periódicos em nível nacional e internacional, da atividade cardioprotetora de uma saponina esteroidal.
- Encapsular a Diosgenina em nanocarreador vesicular do tipo unilamelar pequeno (SUV) com parâmetros de tamanho, homogeneidade, carga de superfície, elevados rendimento e taxa de encapsulação que sejam adequados para a realização de teste *in vivo*.
- Investigar a ação farmacológica de lipossomas contendo Diosgenina em modelos experimentais no sistema cardiovascular *in vivo*.
- Verificar o potencial antioxidante *in vitro* da Diosgenina lipossomal com ênfase nos protocolos de DPPH e ABTS, potencial redutor, radical nitrito e TBARS.

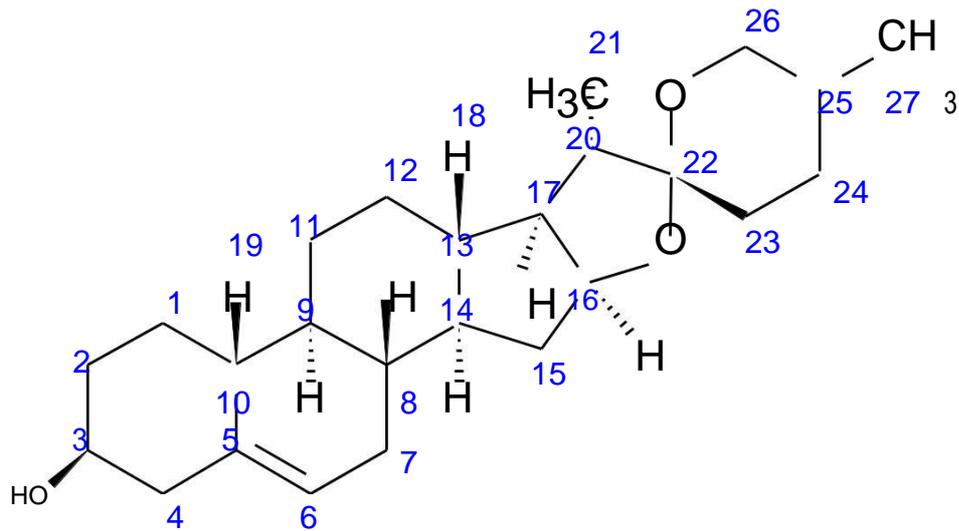
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Diosgenina

A Diosgenina, membro das saponinas esteroides, pode ser encontrada em algumas espécies vegetais, apresentando-se como um dos principais constituintes bioativos de plantas, nomeadamente, leguminosas comestíveis, bem como caracterizada nas sementes de *Trigonella foenum graecum Linn* e nas raízes de *Dioscorea villosa Linn*. As cadeias de açúcar das saponinas esteróides presentes na *Dioscorea*, quando do seu isolamento, sofrem hidrólise ácida, entre outras etapas, para produzir a Diosgenina (PATEL et al., 2012).

Dá-se o nome de saponinas (do latim “*sapon*” = sabão) a um grupo de glicoconjugados que se dissolvem na água, diminuindo a sua tensão superficial de modo que, ao agitar-se a solução, se forma uma espuma abundante e relativamente estável. A natureza da aglicona e a porção oligossacarídica da molécula da saponina contribuem, naturalmente, para as propriedades físico-químicas e biológicas desta molécula (WILLIAMS; GONG, 2007).

A estrutura química da Diosgenina consiste numa aglicona hidrófoba esteroide contendo um grupo hidroxilo e uma ligação dupla nas posições C-3 e C-5, respectivamente e tem seis anéis na sua constituição: A, B, C e D (sistema ciclopentanofenantreno, característico dos esteroides) e anéis E e F. Estes anéis E (tetrahydrofurano) e F (tetrahidropirano) fundem-se na posição C-22, formando uma estrutura espiral (**Figura 1**). Estes grupos funcionais, ligações e anéis são fundamentais na conversão estrutural da Diosgenina, originando outros compostos farmacologicamente ativos. Nas saponinas, nomeadamente as moléculas precursoras da Diosgenina, a natureza da aglicona e a porção oligossacarídica da molécula contribuem para as propriedades físico-químicas e biológicas, além disso, a conformação estrutural em C-5 e C-25 átomos de carbono se mostram importantes para a atividade biológica da Diosgenina (VINCKEN et al., 2007).



**Figura 1.** Estrutura química da Diosgenina.

Este fitoestrógeno possui estrutura semelhante à progesterona e ao estradiol, principal estrógeno produzido pelo ovário e é utilizada para síntese em escala industrial de diferentes hormônios esteroidais, incluindo progesterona e noretisterona (ALICE et al., 2004).

### 3.2 Potenciais aplicações terapêuticas da Diosgenina

A Diosgenina é indicada como tendo potencialmente aplicações práticas, uma vez que apresenta um amplo perfil farmacológico, podendo ser utilizada no tratamento de diferentes patologias. Esta saponina esteroide tem despertado atenções na indústria farmacêutica, pois, desde que foi descoberta, tem sido a principal fonte natural de hormônios esteroides (como exemplo a progesterona) e precursor na produção de esteroides sintéticos, como as pílulas contraceptivas. A Diosgenina tem sido considerada segura já que não consegue ser sintetizada nem convertida, no organismo, em esteroides. Além disso, estudos relevantes têm demonstrado que a Diosgenina não causa toxicidade sistêmica, nem genotoxicidade e, possivelmente, também não tem atividade estrogênica muito significativa (OKAWARA et al., 2014; CHEN et al., 2012; XU et al., 2012; GONG et al., 2010; DIAS et al., 2007).

A Diosgenina, uma saponina esteroide natural, regula uma variedade de atividades biológicas, agindo como regulador de processos fisiológicos em plantas e animais (LIU et al., 2012). Demonstra atividade biológica contra doenças metabólicas (diabetes e hipertensão), bem como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória e antitumoral (PATEL et al., 2012), através de diferentes mecanismos/alvos (MANIVANNAN et al., 2013; OKAWARA et al., 2013; XU et al., 2012).

A Diosgenina apresenta um papel benéfico contra doenças metabólicas como hipercolesterolemia, reduzindo significativamente os níveis de colesterol total no plasma, diabetes, obesidade, inflamação e câncer (YUN-CHENG et al., 2015; OKAWARA et al., 2014; OKAWARA et al., 2013). Em modelos experimentais de obesidade, demonstraram-se as propriedades hipoglicêmicas e anti-inflamatórias da Diosgenina, verificou-se que era responsável por diminuir os níveis plasmáticos e hepáticos dos triglicerídeos e melhorar a homeostase da glicose, através da promoção de diferenciação de adipócitos e inibindo a inflamação no tecido adiposo (PATEL et al., 2012; ESFANDIAREI et al., 2011).

Diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por problemas na secreção de insulina e a resistência periférica à insulina ao músculo esquelético, ao tecido adiposo e fígado (ESSER et al., 2014). Estudos apontam para o potencial da Diosgenina na gestão de diabetes, pela capacidade de melhorar o estresse oxidativo e a disfuncional do metabolismo lipídico. Nos ratos diabéticos obesos, o tratamento com feno-grego (planta da qual a Diosgenina pode ser extraída) melhorou a esteatose hepática e a hiperlipidemia por supressão da expressão de RNAm de genes lipogênicos (UEMURA et al., 2011). Do mesmo modo, com a utilização de aortas de ratos diabéticos foi igualmente demonstrado os efeitos benéficos da Diosgenina em melhorar estado antioxidante e na regressão da peroxidação lipídica (PARI; MONISHA; MOHAED, 2012).

Tem sido relatado na literatura que a Diosgenina induziu o relaxamento da artéria coronária de ratos, através da proteína G quinase, por meio da cascata de sinalização e ativação dos canais de cálcio (ESFANDIAREI et al., 2011). A Diosgenina retardou a progressão da osteoporose e efeitos anti-inflamatórios em ratos, além disso, os glicosídeos de Diosgenina vêm alterando a modulação extracelular de cálcio através do fluxo pela membrana celular (DIAS et al., 2007). Apesar de vários estudos sugerirem a ação positiva da Diosgenina na musculatura vascular, os efeitos diretos da atuação ainda tem que ser mais bem esclarecida.

Mais recente a Diosgenina tem sido estudada com atividade antitumoral e foi verificado que afeta várias fases de tumorigênese, incluindo a proliferação de células de tumor, apoptose, transição epitelial-mesenquimal, a migração de célula e angiogênese. A proliferação celular e a apoptose desempenham papéis importantes em manutenção da homeostase e a desregulamentação destes processos é um processo crucial para o desenvolvimento do câncer. A utilização da Diosgenina em diversas linhagens de câncer está sendo relatada como promissora, como no câncer de mama, osteosarcoma e câncer de pulmão, por induzir parada no ciclo celular, apoptose por via intrínseca e extrínseca e atividade de telomerase, respectivamente (CHEN et al., 2015).

Huang e Colaboradores (2010) verificaram que a Diosgenina melhorou as doenças alérgicas principalmente através da regulação da resposta imunitária das células T. Aumentou a produção de Th2 intestinal induzida pela sensibilização a ovoalbumina, além disso, está associada com atividade antialérgica, pois atua controlando a produção da Imunoglobulina-E (IgE), minimizando a infiltração de mastócitos e regulando a desgranulação dos fagócitos. A Diosgenina foi capaz de modular determinados aspectos da imunidade adquirida em ratos sensibilizados com ovoalbumina, pois aumentou os níveis de Imunoglobulina-G2a e Interferon- $\gamma$ , expressão antigênica específica que sofre regulação através da diferenciação de Th1 (JAN et al., 2007). O tratamento com Diosgenina inibiu a Interleucina-2 (Th1), Interleucina-10 (Th-2) e produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que este fitoestrógeno apresenta um potencial anti-inflamatório por atuação de células imunológicas T (KU; LIN, 2013).

### **3.3 Ação da Diosgenina no sistema cardiovascular**

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos, nas quais são incluídas doenças coronarianas (ataques cardíacos), acidente vascular cerebral (AVC), pressão arterial elevada (hipertensão), doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, insuficiência cardíaca, hipercolesterolemia, diabetes, doença renal crônica, doença arterial e demência vascular (WHO, 2011). Essas doenças são a principal causa de morte prematura em todo o mundo, mais pessoas morrem anualmente de DCV do que qualquer outra causa, e isto também contribui substancialmente para o aumento dos custos com assistência médica (WHO, 2011; WHO, 2007). Todos os anos cerca de 17 milhões de pessoas morrem por DCV no mundo. Esses óbitos compreendem aproximadamente 29% de todas as mortes, e cerca de 80% ocorrem em países de baixa e média renda, muitas vezes em pessoas com menos de 60 anos de idade (NDINDJOCK et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a previsão para 2030 é que o número de mortes por doenças cardiovasculares pode chegar a 23,3 milhões, as DCV são distúrbios dos vasos sanguíneos, agravados pela aterosclerose, e uma das principais complicações em pacientes idosos (homens e mulheres). Para uma melhor prevenção dos riscos de eventos cardiovasculares, diagnóstico precoce, a seleção de um tratamento adequado e desenvolvimento de novos medicamentos têm contribuído muito para a explicação dos processos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KORDALEWSKA; MARKUSZEWSKI, 2015).

O endotélio normal morfofuncionalmente é o principal responsável pela integridade das artérias, porque participa na regulação da vasomotricidade, confere atividade antimicrobiana e antiinflamatória para o vaso sanguíneo intacto. Os fatores de risco cardiovascular estão relacionados à disfunção endotelial, caracterizado pela redução das propriedades vasodilatadoras, aumento do efeito pró-inflamatório e um estado pró-trombótico. O papel dos estrogênios, a exemplo do  $\beta$ -estradiol, é bem descrito no desenvolvimento sexual e reprodução, mas estrógenos também estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, incluindo o sistema cardiovascular a presença de receptores de estrogênio em tecido vascular foi inicialmente demonstrado por ligação específica de estrógenos para células vasculares. O endotélio macrovascular parece ser um importante alvo direto para os estrogênios. O tratamento com estrogênio melhora a função endotelial crônica, em um número considerável de danos vasculares. Os estrógenos participam da adequação da estrutura e controle de fluxo de sangue e apresentam ação vasodilatadora de forma endotélio-dependente (ARNAL et al., 2010).

Dias (2007), em seus estudos realizados em ratos observou que a Diosgenina induziu efeito vasorrelaxante dependente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior de rato normotenso mediado pela liberação de óxido nítrico através de ativação de receptores muscarínicos e uma possível ativação dos canais para  $K^+$  sensíveis a voltagem, sensíveis ao ATP e sensíveis ao cálcio de larga condutância. Assim como, os efeitos relaxantes independentes do endotélio funcional induzidos pelo fitoestrógeno parecem envolver o bloqueio dos canais para cálcio operados por voltagem nas maiores concentrações (1 e 2 mM) e a inibição da liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a trifosfato de inositol (WILLIAMS; GONG, 2007).

A Diosgenina conferiu efeito relaxante independente de endotélio em artéria coronária de porco via sinalização da cascata da proteína quinase G e ativação do canal BKcalcio e efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato, dependente e independente do endotélio vascular (ALICE et al., 2004).

A hiperlipidemia apresenta uma relação estreita com danos cardiovasculares, os mecanismos associados incluem a peroxidação lipídica relacionada ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido identificado como um principal determinante de dano celular e contribui para a iniciação e progressão da disfunção cardiovascular. Em estudos desenhados para investigar os efeitos protetores vasculares da Diosgenina em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, Diosgenina melhorou o perfil lipídico e modulou o estresse oxidativo pela regulação de antioxidantes em ratos hiperlipidêmicos (GONG et al., 2010; SON et al., 2007). Do mesmo modo, a Diosgenina inibiu a insuficiência renal crônica (IRC) induzida por

disfunção vascular, impedindo que o estresse oxidativo, através do aumento atividade de enzimas antioxidantes e suprimindo peroxidação lipídica (MANIVANNAN et al., 2013).

### **3.4 Diosgenina e Ação antioxidante**

Os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, já que apresentam a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças, como cardiovasculares, crônicas (câncer, aterosclerose, artrite reumática, hipertrofia muscular) e neurodegenerativas (Mal de Alzheimer) (OLIVEIRA, 2015). Os antioxidantes são compostos que têm a capacidade de bloquear ou reduzir o processo de oxidação através da inibição da iniciação de reações em cadeia de oxidação (AHMAD; RAB; AHMAD, 2016).

Processos fisiológicos são responsáveis pelo mecanismo de defesa antioxidante que catalisam a redução de  $O_2$  em água, controlando dessa forma a geração de radicais livres e impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (BARBOSA, 2010). Porém, em doenças nas quais o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia muitas vezes os mecanismo de defesa não é suficiente, fazendo-se necessário procurar novos compostos antioxidantes como agentes terapêuticos (NOGUEIRA NETO, 2013).

O estresse oxidativo pode ser descrito como um desequilíbrio existente entre eliminação e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estas espécies reativas foram consideradas exclusivamente prejudiciais para as células. A regulação da redução-oxidação envolvendo espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para a modulação de inúmeras funções celulares (AGUIAR et al., 2012). As espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser radicais livres ou não (como os peróxidos), estão em um estado mais reativo que o oxigênio molecular. Dentre as espécies radicalares mais importantes no contexto biológico estão os íons superóxido, hidroxila e o óxido nítrico. As espécies não-radicalares principais são peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e oxigênio singlet (BARBOSA et al., 2010).

A instalação e progressão de diversas doenças degenerativas têm sido relacionadas ao estresse oxidativo, por meio de mutações do DNA, oxidação proteica e peroxidação lipídica com consequentes alterações funcionais e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (VALKO et al., 2008; VERMA et al., 2010). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo pode variar consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e alimentação (BOLIGON, 2010). As enzimas antioxidantes formam a primeira linha de defesa contra os danos no tecido cardíaco e cerebral e um aumento do

estresse oxidativo pode ser devido à depleção dos antioxidantes (CHEN et al., 2015). Estresse oxidativo está associado ainda ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas, como o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas, Alzheimer e Parkinson, bem como pode estar envolvido no processo de envelhecimento (KO et al., 2012), transtornos mentais (DEAN et al., 2009; SALUSTRI et al., 2010), artrites, inflamações crônicas, diminuição do sistema imune (PANDE; AKOH, 2009), cirrose, aterosclerose e fibrose (ROESLER, 2007).

A utilização da Diosgenina em protocolos experimentais tem sido associada a sua capacidade de eliminação de radicais livres e captura de moléculas de oxigênio de forma isolada. A capacidade antioxidante da Diosgenina foi avaliada e a mesma suprimiu a peroxidação lipídica induzida por cristais de oxalato de cálcio monohidratado e aumentou os níveis de glutathione peroxidase, assim como, o efeito protetor foi associado à inibição de caspases e do estresse oxidativo (SAHA et al., 2014).

O mecanismo molecular da Diosgenina está diretamente relacionado à sua notável capacidade para eliminar a maior parte das espécies reativas de oxigênio, devido à presença de um grupo hidroxila na sua estrutura (HAMRITA et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que Diosgenina fortalece e regula positivamente defesa antioxidante contra os radicais livres em modelos de estresse oxidativo induzido (CHIU et al., 2011). O elevado conteúdo de glutathione após tratamento com Diosgenina é um dos principais mecanismos antioxidante na mediação da proteção cardiovascular (MANIVANNAN et al., 2013).

### **3.5 Nanotecnologia: Lipossomas**

A nanotecnologia está relacionada às estruturas, propriedades e processos envolvendo materiais com dimensões numa escala nanométrica, nessas dimensões os materiais apresentam novas propriedades como o aumento de força, resistência e condutibilidade elétrica (SPUCH; NAVARO, 2011; DORNELAS et al., 2008). A nanotecnologia aplicada à área das ciências farmacêuticas é um setor que se encontra em grande desenvolvimento, sobretudo, para caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos à escala nanométrica (DELGADO, 2013).

A nanotecnologia farmacêutica surgiu nos anos de 1960 com o desenvolvimento inicial da microencapsulação, que serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas agora em escalas nanométricas, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas. A descoberta dos lipossomas nessa mesma época veio aumentar a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica com sistemas lipídicos para a vetorização de fármacos, visto que, atualmente grande parte dos sistemas farmacêuticos apresentam

farmacocinética pobre e propriedades biofarmacêuticas menos desenvolvidas (GUPTA et al., 2012; PETROS; DE SIMONE, 2010).

Na terapia medicamentosa utilizando formas farmacêuticas convencionais como comprimidos não revestidos, soluções, suspensões, emulsões, cápsulas e dentre outros, torna-se difícil manter concentrações plasmáticas de muitos fármacos em nível terapêutico por longo período de tempo, isto porque, essas apresentações liberam todo seu conteúdo de imediato gerando inicialmente um pico máximo de concentração plasmática que pode atingir níveis tóxicos, e logo após, uma concentração insuficiente de ação, com doses subterapêuticas (LEE; ROBINSON, 2004).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos e outras substâncias bioativas têm sido amplamente estudados e têm direcionado ao desenvolvimento de áreas inovadoras na nanotecnologia. As principais formas farmacêuticas de liberação controlada são bombas osmóticas, adesivos transdérmicos, implantes, micropartículas, nanopartículas (nanocápsulas), nanopartículas poliméricas, nanopartículas de metais e lipossomas (VERMA; GARG, 2001).

Os lipossomas são vesículas que em condições balanceadas de osmolaridade, apresentam formato esférico contendo uma ou mais lamelas compostas por lipídios anfifílicos, contendo em seu interior um núcleo hidrofílico aquoso. Sua carga superficial pode ser modificada pela incorporação de lipídios carregados positiva ou negativamente, o que pode influenciar na taxa de incorporação de substâncias, impedir a agregação ou fusão das vesículas e modular seu destino no organismo, e a fluidez alterada através da adição de colesterol. Eles apresentam grande flexibilidade estrutural e tamanhos, variam de 50 nm até algumas dezenas de micrômetros. São bons carreadores de fármacos, pois são biocompatíveis, com baixa toxicidade, podem liberar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, protegem suas cargas de degradação por enzimas plasmáticas e transportam sua carga através das membranas biológicas até atingir o órgão alvo-específico (MORENO et al., 2014; SPUCH; NAVARO, 2011).

A tendência dos lipossomas de se acumular no organismo é a propriedade que tem sido explorada na quimioterapia do câncer, terapia antimicrobiana, vacinas e diagnóstico por imagem. Os resultados têm indicado claramente que alguns lipossomas que encapsulam fármacos e vacinas exibem superior propriedade farmacológica sobre os medicamentos tradicionais (CONCEIÇÃO; MATOS; MOUTINHO, 2010).

A utilização de nanossistemas apresenta como propriedades favoráveis a elevada biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, manutenção dos níveis plasmáticos em concentrações constantes e eficiente proteção de fármacos. São constituídos por materiais naturais e tendem a ter uma meia-vida de circulação curta, como resultado da fagocitose

(ALINAGHI et al., 2014; PSARROS et al., 2012). Com a finalidade de melhorar a circulação sanguínea e direcionamento específico para a célula, a superfície dos lipossomas pode ser modificada, principalmente por inclusão de polímeros, peptídeos, ou anticorpos (SCHIENER et al., 2014). Embora estas vantagens sejam significativas, existem desvantagens de uma possível toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo de obtenção dos nanotransportadores comparados com as formulações farmacêuticas convencionais (DELGADO, 2013).

Após administração endovenosa os lipossomas interagem com pelo menos dois grupos distintos de proteínas plasmáticas: lipoproteínas plasmáticas de alta densidade e opsoninas, que medeiam à fagocitose dos lipossomas pelos macrófagos. A taxa de depuração dos lipossomas do sangue depende da capacidade das opsoninas de se ligarem à superfície dos mesmos. Influenciam a depuração dos lipossomas: a rigidez da membrana, sendo as mais rígidas removidas mais lentamente; a carga superficial, vesículas neutras se mantêm na circulação sanguínea por mais tempo; e o tamanho das vesículas, as maiores são mais rapidamente depuradas. No entanto, independentemente do tempo de circulação dos lipossomas, a maior parte da dose injetada é captada pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear do fígado, baço e medula óssea. Dentro dos lipossomas, as vesículas são destruídas e seu conteúdo liberado localmente e, dependendo da sua natureza, pode permanecer dentro do lipossoma, ser lançado no citoplasma ou difundir para fora da célula (MOGHIMI; SZEBENI, 2003).

A produção dos lipossomas pode ser a partir de vários tipos diferentes de lipídeos, no entanto, os fosfolipídios são os mais utilizados para gerar lipossomas como transportadores de fármacos, a composição da bicamada lipídica é fator preponderante na preparação dos lipossomas e obtenção de formulações estáveis. Os fosfolipídeos mais utilizados são os que apresentam forma cilíndrica como a fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas nas preparações lipossomais, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio. O colesterol é um componente lipídico incorporado na composição dos lipossomas, atua aumentando a rigidez das membranas no estado “cristal-liquído” e reduz a rigidez e os efeitos estruturais das membranas no estado gel (BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas apresentam-se de diferentes tipos dependendo do método de preparo. As vesículas multilamelares são formadas por múltiplas camadas de lipídios, com até quatorze camadas, cada uma separa por uma solução aquosa (500 – 5000 nm); as vesículas unilamelares pequenas apresentam apenas uma camada de lipídio variando de 25 a 100 nm

(SPUCH; NAVARO, 2011). Geralmente, os lipossomas são produzidos pelo método de hidratação de filme lipídico, seguido de sonicação ou extrusão que visa diminuir o diâmetro das vesículas lipídicas e conferir uniformidade as mesmas. Esses nanossistemas podem ser caracterizados de acordo com natureza do material encapsulado, a composição química e o tamanho das vesículas. Já são comercializados desde os anos 80 para o tratamento de câncer e infecções fúngicas sistêmicas, no entanto são necessários mais estudos para solucionar obstáculos de ordem tecnológica e biológica com o intuito de ampliar suas indicações farmacológicas (ALLEN; CULLIS, 2013; LIU et al., 2010; BATISTA et al., 2007).

Conforme a interação que os lipossomas exercem com os sistemas biológicos podem ser classificados como convencionais, de longa circulação e sítio-específicos. Lipossomas convencionais são compostos basicamente por fosfolipídeos neutros e/ou carregados, e/ou colesterol. Para a obtenção de lipossomas carregados, tipicamente são utilizadas as seguintes substâncias: octadecilamina (estearilamina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Os lipossomas de longa circulação, também chamados *stealth* ou furtivos, contêm na sua superfície carboidratos hidrofílicos (ex.: polímeros de potietilenoglicol - PEG) o que dificulta a opsonização e o reconhecimento pelo sistema retículo endotelial, aumentando o tempo de meia-vida das vesículas em torno 8-10 vezes quando comparados aos lipossomas convencionais, no entanto, deve-se levar em consideração fatores como, tamanho, comprimento do polímero, densidade e carga geral de superfície (MORENO et al., 2014; SCHIENER et al., 2014; SANTOS, 2010). O polímero PEG ocupa o espaço adjacente à superfície dos lipossomas criando um impedimento estérico e, conseqüentemente, prejudicando a interação de macromoléculas e células com os lipossomas (TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas são muito sensíveis ao pH, luz, magnetismo, temperatura, ondas de ultra som, são altamente susceptíveis a destruição via absorção pelo sistema retículo-endotelial; uma alternativa para proteção dos lipossomas seria aumentar as bicamadas lipídicas estáveis regulando o perfil de liberação do fármaco (SPUCH; NAVARO, 2011).

Utilizando componentes sensíveis a alterações de pH, uma nova classe de lipossomas foi desenvolvida, os lipossomas pH-sensíveis, estas vesículas são estáveis em pH neutro (pH 7,4) e se desestabilizam em pH ácido, tais como os encontrados em tumores, endossomas e lisossomas. Foram concebidos para liberar seu conteúdo no citosol ou no interior do endossomo. Quatro classes de lipossomas pH-sensíveis foram descritas. A primeira combina lipídios polimórficos, fosfatidiletanolamina, por exemplo, com moléculas anfifílicas levemente ácidas que atuam como estabilizadoras em pH neutro. A segunda inclui lipossomas

compostos de lipídios cuja hidrólise ácida resulta no aumento de componentes desestabilizantes da membrana e, portanto, no aumento da permeabilidade aos solutos encapsulados. A terceira utiliza peptídeos sensíveis ao pH ou proteínas de fusão reconstituídas para desestabilizar as membranas em pH ácido. A última utiliza polímeros tituláveis que mudam de conformação em pH baixo desestabilizando a membrana lipossomal (KELLY; JEFFERIES; CRYAN, 2010).

Segundo Magalhães e Mosqueira (2010) o encapsulamento de fármacos em lipossomas proporciona liberação controlada do fármaco, uma vez que aumenta a sua biodisponibilidade e seu tempo de permanência na circulação por manter os níveis séricos do fármaco constante, assim como, favorece maior proteção ao medicamento contra a degradação extracelular, reduz a frequência de administração e a duração do tratamento, além de melhorar a seletividade em relação ao alvo.

Têm sido demonstrado o envolvimento dos lipossomas no aumento da eficácia antioxidante dos fármacos testados, protegem células do estresse oxidativo (RENGEL et al., 2005), reduzem a peroxidação lipídica (TIAN et al., 2007) e promovem de melhor ativação de enzimas antioxidantes (PENG et al., 2010). Estudo realizado por Oliveira et al., (2013) sugeriu um positivo potencial antioxidante de lipossomas contendo nimodipina, ação verificada pela redução de radicais nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

Devido as características da Diosgenina, esta se torna excelente candidata ao carreamento lipossomal. Além disto, surge a importância de se realizar estudos que tenham o objetivo de avaliar a ação cardioprotetora de lipossomas contendo Diosgenina e seu potencial para prevenir e tratar doenças que acometem o sistema cardiovascular, visto que, estudos demonstram promissores resultados referentes às características físico-químicas e ao bom direcionamento desses carreadores.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. C. T.; ALMEIDA, A. B.; ARAUJO, P. V. P.; ABREU, R. N. D. C.; CHAVES, E. M. C.; VALE, O. C. V.; MACEDO, D. S.; WOODS, D. J.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 4, n. 2, p. 133-151, 2012.
- AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 154, p. 51-56, 2016.
- ALICE, L. S. A.; CHING, C. K.; ALLEN, T. C. L.; YIU, W. K.; MACEY, M. S. L.; RONG-ZHEN, Z.; SAI, M. N.; SIMON, M. Y. L.; GUO-WEI, H.; KWOK, P. F. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 502, n. 1-2, p. 123-133, 2004.
- ALINAGHI, A.; ROUINI, M. R.; DAHA, F. J.; MOGHIMI, H. R. The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 459, n. 1-2, p. 30-39, 2014.
- ALLEN, T. M.; CULLINS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.
- ANCHIÊTA-JUNIOR, J. J. L.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, J. M. F.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.
- ARNAL, J. F.; FONTAINE, C.; BILLON-GALES, A.; FAVRE, J.; LAURELL, H.; LENFANT, F.; GOURDY, P. Estrogen Receptors and Endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.30, n. 8, p.1506-1512, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p.167-179, 2007.

BOLIGON, A. A. **Atividade antioxidante de flavonóides e terpenóides obtidos das folhas e da casca do tronco de *Scutia Buxifolia* Reissek**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975-999, 2015.

CHEN, C. T.; WANG, Z. H.; HSU, C. C.; LIN, H. H.; CHEN, J. H. In Vivo Protective Effects of Diosgenin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4938-4954, 2015.

CHEN, Y.; TANG, Y. M.; YU, S. L.; HAN, Y. W.; KOU, J. P.; LIU, B. L.; YU, B. Y. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 8, p. 578-587, 2015.

CHEN, F. X.; ZHAO, M. R.; LIU, C. C.; PENG, F. F.; REN, B. Z. Application of the NRTL method to correlate solubility of diosgenin. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 71, p. 231-235, 2014.

CHEN, F. X.; ZHAO, M. R.; LIU, C. C.; PENG, F. F.; REN, B. Z. Determination and correlation of the solubility for diosgenin in alcohol solvents. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 50, p. 1-6, 2012.

CHIU, C. S.; CHIU, Y. J.; WU, L. Y.; LU, T. C.; HUANG, T. H.; HSIEH, M. T.; LU, C. Y.; PENG, W. H. Diosgenin ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. **Am. J. Chin. Med.**, v. 39, n. 3, p. 551-563, 2011.

CONCEIÇÃO, A. I. F. S.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G. Lipossomas: Vetores atrativos e versáteis para o direcionamento de (bio)fármacos. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 7, p. 168-178, 2010.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes de noni (*Morinda citriflora* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

DEAN, O. M.; VAN DEN BUUSE, M.; BUSH, A. I.; COPOLOV, D. L.; NG, F.; DODD, S.; BERK, M. A role for glutathione in the pathophysiology of bipolar disorder and schizophrenia? Animal models and relevance to clinical practice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, p. 2965-2976, 2009.

DELGADO, J. M. F. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. **Farmatec**, v. 9, p. 249-304, 2013.

DIAS, K. L. G.; CORREIA, N. A.; PEREIRA, K. K. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CAVALCANTE, K. V. M.; ARAÚJO, I. G. A.; SILVA, D. F.; GUEDES, D. N.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M.; MEDEIROS, I. A. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 574, n. 2 p.172-178, 2007.

DORNELAS, C. B.; RESENDE, D. K.; ROCHA, H. V. A.; GOMES, A. S.; TAVARES, M. I. B.; COUTINHO, S. S. S.; CABRAL, L. M. Avaliação de Derivados Poliméricos Intercalados em Montmorilonita Organofílica na Preparação de Novos Materiais de Uso Farmacêutico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 222-229, 2008.

ESFANDIAREI, M.; LAM, J. T. N.; YAZDI, S. A.; KARIMINIA, A.; DORADO, J. N.; KUZELJEVIC, B.; SYYONG, H. T.; HU, K.; BREEMEN, C.V. Diosgenin Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Function by Regulating Cell Viability, Migration, and Calcium Homeostasis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 336, n. 3, p. 925-939, 2011.

ESSER, N.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J.; SCHEEN, A. J.; PAGUOT, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 105, n. 2, p. 141-150, 2014.

GONG, G.; QIN, Y.; HUANG, W.; ZHOU, S.; WU, X.; YANG.; ZHAO, Y. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3 p. 366-375, 2010.

GUPTA, A.; ARORA, A.; MENAKSHI, A.; SEHGAL, A.; SEHGAL, R. Nanotechnology and Its Applications in Drug Delivery: A Review. **International Journal of Medicine and Molecular Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

HAMRITA, B.; ROUISSI, K.; KOUIDHI, S.; JAOUADI, B.; ELGAAIED, A. B. Do diosgenin ameliorate urinary bladder toxic effect of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine in experimental animal models? **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 2146-2153, 2012.

HUANG, C. H.; LIU, D.Z.; JAN, T. R. Diosgenin, a plant-derived sapogenin, enhances regulatory T-cell immunity in the intestine of mice with food allergy. **J Nat Prod**, v. 73, n. 6, p. 1033-1037, 2010.

JAN, T. R.; WEY, S. P.; KUAN, C. C.; LIAO, M. H.; WU, H. Y. Diosgenin, a steroidal sapogenin, enhances antigen-specific IgG2a and interferon- $\gamma$  expression in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. **J Planta Med**, v. 73, n. 5, p. 421-426, 2007.

KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. **J. Drug Deliv.**, v. 2011, p. 1-11, 2010.

KO, S.H.; CAO, W.; LIU, Z. Hypertension management and microvascular insulin resistance in diabetes. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 243-251, 2012.

KORDALEWSKA, M.; MARKUSZEWSKI, M. J. Metabolomics in cardiovascular diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 10, n. 113, p. 121-136, 2015.

KOUDELKA, S.; KNOTIGOVA, P. T.; MASEK, J.; PROCHAZKA, L.; LUKAC, R.; MILLER, A.D.; NEUZIL, J.; TURANEK, J. Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. **Journal of Controlled Release**, v. 207, p. 59-69, 2015.

KU, C. M.; LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chem**, v. 141, n. 2, p. 1104-1113, 2013.

LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. T. Controlled-Release drug-delivery system. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, p. 933-960, 2004.

LIU, K.; ZHAO, W.; GAO, X.; HUANG, F.; KOU, J.; LIU, B. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK $\beta$  and IRS-1 pathways. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 2, p. 350-358, 2012.

LIU, C.; YANG, S.; LIU, W.; WANG, R.; WAN, J.; LIU, W. Preparation and characterization of medium-chain fatty acid liposomes by lyophilization. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 3, p. 183-190, 2010.

MAGALHÃES, N. S. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

MANIVANNAN, J.; BALAMURUGAN, E.; SILAMBARASAN, T.; RAJA, B. Diosgenin improves vascular function by increasing aortic eNOS expression, normalize dyslipidemia and ACE activity in chronic renal failure rats. **Mol. Cell. Biochem**, v. 384, n. 1-2, p. 113-120, 2013.

MANIVANNAN, J.; BARATHKUMAR, T. R.; SIVASUBRAMANIAN, J.; ARUNAGIRI, P.; RAJA, B.; BALAMURUGAN, E. Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats. **Mol Cell Biochem**, v. 378, n. 1-2, p. 9-18, 2013.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Prog. Lipid Res.**, v. 42, n. 6, p. 463-78, 2003.

MORENO, L. C.; SILVA-OLIVEIRA, G. Z.; CAVALCANTI, I. M.; SANTOS MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 116, p. 64-8, 2014.

NDINDJOCK, R.; GEDEON, J.; MENDIS, S.; PACCAUD, F.; BOVET, P. Potential impact of single-risk-factor versus total risk management for the prevention of cardiovascular events in Seychelles. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, n. 4, p. 286-295, 2011.

NOGUEIRA NETO, J. D.; ALMEIDA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, P. S.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open Field test. **Res. Neurochem.**, v. 38, n. 9, p. 1861-1870, 2013.

OKAWARA, M.; TOKUDOME, Y.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; HASHIMOTO, F. Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin Derivatives on the Diosgenin Absorption in Caco-2 Cell Monolayer and Rats. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, n.1, p. 54-59, 2014.

OKAWARA, M.; TOKUDOME, Y.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; HASHIMOTO, F. Enhancement of Diosgenin Distribution in the Skin by Cyclodextrin Complexation Following Oral Administration. **Biol. Pharm. Bull**, v. 36, n.1, p. 36-40, 2013.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, G. Z. S. **Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais**. 2013. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí - UFPI, Piauí.

PANDE, G.; AKOH, C. C. Scientific Research and EssaysScientific Research and EssaysAntioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9427-9436, 2009.

PARI, L.; MONISHA, P.; MOHAMED, J. A. Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1, p. 143-150, 2012.

PATEL, K.; GADEWAR, M.; TAHILYANI, V.; PATEL, D. S. A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. **Natural Products Bioprospecting**, v. 2, n. 2, p. 46–52, 2012.

PENG, C. H.; CHANG, C. H.; PENG, R. Y.; CHYAU, C. C. Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 154-161, 2010.

PETROS, R. A.; DE SIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615-627, 2010.

PSARROS, C.; LEE, R.; MARGARITIS, M.; ANTONIADES, C. Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Maturitas**, v. 73, n. 1, p. 52-60, 2012.

RAJU, J.; MEHTA, R. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. **Nutrition and Cancer**, v.61, n. 1, p. 27-35, 2009.

RENGEL, R. G.; GRČIĆ, J. F.; ČEPELAK, I.; GRUBIŠIĆ, T. Z.; BARIŠIĆ, K. The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2005.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SAHA, S.; GOSWAMI, G.; PANDRANGI, A. Isolation and prevention of calcium oxalate-induced apoptotic death and oxidative stress in MDCK cells by diosgenina. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 51–57, 2014.

SALUSTRI, C.; SQUITTI, R.; ZAPPASODI, F.; VENTRIGLIA, M.; BEVACQUA, M.G.; FONTANA, M.; TECCHIO, F. Oxidative stress and brain glutamate-mediated excitability in depressed patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 127, n. 1-3, p. 321-325, 2010.

SANTOS, J. S. **Nanopartículas: aplicações cosméticas e farmacêuticas**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

SCHIENER, M.; HOSSANN, M.; VIOLA, J. R.; ORTEGA-GOMEZ, A.; WEBER, C.; LAUBER, K.; LINDNER, L. H.; SOEHNLEIN, O. Nanomedicine-based strategies for treatment of atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 5, p. 271-281, 2014.

SON, I. S.; KIM, J. H.; SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KIM, J. S.; KWON, C. S. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. **Biosci Biotech Biochem**, v. 71, n. 12, p. 3063-3071, 2007.

SPUCH, C.; NAVARO, C. Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1-12, 2011.

TIAN, Y. Y.; GE, L.; DUAN, X. L.; GAO, Z. Q.; CHANG, Y. Z. Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1107-1111, 2007.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews**, v. 4, n. 2, p. 145-60, 2005.

UEMURA, T.; GOTO, T.; KANG, M. S.; MIZOGUCHI, N.; HIRAI, S.; LEE, J. Y.; NAKANO, Y.; SHONO, J.; HOSHINO, S.; TAKETANI, K.; TSUGE, N.; NARUKAMI, T.; MAKISHIMA, M.; TAKAHASHI, N.; KAWASA, R. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR $\alpha$  activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 1, p. 17-23, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2008.

VERMA, A. R.; VIJAYAKUMAR, M.; RAO, C. V.; MATHELA, C. S. In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 704-709, 2010.

VERMA, R.K., GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology On-line**, v. 25, p. 1-14, 2001.

VINCKEN, J. P.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Geneva: Fact sheet n° 317, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, 2007.

WILLIAMS, J.R.; GONG, H. Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins. **Lipids**, v. 42, n. 77, p. 59-67, 2007.

XU, T.; ZHANG, S.; ZHENG, L.; YIN, L.; XU, L.; PENG, J. A 90-day subchronic toxicological assessment of dioscin, a natural steroid saponin, in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1279-1287, 2012.

YUN-CHENG, L. V.; YANG, J.; YAO, F.; XIE, W.; TANG, Y. Y.; OUYANG, X. P.; HE, P. P.; TAN, Y. L.; LI, L.; ZHANG, M.; LIU, D.; CAYABYAB, F. S.; ZHENG, X. L.; TANG, C. K. Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the MiR-19b-induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 1, p. 80-89, 2015.

**CAPÍTULO I:** Atividade cardioprotetora de uma saponina esteroidal: uma prospecção tecnológica e científica

(Artigo Submetido à Revista: Recent Patents on Biotechnology)  
Qualis B3 Farmácia

## **Atividade cardioprotetora de uma saponina esteroideal: uma prospecção tecnológica e científica**

Michely Laiany Vieira Moura<sup>1,3</sup>; Aldeídia Pereira de Oliveira<sup>2</sup>; Hercilia Maria Lins Rolim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF), Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada (NANOSFAR), Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, Brasil

### **RESUMO**

As doenças cardiovasculares são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos e representam a principal causa de morte prematura em todo o mundo. Diosgenina é uma saponina esteroide com aplicação terapêutica em diferentes contextos clínicos como doenças do sistema cardiovascular, controle de hiperglicemia e dislipidemia, propriedades antimicrobiana, anti-viral e anti-inflamatória. O objetivo do estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre a Diosgenina, suas aplicações farmacêuticas voltadas para o sistema cardiovascular. As bases periódicas ScienceDirect, PubMed e Biblioteca Virtual em Saúde, foram utilizados, bem como as bases tecnológicas do Escritório Europeu de Patentes, Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Escritório Americano de Patentes e Marcas Registradas e no banco de dados Brasileiro Instituto Nacional de Propriedade Industrial. As palavras-chave utilizadas foram Diosgenina, sistema cardiovascular, hipertensão, aterosclerose e dislipidemias e suas correlações em Inglês e Português, com publicações de janeiro de 2010 a junho de 2015. Após a análise das bases tecnológica e científica, os resultados mostram que existe um número reduzido de patentes evidenciando a ação da Diosgenina no sistema cardiovascular, com estudo voltados para as áreas médicas e para os estudos químicos da Diosgenina como esteroide. Nas bases científicas, os resultados mostram que existe interesse da ação da Diosgenina no sistema cardiovascular. Portanto, os estudos com Diosgenina são promissores, visto que, apresenta um alto potencial farmacológico a partir de pontos de vista científicos e tecnológicos, em busca de transferência de tecnologias para gerar crescimento econômico e industrial.

**Palavras-chave:** Aterosclerose, sistema cardiovascular, Diosgenina, dislipidemia, hipertensão, saponina, tecnologia.

### **ABSTRACT**

Cardiovascular diseases are a group of disorders of the heart and blood vessels, and constitute a major cause of premature death worldwide. Diosgenin saponin is a steroid for therapeutic application in different clinical settings as cardiovascular diseases, hyperglycemia and dyslipidemia control, antimicrobial, anti-viral and anti-inflammatory. The aim of the study was a systematic review of the Diosgenin, their pharmaceutical applications and perspectives on the application in the cardiovascular system diseases. Periodic basis ScienceDirect, PubMed and Virtual Health Library were used as well as the European Office of the technological bases Patent Office, World Intellectual Property Organization, the Office US Patent and Trademark Office and the Brazilian database National Institute of Property

Industrial. The keywords used were Diosgenin, cardiovascular system, hypertension, atherosclerosis and dyslipidemia and their correlations in English and Portuguese, with the January 2010 publication to June 2015. After reviewing the scientific and technological bases, the results show that there is a reduced number of patents showing the action of Diosgenin on the cardiovascular system are focused on the areas for chemical studies of Diosgenin as steroid. In the scientific basis, the results show that there is interest Diosgenin action on the cardiovascular system. Therefore, studies with Diosgenin are promising, since it presents a high pharmacological potential from scientific and technological viewpoints, looking for technology transfer to generate economic and industrial growth.

**Keywords:** Atherosclerosis, cardiovascular system, Diosgenin, dyslipidemia, hypertension, saponin, technology.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos, nas quais são incluídas doenças coronarianas (ataques cardíacos), acidente vascular cerebral, pressão arterial elevada (hipertensão), doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, insuficiência cardíaca, hipercolesterolemia, diabetes, doença renal crônica, aterosclerose e demência vascular. Essas doenças são a principal causa de morte prematura em todo o mundo, mais pessoas morrem anualmente de DCV do que qualquer outra causa, e isto também contribui substancialmente para o aumento dos custos com assistência médica [1,2].

Diosgenina (3 $\beta$ -hidroxi-5-spirostene) é uma saponina esteróide que pode ser encontrada em várias espécies do gênero *Dioscorea villosa*, *Costus speciosus*, *Trigonella foenum graecum* é estruturalmente semelhante ao colesterol e outros esteróides **Fig. (1)** [3]. As cadeias de açúcar de saponinas esteroidais presentes nas espécies de gênero *Dioscorea* estão sujeitas a hidrólise ácida, entre outras etapas, para produzir Diosgenina [4].

Uma característica importante da Diosgenina é a sua aplicação terapêutica em diferentes contextos clínicos. Investigações anteriores demonstraram que a Diosgenina foi eficaz no tratamento de várias doenças do sistema cardiovascular e do seu papel no controle adequado de hiperglicemia e dislipidemia [5]. Notavelmente diminuiu o nível de triglicerídeos do soro e colesterol total em camundongos, ratos e coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol [6]. Tem sido relatado que a Diosgenina apresenta atividade antimicrobiana, anti-viral, anti-inflamatória e propriedades antidiabéticas [7].

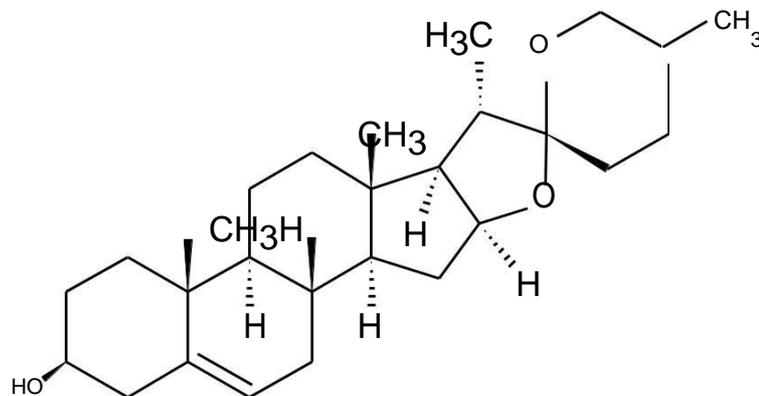
A propriedade medicinal de Diosgenina foi ampliada recentemente para incluir o tratamento de doenças que ameaçam a vida, tais como a diferenciação da linhagem celular para eritroleucemia humana, a atuação desta saponina é alterando a atividade da lipoxigenase,

a apoptose induzida e a parada do ciclo celular em células da linhagem de osteossarcoma humano [8].

Como parte da ação antitumoral Diosgenina, apresenta capacidade anti-inflamatória, pois a inflamação crônica é um mecanismo que ativa o processo de carcinogênese [9]. Além disso, a Diosgenina demonstrou-se eficaz frente a câncer de cólon induzida experimentalmente associada à inflamação, em parte, mediada pela alteração do metabolismo dos lipídios (os níveis de triglicerídeos no soro por aumento da regulação da lipoproteína lipase) e a modulação de genes associados com inflamação em múltiplas vias de sinalização [10].

Estabeleceu-se como principal material para a produção de hormônios esteroides, na indústria farmacêutica e contraceptivos orais, fornecendo cerca de 50% da matéria-prima para a produção de cortisona, progesterona e muitos outros hormônios esteroides. Derivados esteroidais de Diosgenina estão entre os dez medicamentos à base de plantas mais prescritos no mundo. Diosgenina tem sido aplicado para a terapia de substituição hormonal em mulheres na menopausa [11-12] e tem sido notada como um elemento ativo em suplementos dietéticos e cosmeceuticos [13].

A Diosgenina possui várias atividades farmacológicas relacionadas diretamente para prevenção das desordens do sistema cardiovascular, dentre elas: ação hipocolesterolêmica em ratos, efeito relaxante independente de endotélio em artéria coronária de porco via sinalização da cascata da proteína quinase G (PKG) e ativação do canal BKcalcio [14] e efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato dependente e independente do endotélio vascular [15]. A Diosgenina atua em alvos terapêuticos para o tratamento de enfermidades cardiovasculares tais como: hipertensão, vasoespasmos, aterosclerose, assim como, em doenças relacionadas, como a dislipidemias [16].



**Fig. (1).** Estrutura química da Diosgenina (3β-hydroxy-5-spirostene).

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma revisão sistemática, científica e tecnológica sobre a Diosgenina a respeito das patologias no sistema cardiovascular, com o objetivo de analisar o número de depósito de patentes em cada país através de bancos nacionais e internacionais de inovação e tecnologia, bem como descrever a produção científica já disponível para este composto.

## **2 METODOLOGIA**

A revisão sistemática foi baseada em pesquisas de pedidos de registro de patentes, bem como artigos científicos que discutiram sobre a Diosgenina e suas aplicações farmacêuticas no sistema cardiovascular. A pesquisa foi realizada utilizando como referência as seguintes palavras-chave: Diosgenina, sistema cardiovascular, hipertensão, aterosclerose e dislipidemias e sua associação, em Inglês e Português. As bases de periódicos utilizados foram ScienceDirect, PubMed e Biblioteca Virtual em Saúde. Na etapa seguinte, os artigos científicos foram selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão: artigos publicados em Inglês e Português, com resumo e texto completo, que relatou as atividades farmacológicas propostas pelo estudo. É relevante salientar que os artigos que apresentaram duplicidade foram excluídos e não foram utilizados. O intervalo de tempo foi de janeiro de 2010 a junho de 2015 para as bases de dados científicas e de janeiro de 2000 a junho de 2015 para as bases de dados tecnológicas.

A busca dos pedidos de depósito de patentes foram realizadas no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), na *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *European Patent Office* (EPO), no *United States Patent and Trademark Office* (USPTO). Os dados foram coletados no mês de Agosto de 2015 e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 6.04).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***3.1 Patentes***

A prospecção tecnológica é uma maneira sistemática para mapear o desenvolvimento científico e tecnológico, que é capaz de influenciar significativamente uma indústria, uma economia ou uma sociedade. Ela utiliza informações de patentes, que é uma ferramenta muito eficaz que permite a identificação de tecnologias relevantes, rotas tecnológicas, inovações, processos, produtos, pesquisa, desenvolvimento e inovação [17]. Desta forma apresenta-se importante para avaliações científicas e tecnológicas, uma vez que há uma necessidade

crescente de transferência de tecnologias entre academia e indústria, com o objetivo de construção de links que podem trazer benefícios para ambos os setores [18].

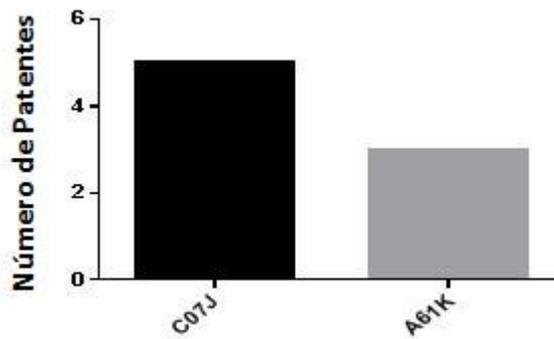
De acordo com esta perspectiva, a avaliação tecnológica foi realizada nas bases de dados especializadas, incluindo patentes depositadas no período entre janeiro de 2000 e junho de 2015. A seleção das patentes foi com base em critérios de inclusão: patentes publicadas em Inglês ou Português, que apresentavam as palavras-chaves Diosgenina, sistema cardiovascular, hipertensão, aterosclerose e dislipidemias e suas associações no título, resumo e corpo do texto. Os resultados para Diosgenina foram os seguintes: 21 (18,75%), 6 (5,36%) e 85 (75,89%) para a solicitação de patente depositado nas bases do USPTO, EPO, a WIPO, respectivamente e nenhuma patente encontrada no INPI. Para os termos "*diosgenin and cardiovascular system*", "*diosgenin and atherosclerosis*" e "*diosgenin and dyslipidemia*" foram encontradas 5 (62,5%), 2 (25%) e 1 (12,5%) patentes, na base de dados WIPO, respectivamente. Os dados para a análise de palavras-chave e as suas associações, considerando o número de pedidos de patentes apresentados por banco de dados, de acordo com os termos utilizados são mostrados na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Número de patentes depositadas nos bancos de dados tecnológicos INPI, USPTO, EPO e WIPO por palavras-chave.**

Palavras-chave	INPI	USPTO	EPO	WIPO
<b>Diosgenina ou <i>Diosgenin</i></b>	0	21	6	85
<b>Sistema cardiovascular ou <i>cardiovascular system</i></b>	1	1235	289	2963
<b>Hipertensão ou <i>hypertension</i></b>	101	6220	792	4328
<b>Aterosclerose ou <i>atherosclerosis</i></b>	53	4922	491	1577
<b>Dislipidemia ou <i>dyslipidemia</i></b>	4	962	97	304
<b>Diosgenina e sistema cardiovascular ou <i>Diosgenin and cardiovascular system</i></b>	0	0	0	5
<b>Diosgenina e hipertensão ou <i>Diosgenin and hypertension</i></b>	0	0	0	0
<b>Diosgenina e aterosclerose ou <i>Diosgenin and atherosclerosis</i></b>	0	0	0	2
<b>Diosgenina e dislipidemia ou <i>Diosgenin and dyslipidemia</i></b>	0	0	0	1

A Classificação Internacional de Patentes (CIP), na qual as patentes são classificadas de acordo com a aplicação é dividida em: oito (8) seções, 21 subseções, 120 classes, 628 subclasses e 69.000 grupos [19-20]. Dessa forma, foram analisadas as 8 (oito) patentes depositadas de Diosgenina com alegação de atividade no sistema cardiovascular conforme a

CIP **Fig. (2)** e foi observado que a seção C, (química e metalúrgica) é a mais depositada, seguida da seção A (necessidades humanas).



**Fig. (2).** Patentes depositadas nos bancos de dados tecnológicos de acordo com o código de classificação internacional. C07J: química e metalúrgica; A61K: necessidades humanas.

Enquanto a subclasse A61K trata das preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas (dispositivos ou métodos especialmente adaptados para dar aos produtos farmacêuticos formas físicas determinadas ou para sua administração), a subclasse C07J refere-se às substâncias alocadas na área de química orgânica na classe de esteroides. As 8 (oito) patentes listadas no WIPO by Patent Cooperation Treaty (PCT) relatam a síntese de Diosgenina através de diferentes mecanismos (síntese ácida, hidroalcoólica e métodos isotérmicos) e as ações farmacológicas descritas foram: ação anti-inflamatória, regulação de hormônios esteroidais por ação no sistema endócrino, capacidade de controle da aterosclerose por atuar reduzindo os níveis de colesterol plasmático, desta forma, atuando como prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (**Tabela 2**).

**Tabela 2 – Patentes relatando as aplicações tecnológicas da Diosgenina com aplicação no sistema cardiovascular depositadas nos bancos de dados INPI, USPTO, EPO e WIPO.**

Número da Patente (Ref. #)	Ano	Título da Patente	Inovação
CN 1451665 [23]	2003	Carboxylic derivs. Of diosgenin and process for preparing same	Produção de composto caboxílico com modificações estruturais da diosgenina e processo de preparação. Este composto apresentou ação terapêutica em doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.
CN 1517361 [24]	2004	Diosgenin butanedioic acid monoester derivative and its preparation method and application	A Diosgenina obtida a partir de um derivado de éster de monosuccinato foi utilizada para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e seu processo de preparação foram divulgados.

CN 1517360 [25]	2004	Diosgenin amino and ester derivative and its preparation method and application	A Diosgenina obtida através de derivado de éster e aminoácidos foi utilizada para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e seu processo de preparação foram divulgados.
WO 086411 [26]	2003	Compounds and preparation methods of carboxylate and monoester succinate derivative of diosgenin.	A presente invenção de derivados caboxilatos e monoéster succinato de Diosgenina, na qual a obtenção dos derivados se dá pela modificação de aminoácidos. Os compostos da presente invenção têm boa solubilidade em água, e pode ser usado no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.
CN 101333241 [27]	2008	Process for extracting dioscin, preparation thereof and use	A invenção refere-se a um método para extração de Diosgenina a partir da espécie vegetal <i>Dioscorea zingiberensis</i> , conhecida na medicina tradicional chinesa como inhame;apreparação de medicamentos e a aplicação do <i>Dioscorea zingiberensis</i> na foram investigadas para prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. Os ensaios clínicos que mostraram que a Diosgenina extraída na presente invenção da <i>Dioscorea zingiberensis</i> tem um efeito significativo sobre a doença cardíaca coronária, a hiperlipidemia e outras doenças cardiovasculares.
CN 102786575 [28]	2012	Diosgenin-3-derivative as well preparation method and application thereof	A inovação refere-se a Diosgenina-3-derivado, que é derivada de reações de de éster de ácido 4-Diosgenina-6-aminocaprício e o éster de Diosgenina 7-2-amino-15-glutarato, que são compostos novos. O composto é estável em meio ácido fraco e fácil de ser preparados em sal, a solubilidade da Diosgenina foi melhorada. A ação da Diosgenina-3-derivado é superior à Diosgenina na diminuição da inflamação e atividade antitumoral. A Diosgenina-3-derivativo foi utilizada principalmente para diminuir a inflamação e verificar a ação antitumoral.
CN 102702300 [32]	2012	Compound for preventing or treating autoimmune diabetes and preparation method and application thereof	A invenção revela um composto para prevenir ou tratar a diabetes auto-imunes. A inovação é representada pela descrição de um método para a preparação do composto e sua aplicação farmacológica. O composto de fármaco duplo de Diosgenina e ibuprofeno ou aspirina proporcionado pela invenção preveniu e tratou de forma efetiva a diabetes auto-imune causada pelo dano de células beta das ilhotas do pâncreas, mas também apresentou melhores efeitos relacionados a anti-inflamação, analgesia e semelhantes, e uma nova escolha é fornecido para medicação clínica.
WO 030603 [33]	2000	Slimming compositions containing a dioscorea opposita extract	A invenção refere-se à utilização de extratos de <i>Dioscorea opposita</i> , em que foi identificada a Diosgenina, um análogo estrutural de colesterol, capaz de ser usado industrialmente, por apresentar

			<p>elevada atividade de emagrecimento pois o composto foi isolado por meio de uma operação original em adipócitos humanos; a redução de lipídeos e triglicerídeos intra-adipócitos, nomeadamente reduzindo o RNAm que codifica a identificação dos receptores de LDL e para enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos (HMG-CoA redutase e HMG-CoA sintetase). Demonstrando que a Diosgenina pode atuar regulando o metabolismo de lipoproteínas e favorecendo o emagrecimento.</p>
--	--	--	--

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro. LDL: lipoproteína de baixa densidade. HMG-CoA: 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoenzimaA

A estrutura química da Diosgenina consiste em uma aglicona hidrófoba esteroide, este fitoestrógeno possui estrutura semelhante à progesterona e ao estradiol [21-22]. Liu e colaboradores [23], Wang e colaboradores [24-25] propuseram em suas inovações a modificação estrutural da Diosgenina, na sua porção hidroxila, por incorporação de derivados carboxílicos e ésteres, com aplicação clínica voltada para ação cardiovascular.

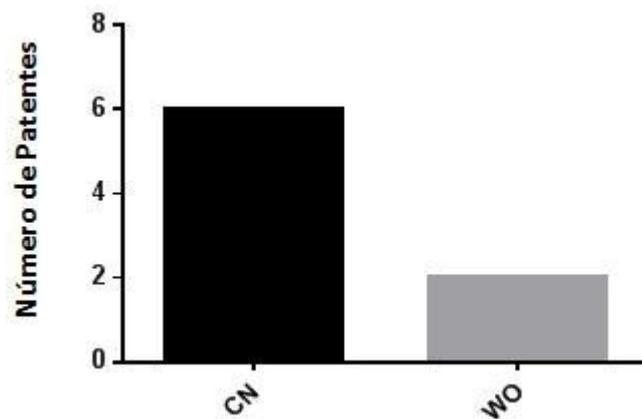
A administração Diosgenina em protocolos experimentais de forma oral é limitada devido à baixa solubilidade aquosa da molécula e restrita pela biodisponibilidade oral absoluta. Administração oral de fármacos com baixa solubilidade aquosa e baixo perfil de dissolução resulta em incompleta absorção do fármaco [5]. Liu e colaboradores [26] propuseram a produção do derivado carboxilado e derivado monoéster de Diosgenina, as substituições ocorreram no grupamento alquila, o resultado obtido foi o aumento da solubilidade da Diosgenina em água, e apresentou como aplicação terapêutica o tratamento e a prevenção de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

A Diosgenina, membro das saponinas esteroides, pode ser encontrada em diversas espécies vegetais, apresentando-se como um dos principais constituintes bioativos de plantas [4]. Ge e colaboradores [27] em sua invenção modificaram o método de extração da Diosgenina com a utilização de enzimas para remoção de impurezas grossieras e weak-polar resina macroscópica e como matéria prima o extrato de *Dioscorea zingiberensis*. Este método de preparação mostrou-se eficiente na conservação de Diosgenina durante o transporte e armazenamento, visto que, essa substância também pode ser utilizada para preparar comprimidos revestidos, xarope, solução oral, gotas ou cápsulas. Os ensaios clínicos demonstram que a Diosgenina extraída na presente invenção da espécie *Dioscorea zingiberensis* tem um efeito significativo sobre a doença cardíaca coronária, a hiperlipidemia e outras doenças cardiovasculares.

Huang e colaboradores [28] por método de modificação estrutural produziram a Diosgenina-3-derivado, que apresenta a vantagem de ser uma sequencia de ésteres, utilizaram a metodologia de preparo que aumenta o rendimento da substância, tornando o composto

estável em meio ácido, fácil preparação de sais e foi possível melhorar a solubilidade da Diosgenina. A Diosgenina-3-derivativo foi utilizada principalmente para diminuir a inflamação e resistência a tumores.

É perceptível que a China está na vanguarda como o país que têm o maior numero de patentes depositadas sobre a Diosgenina nas últimas décadas **Fig. (3)**. Os países desenvolvidos, como Estados Unidos, Japão e China mantêm um número crescente de arquivos de patentes. Além disso, eles possuem os maiores bancos de dados especializados em patentes comerciais. Esse fato pode ser explicado por uma lacuna no conhecimento entre países desenvolvidos e os subdesenvolvidos a respeito do acesso as informações tecnológicas. A falta de inovação e do uso da propriedade intelectual, a não promoção e investimento em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em países subdesenvolvidos pode ser causada pela ausência de infraestrutura básica necessária para o desenvolvimento de conhecimentos e para transferência de tecnologia local [29-30].



**Fig. (3).** Países que apresentaram patentes sobre Diosgenina. CN = China; WO = PCT.

Quando os arquivos de patentes são agrupados em um arranjo temporal é possível detectar oscilação com o aumento nos números de patentes a partir do ano de 1990. No entanto, o processo de proteção tecnológica em diversos setores de aplicação industrial da Diosgenina para aplicação no sistema cardiovascular é considerado insuficiente quando comparado com o número de publicações, especialmente quando se considera a relevância científica deste composto **Fig. (4)**.



**Fig. (4).** Distribuição do número de patentes registradas (depositadas) nas últimas décadas.

A Diosgenina apresenta um papel benéfico contra doenças metabólicas (diabetes e hipertensão), bem como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória e antitumoral [31]. O composto duplo Diosgenina-ibuprofeno e Diosgenina-aspirina proposto por Huang e colaboradores [32] preveniu efetivamente e se mostrou eficaz para o tratamento de diabetes auto-imune causada pelo dano das células beta do pâncreas e também apresenta melhores efeitos anti-inflamatório e analgesia, tornando-se e uma nova escolha a disposição para medicação clínica.

A Diosgenina extraída de *Dioscorea opposita* quando administrada em adipócitos humanos reduziu os lipídeos e triglicérides intra-adipócitos, por diminuir a expressão de RNAm que é o responsável por codificar os receptores de LDL e para enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídeos (HMG-CoA redutase e inibidores da HMG-CoA-sintase), mostrando que a Diosgenina apresenta potencial farmacêutico industrial [33].

### 3.2. Artigos

A análise em referências biográficas virtuais abordaram os benefícios científicos da Diosgenina no sistema cardiovascular. A busca foi realizada associando os termos *Diosgenina e sistema cardiovascular* ou *Diosgenin and Cardiovascular system*, foram encontrados 124 (79,48%) artigos na base de dados *ScienceDirect*, 18 (11,54%) no *PubMed* e 14 (8,98%) na *Biblioteca Virtual de Saúde*, com um total de 156 artigos. Esse número de artigos demonstra que a maioria da produção está relacionada a publicações sem proteção. De acordo com a evolução temporal, quando o número de publicação em bases de dados científicos é observado, nota-se que tenha ocorrido um gradual aumento da quantidade de artigos sobre

Diosgenina ao longo dos anos, com especial atenção para o ano de 2013, quando havia 27,27% destas publicações, em junho de 2015 havia uma quantidade significativa de artigos 16,88 %, o que demonstra o aumento do interesse na pesquisa sobre este composto. Esses artigos foram organizados por ano de publicação e está disposto na **Fig. (5)**.



**Fig. (5).** Distribuição dos artigos por ano de publicação nas bases de dados (PubMed, Science Direct e Bireme).

Após a exclusão de artigos duplicados, cada título e resumo foram lidos, a fim de selecionar e classificar aqueles que, de fato, forneciam informações sobre Diosgenina e suas aplicações no sistema cardiovascular. Após uma reavaliação, o número de estudos elegíveis que entrou na revisão sistemática foi reduzido para 12 (7,79%) artigos. A **Tabela 3** mostra a distribuição dos artigos selecionados.

**Tabela 3 – Publicações sobre Diosgenina e aplicação no sistema cardiovascular em bancos de dados Science Direct, PubMed e Biblioteca Virtual de Saúde, 2010-2015.**

Referências	Títulos	Periódico/Ano de Publicação	Principais Resultados
[34]	Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome.	Adv. Nutr, 2015	Avaliar os efeitos fisiológicos de três compostos bioativos do feno-grego no contexto da síndrome metabólica.  Por ação dos componentes bioativos como Diosgenina, 4-hydroxyisoleucine o feno grego é potencialmente útil como parte de novas estratégias para tratar doença metabólica.
[42]	Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of	Eur J Pharmacol, 2014	Investigar o efeito protetor da Diosgenina na hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos.  O tratamento com Diosgenina proporcionou uma melhora significativa no sentido de

	diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.		preservar as alterações hemodinâmicas e minimizou o estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e de apoptose induzida por monocrotalina em ratos.
[41]	Anti-arrhythmic effect of diosgenin in reperfusion-induced myocardial injury in a rat model: activation of nitric oxide system and mitochondrial KATP channel.	J Physiol Sci, 2014	Avaliar os efeitos da Diosgenina sobre a lesão isquemia-reperfusão do miocárdio, com mecanismos de ação envolvendo os canais KATP mitocondriais (mitoKATP) e óxido nítrico (NO).  Os resultados mostraram que a Diosgenina apresenta efeitos cardioprotetores contra dano de reperfusão do miocárdio através da ativação dos canais mitoKATP.
[43]	Diosgenin attenuates inflammatory response induced by myocardial reperfusion injury: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels.	J Physiol Biochem, 2014	Investigar o efeito da Diosgenina sobre a resposta inflamatória, assim como, avaliar a hipótese de que o efeito cardioprotetor da diosgenina estar associado com a ativação dos canais KATP mitocondriais (mitoKATP).  Os resultados indicam que o pré-tratamento com Diosgenina induziu uma melhora na função cardíaca durante a reperfusão, através da redução da produção de mediadores inflamatórios e pela ativação dos canais mitoKATP.
[35]	Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.	Phytomedicine, 2014	Investigar os efeitos da Diosgenina sobre o risco cardiovascular, a secreção de insulina e composição do pâncreas em ratos diabéticos.  Os dados obtidos do presente estudo indicam que a Diosgenina apresenta efeitos potenciais sobre o risco cardiovascular induzido por estreptozotocina.
[38]	Diosgenin interferes coronary vasoconstriction and inhibits osteochondrogenic transdifferentiation of aortic VSMC in CRF rats.	Biochimie, 2014	Verificar o efeito da Diosgenina sobre a resistência do fluxo coronariano e investigar se o potencial de calcificação antivascular está associado ou não com a transdiferenciação osteocondrogênica das células do músculo liso vascular (VSMC).  Sugere que a Diosgenina apresenta potencial na melhora substancial de tais patologias em ratos com Insuficiência renal crônica (IRC).
[45]	Derivatives on the Diosgenin Absorption in Caco-2 Cell Monolayer and Rats.	Biol. Pharm. Bull, 2014	Analisar e comparar os efeitos de $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) na permeabilidade da Diosgenina utilizando como modelo de perfusão células de jejuno Caco-2.  Os derivados $\beta$ -CD melhorou significativamente a baixa solubilidade da

			Diosgenina.
[39]	Diosgenin improves vascular function by increasing aortic eNOS expression, normalize dyslipidemia and ACE activity in chronic renal failure rats Mol Cell.	Biochem, 2013	<p>Avaliar o efeito antioxidante da Diosgenina em modelos animais com insuficiência renal crônica (IRC) e disfunção endotelial (ED) induzida.</p> <p>A Diosgenina apresenta potencial para proteger a vasculatura contra o estresse oxidativo e dislipidemias, além de melhorar a função vascular em ratos com IRC.</p>
[40]	Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats Mol Cell.	Biochem, 2013	<p>Verificar o efeito antioxidante de Diosgenina no processo calcificação vascular em ratos com insuficiência renal crônica.</p> <p>A Diosgenina inibiu a IRC induzida, aumentou os níveis de óxido nítrico, demonstrando que esta molécula apresenta benefícios globais contra a insuficiência renal induzida e ao estresse oxidativo vascular associado à calcificação.</p>
[44]	Preconditioning with diosgenina and treadmill exercise preserves the cardiac toxicity of isoproterenol in rats.	J Physiol Biochem, 2013	<p>Avaliar a função antioxidante e preventiva da Diosgenina em ratos Wistar machos com Infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (ISPO).</p> <p>O estudo mostra que a combinação de tratamento com Diosgenina e exposição a exercícios físicos fornecem efeito cardioprotetor em ratos com Infarto agudo do miocárdio induzida por ISPO, diminuindo a produção de peróxidos lipídicos e melhorar a ação dos antioxidantes.</p>
[36]	Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKKbeta and IRS-1 pathways.	Atherosclerosis, 2012	<p>Verificar e confirmar a atividade anti-inflamatória e a benéfica da Diosgenina na modulação das ações de insulina no endotélio, em síndromes metabólicas.</p> <p>A Diosgenina melhorou a disfunção endotelial envolvidos na resistência à insulina através da fosforilação do receptor de insulina substrato-1 (IRS-1), mostrando potencial para aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares.</p>
[37]	Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats.	Eur J Pharmacol, 2012	<p>Investigar a função protetora da Diosgenina sobre os marcadores do estresse oxidativo e verificar as alterações histopatológicas em aorta de ratos diabéticos induzida por estreptozotocina (ZTC).</p> <p>Os resultados mostraram propensão da Diosgenina em modular a defesa antioxidante e apresentar capacidade de diminuir a</p>

			peroxidação lipídica na aorta de ratos diabéticos.
--	--	--	--

No controle das dislipidemias a Diosgenina atua regulando a sinalização de insulina e glucagon, como um bom controlador glicêmico de diabetes melitus tipo 1 e 2, pois os tecidos alvos são o pâncreas, fígado e músculo esquelético. É uma substância capaz de restaurar lesões de células B pancreáticas e modula positivamente as células adiposas. Em estudos com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, os resultados para os testes de glicemia, hemoglobina glicada, LDL (lipoproteína de baixa densidade) colesterol, Colesterol total, HDL (lipoproteína de alta densidade) colesterol, glicose-6-fosfatase e número de células B do pâncreas, foram restaurados aos valores de referência após 30 dias de tratamento com uma dose diária oral de 10 mg/Kg de Diosgenina [34-35].

Dessa forma, estudos corroboram que a Diosgenina tem apresentado um potencial terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares. Experimentos com animais nos últimos cinco anos apresentam resultados positivos que verificaram a Diosgenina como a responsável pela melhora da função endotelial com capacidade de inibir a inflamação, a resistência a insulina e estresse oxidativo no tecido vascular [36-37]. Em modelos animais com insuficiência renal crônica a Diosgenina favoreceu a proteção da função vascular atenuando a calcificação, pela sua capacidade de aumentar a expressão e síntese de óxido nítrico endotelial e por inibir a transdiferenciação osteocondrogênica vascular [38-40].

Outras evidências para o efeito cardioprotetor da Diosgenina surgiu a partir de estudos com modelos animais de doenças cardiovasculares, como hipertensão pulmonar, lesão de isquemia e reperfusão e infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol. Badalzadeh e Colaboradores [41] observaram em corações de ratos com isquemia induzida a hemodinâmica cardíaca, através das enzimas creatino-fosfoquinase (CK-MB) e Lactato desidrogenase (LDH) e a Diosgenina foi capaz de diminuir significativamente a concentração dessas enzimas e apresentou efeito cardioprotetor contra danos de reperfusão do miocárdio através da ativação dos canais  $K_{ATP}$  mitocondriais (mito $K_{ATP}$ ).

O tratamento com Diosgenina, de forma dose-dependente, reduziu a calcificação aórtica e preveniu a calcificação vascular por ser capaz de atuar regulando os marcadores de estresse oxidativo, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo a ação antioxidante [42-44]. Estes estudos suportam a conclusão geral de que a Diosgenina possui atividade anti-inflamatória, antioxidante e propriedades vasodilatadoras.

Tem sido relatado na literatura que a Diosgenina induziu um relaxamento da artéria coronária, através da proteína G quinase, por meio da cascata de sinalização e ativação dos canais de cálcio [14].

A hiperlipidemia apresenta uma relação estreita com danos cardiovasculares, os mecanismos associados incluem a peroxidação lipídica relacionada ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido identificado como um principal determinante de dano celular e contribui para a iniciação e progressão da disfunção cardiovascular. Em estudos desenhados para investigar os efeitos protetores vasculares de Diosgenina em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, Diosgenina melhorou o perfil lipídico e modulou o estresse oxidativo através da regulação dos antioxidantes em ratos hiperlipidêmicos [31].

A Diosgenina tem sido indicada como tendo potencialmente várias aplicações terapêuticas, uma vez que apresenta um impressionante perfil farmacológico, podendo ser utilizada no tratamento de diferentes patologias, além de ser utilizada na indústria farmacêutica como material fonte para a produção de hormônios esteroides [45]. Dessa forma muitas das pesquisas desenvolvidas podem ser protegidas e publicadas na forma de patentes, sendo a Diosgenina bastante promissora para o tratamento e prevenção de doenças do sistema cardiovascular.

As necessidades do mercado farmacêutico aliadas ao reconhecimento de que pesquisas com princípios ativos derivados de plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novos fármacos levaram a um aumento do número de publicações neste campo, em virtude do reconhecimento da importância desta área de estudo por parte das instituições privadas ou governamentais [46]. Pode ser verificado que é necessário incentivar cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas voltadas para as áreas de tecnologia e inovação, aumentando a comunicação entre a comunidade acadêmica e as empresas do setor farmacêutico.

#### **4 DESENVOLVIMENTOS ATUAIS E FUTUROS**

Por meio na análise das bases tecnológica e científica, os resultados mostram que existe interesse da ação da Diosgenina no sistema cardiovascular, porém o campo continua aberto para novas pesquisas serem desenvolvidas, além disso, foi constatada a ausência de patentes brasileiras envolvendo a Diosgenina. Nas bases tecnológicas o foco está centrado nas áreas para os estudos químicos da Diosgenina como esteroide e na científica nas preparações para finalidade médica, com ação no sistema cardiovascular, sendo importante destacar que há o interesse da indústria farmacêutica por novos produtos gerados a parti de fontes naturais.

Considerando que a inovação é essencial para a sobrevivência das indústrias farmacêuticas, verificou-se com a busca em bases de dados de patentes o potencial tecnológico deste composto para diversas áreas. Foi possível observar que o número de patentes depositadas relacionadas com a Diosgenina é muito menor do que o número de artigos científicos publicados nos periódicos internacional. Estes resultados mostraram uma tendência mundial onde, tradicionalmente, os grupos de pesquisa preferem divulgar os resultados encontrados em periódicos internacionais para divulgação na comunidade científica.

Portanto, é necessário para estimular uma cultura que incentiva a proteção dos resultados das invenções através das patentes, com o propósito de crescimento científico e tecnológico com ênfase na descoberta de um maior número de moléculas derivadas de produtos naturais.

## REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Geneva: Fact sheet n° 317, 2011.
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, 2007.
- [3] Tang YN, Pang YX, He XC, et al. UPLC-QTOF-MS identification of metabolites in rat biosamples after oral administration of Dioscorea saponins: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 165: 127-140.
- [4] Patel K, Gadewar M, Tahillyani V, Patel DS. A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Nat. Prod. Bioprospect* 2012; 2: 46-52.
- [5] Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashy K, Hashimoto F. Enhancement of Diosgenin Distribution in the Skin by Cyclodextrin Complexation Following Oral Administration. *Biol. Pharm. Bull* 2013; 36(1): 36-40.
- [6] Yun-Cheng LV, Yang J, Yao F, et al. Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the MiR-19b-induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis* 2015; 240: 80-89.
- [7] Son IS, Kim JH, Sohn HY, Son KH, Kim JS, Kwon CS. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Biosci Biotech Biochem* 2007; 71(12): 3063-3071.
- [8] Chen-Yan T, Yu-Mei, Yu SL, et al. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenina. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2015; 13(8): 0578-0587.
- [9] Gao, M, Chen L, Yu, H, Sun Q, Kou J, Yu B. Diosgenin down-regulates NF- $\kappa$ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *International immunopharmacology* 2013; 15: 240-245.
- [10] Raju J, Rao C. Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine. *Bioactive Compounds in Phytomedicine* 2012; 1: 125-142.
- [11] Wnag WC, Liu SF, Chang WT, et al. The effects of diosgenina in the Regulation of renal proximal tubular fibrosis. *Experimental cell research* 2014; 323: 255-262.

[12] Raju J, Mehta. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutricion and Cancer* 2009; 61(1): 27-35.

[13] Narula A, Kuman S, Srivastava PS. Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. *Biotechnology Lett* 2007; 29: 623-629.

[14] Esfandiarei M, Lam JTN, Yazdi SA, et al. Diosgenin Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Function by Regulating Cell Viability, Migration, and Calcium Homeostasis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, 336: 925-939.

[15] Dias KLG, Correia NA, Pereira KKG. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology* 2007, 574: 172-178.

[16] Hao S, Xu R, Li D, Zhu Z, Wang T, Liu K. Attenuation of Streptozotocin-Induced Lipid Profile Anomalies in the Heart, Brain, and mRNA Expression of HMG-CoA Reductase by Diosgenin in Rats. *Cell Biochem Biophys* 2015, 72(3): 741-749.

[17] Montecchi T, Russo D, Liu Y. Searching in Cooperative Patent Classification: Comparison between keyword and concept-based search. *Advanced Engineering Informatics* 2013; 27(3): 335-345.

[18] Costa JP, Oliveira JS, Rezende-Junior LM, Freitas RM. Phytol a Natural Diterpenoid with Pharmacological Applications on Central Nervous System: A Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2014; 8(3): 194-205.

[19] Almeida AAC, Costa JP, Carvalho RBF, Sousa DP, Freitas RM. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Research* 2012, 1448: 56-62.

[20] Serafini MR, Quintans JSS, Antonioli AR, Santos M RV, Quintans-Junior LJ. Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. *Revista Geintec* 2012; 2(5): 427-435.

[21] Vincken JP, Heng L, Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 2007; 68: 275-297.

[22] Alice LSA, Ching CK, Allen TCL, et al. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. *European Journal of Pharmacology* 2004; 502: 123-133.

[23] Liu z, Wang X, Wang X. Carboxylic derivs. of diosgenin and process for preparing same. CN 1451665, 2003.

[24] Wang X, Ye Z, Wang L. Diosgenin butanedioic acid monoester derivative and its preparation method and application. CN1517361, 2004.

[25] Wang X, Ye Z, Wang L. Diosgenin amino and ester derivative and its preparation method and application. CN1517360, 2004.

[26] Liu Z, Wang X, Ye Z, et al. Compounds and preparation methods of carboxylate and monoester succinate derivative of diosgenina. WO086411, 2003.

[27] Ge H, Zhang J. Process for extracting dioscin, preparation thereof and use. CN101333241

[28] Huang W, He Y, Chen QM. Diosgenin-3-derivative as well preparation method and application thereof. CN102786575, 2012.

[29] Takagi Y, Czajkowski A. WIPO services for access to patent information - Building patent information infrastructure and capacity in LDCs and developing countries. World Patent Inf 2012; 34(1): 30-36.

[30] Vu TA. An insight into the patent systems of fast developing ASEAN countries. World Pat Inf 2012; 34(2): 134-142.

[31] Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Wu X, Zhao Y. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Chemico-Biological Interactions 2010; 184(3):366-375.

[32] Huang W, He Y, Wu X, Lu Y, Chen J. Compound for preventing or treating autoimmune diabetes and preparation method and application thereof. CN102702300

[33] Lintner K. Slimming compositions containing a dioscorea opposita extract. WO030603, 2000.

[34] Fuller S, Steohens J. Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. Adv. Nutr 2015; 6:189-197.

- [35] Kalailingam P, Kannaian B, Tamilmanil E, Kaliaperumal R. Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2014; 21:1154-1161.
- [36] Liu K, Zhao W, Gao X, Huang F, Kou J, Liu B. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK $\beta$  and IRS-1 pathways. *Atherosclerosis* 2012; 223:350-358.
- [37] Pari L, Monisha P, Jalaludeen AM. Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 691:143-150.
- [38] Manivannan J, Shanthakumar J, Arunagiri P, Raja B, Balamurugan E. Diosgenin interferes coronary vasoconstriction and inhibits osteochondrogenic transdifferentiation of aortic VSMC in CRF rats. *Biochimie* 2014; 102:183-87.
- [39] Manivannan J, Balamurugan E, Silambarasan T, Raja B. Diosgenin improves vascular function by increasing aortic eNOS expression, normalize dyslipidemia and ACE activity in chronic renal failure rats *Mol Cell. Biochem* 2013; 384:113-120.
- [40] Manivannan J, Barathkumar TR, Sivasubramanian J, Arunagiri P, Raja B, Balamurugan E. Diosgenin attenuates vascular calcification in chronic renal failure rats *Mol Cell. Biochem* 2013; 378:9-18.
- [41] Badalzadeh R, Yousefi B, Majidinia M, Ebrahimi H. Anti-arrhythmic effect of diosgenin in reperfusion-induced myocardial injury in a rat model: activation of nitric oxide system and mitochondrial KATP channel. *J Physiol Sci* 2014; 64:393-400.
- [42] Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor- $\beta$  in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:379-387.
- [43] Ebrahimi H, Badalzadeh R, Mohammadi M, Yousefi B. Diosgenin attenuates inflammatory response induced by myocardial reperfusion injury: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol Biochem* 2014; 70:425-432.
- [44] Salimeh A, Mohammadi M, Rashidi B. Preconditioning with diosgenin and treadmill exercise preserves the cardiac toxicity of isoproterenol in rats. *J Physiol Biochem* 2013; 69:255-265.

[45] Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin Derivatives on the Diosgenin Absorption in Caco-2 Cell Monolayer and Rats. *Biol. Pharm. Bull* 2014; 37(1):54–59.

[46] Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39:603-613.

**CAPÍTULO II:** Desenvolvimento da formulação lipossomal contendo uma saponina esteroidal e avaliação da atividade cardioprotetora

## **Desenvolvimento da formulação lipossomal contendo uma saponina esteroidal e avaliação da atividade cardioprotetora**

**Michely Laiany Vieira Moura<sup>1</sup>; Marcelo Bezerra Mendes<sup>2</sup>; Nereide Stela Santos Magalhães<sup>3</sup>; Claudia Quintino da Rocha<sup>4</sup>; Wagner Vilelas<sup>4</sup>; Aldeidia Pereira de Oliveira<sup>5</sup>; Hercilia Maria Lins Rolim<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada (NANOSFAR) do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Doutorando em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife – PE, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental de Litoral Paulista, São Vicente – UNESP. Praça Infante D. Henrique, S/N, CEP 11330-900, São Vicente – São Paulo, Brasil.

<sup>5</sup>Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

### **RESUMO**

A Diosgenina é uma saponina esteroidal que têm sido indicada para diversas aplicações farmacológicas, podendo ser utilizada no tratamento de patologias como hiperglicemia e hiperlipidemia; e através de diferentes mecanismos apresenta atividade antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral. Na indústria farmacêutica têm-se estabelecido como material para a produção de hormônios esteróides e utilizada na terapêutica de reposição hormonal. Entretanto, a administração oral da Diosgenina é limitada devido à baixa solubilidade aquosa e limitada pela biodisponibilidade oral absoluta. Uma alternativa para transpor esta limitação é a utilização de nanossistemas carregadores de fármacos para encapsulação da Diosgenina, a exemplo dos lipossomas. Neste contexto, a Diosgenina foi encapsulada em lipossomas convencionais e peguilados, os quais foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas e tempo de estabilidade. Depois de verificado as adequadas condições de estabilidade e eficiência de encapsulação os lipossomas contendo Diosgenina foram utilizados para avaliar a ação no Sistema Cardiovascular em testes experimentais *in vivo*. As formulações (DL e DL<sub>PEG</sub>) foram produzidas utilizando o método da hidratação do filme lipídico. Os lipossomas convencionais carregados positivamente contendo Diosgenina (DL) apresentaram tamanho de partículas de  $113,3 \pm 3,20$  nm, índice de polidispersão  $0,304 \pm 0,018$ , potencial zeta  $+32,8 \pm 1,39$  mV e pH 7,4. Enquanto que, os lipossomas peguilados contendo Diogenina (DL<sub>PEG</sub>) apresentaram tamanho de partículas de  $94,7 \pm 0,28$  nm, índice de polidispersão  $0,285 \pm 0,024$ , potencial zeta  $-11,6 \pm 1,99$  mV e pH 7,4. Os resultados indicam que ambas as formulações lipossomais contendo Diosgenina (DL e DL<sub>PEG</sub>) são adequadas para a realização de testes *in vivo*. No presente estudo os lipossomas contendo Diosgenina não apresentaram resposta hipotensora esperada nas doses utilizadas de 1, 2 e 4

mg/Kg (i.v.), visto que, este fitoestrógeno vem sendo amplamente demonstrado na literatura como um excelente modulador no sistema cardiovascular. Contudo, traz-se a perspectiva que com o aumento do rendimento de Diosgenina incorporada em nanossistemas lipossomais, a resposta hipotensora esperada possa ser verificada.

**Palavras-chave:** Diosgenina, lipossomas, lipossomas peguilados, ação cardioprotetora, hipotensão.

## ABSTRACT

Diosgenin is a steroidal saponin that have been used for many pharmacological applications and can be used in the treatment of diseases such as hyperglycemia and hyperlipemia; and through different mechanisms has antifungal activity, antiinflammatory and antitumor activity. In the pharmaceutical industry it has been established as materials for the production of steroids and hormones used in hormone replacement therapy. However, oral administration of Diosgenin is limited due to low aqueous solubility and limited by an absolute oral bioavailability. An alternative to overcome this limitation is to use nanosystems chargers drugs for encapsulation of Diosgenin, like the liposomes. In this context, Diosgenin was encapsulated in conventional liposome and pegylated, which were characterized as their properties and stability time. Once verified the proper conditions for stability and encapsulation efficiency liposomes containing Diosgenin were used to evaluate the action on the cardiovascular system in experimental tests in vivo. The formulations (DL and DL<sub>PEG</sub>) were produced using the method of hydrating the lipid film. Conventional liposomes containing positively charged Diosgenin (DL) had particle size of  $113.3 \pm 3.20$  nm, polydispersity  $0.304 \pm 0.018$ , zeta potential of  $+32.8 \pm 1.39$  mV and pH 7.4. While the pegylated liposomes containing Diogenina (DL<sub>PEG</sub>) had a particle size of  $94.7 \pm 0.28$  nm, polydispersity  $0.285 \pm 0.024$ , zeta potential of  $-11.6 \pm 1.99$  mV and pH 7.4. The results indicate that both liposomal formulations containing Diosgenin (DL and DL<sub>PEG</sub>) are suitable for carrying out in vivo tests. In the present study Diosgenin-containing liposomes showed no hypotensive response expected at dosages of 1, 2 and 4 mg / kg (i.v.), whereas, the phytoestrogen has been amply demonstrated in the literature as an excellent modulator of the cardiovascular system. However, it brings up the prospect that with the increase of the yield Diosgenin incorporated into liposomal nanosystems, the hypotensive response expected can be verified.

**Keywords:** Diosgenin, liposomes, pegylated liposomes, cardioprotective action, hypotension.

## 1 INTRODUÇÃO

Diosgenina é uma saponina esteróide que ocorre naturalmente em uma variedade de plantas do gênero *Dioscorea sp.* É uma molécula análoga ao colesterol com atividade comprovada sobre as dislipidemias, por diminuição considerável dos níveis de triglicerídeos e colesterol total, favorecendo a proteção cardiovascular e o seu potencial terapêutico ocorre devido à ação nas atividades de distúrbios cardiovasculares associados à resistência à insulina

e inflamação. A Diosgenina melhora o metabolismo do colesterol que é capturado pelos macrófagos, suprimindo a progressão da aterosclerose. Em estudos realizados em ratos, por ação hipolipidêmica atua como prevenção para doenças cardiovasculares (YUN-CHENG et al., 2015; LIU et al., 2012).

É uma aglicona que apresenta bioatividade anticarcinogênica, imunoestimulante, atividade antioxidante, atividade antidiabética e propriedades anti-inflamatórias (HAO et al., 2015; WNAG et al., 2014; XIN et al., 2013). Por ser um fitohormônio a Diosgenina é utilizada na indústria farmacêutica como matéria prima para a síntese parcial de contraceptivos orais, hormônios sexuais, como a progesterona e outros esteroides (KALAILINGAM et al., 2014; WEI et al., 2013). A Diosgenina, uma saponina esteroide, é efetiva na redução dos riscos de aquisição de distúrbios cardiovasculares. Investigações anteriores demonstraram que os biomarcadores importantes do sistema cardiovascular relacionadas com disfunção endotelial, inflamatória e estresse oxidativo são regulados pela Diosgenina (YANG et al., 2013; SONG et al., 2012).

A Diosgenina é solúvel em álcool, entretanto, a solubilidade diminui com o aumento da polaridade do solvente testado (CHEN et al., 2014). Contreras-Pacheco et al., (2013) realizaram estudo sobre composição química, caracterização e quantificação de Diosgenina em tubérculos de *Dioscorea* spp colhidos no estado de Jalisco, México, analisando quatro tipos de solventes empregados no processo de extração do ativo: metanol 100%, etanol aquoso 70%, etanol aquoso 80% e 2-propanol aquoso 70%. Os autores verificaram uma maior eficiência no processo de extração quando empregaram como solvente o etanol aquoso 80%. Por ser um fármaco pouco solúvel em água, para aplicação endovenosa a Diosgenina deveria ser solubilizada em etanol, porém, injeções de álcool provocam irritações nos vasos sanguíneos, inviabilizando a técnica (CHEN et al., 2012).

Nas últimas duas décadas os sistemas nanométricos, com tamanho variando entre 1-1.000 nm foram introduzidos com sucesso para o tratamento de diversas patologias como doenças infecciosas, inflamatórias e o câncer. Essas novas terapias foram possíveis devido às propriedades específicas dos nanossistemas como melhorar a solubilidade de fármacos, prolongam a meia-vida, melhoram o índice terapêutico e redução da imunogenicidade. A primeira geração de nanossistemas utilizados para tais aplicações foram os lipossomas, que são vesículas esféricas, compostas por uma bicamada lipídica semelhante as membranas celulares e centro aquoso, que podem encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. (PETROS; DE SIMONE, 2010).

Os lipossomas são sistemas tecnológicos propostos para liberação de substâncias biologicamente ativas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os lipossomas podem ser classificados em

função do método de preparação (vesículas de evaporação de fase reversa, técnica de extrusão e hidratação do filme lipídico), tamanho (vesícula pequena, intermédia ou grande), lamelaridade (vesículas unilamelares e multilamelares) e segundo a interação com os sistemas biológicos, como convencionais, de longa circulação e sítio-específicos. A formação de vesículas unilamelares (ULVs) ou vesículas multilamelares (MLVs) depende dos métodos de síntese e processamento utilizados após a sua preparação (BOZUTTO; MOLINARI, 2015).

Conforme a interação que os lipossomas exercem com os sistemas biológicos podem ser classificados como convencionais, de longa circulação (peguilados) e sítio-específicos. Os lipossomas de longa circulação, também chamados *stealth* ou furtivos, contêm na sua superfície carboidratos hidrofílicos (ex.: polímeros de potietilenoglicol-PEG) o que dificulta a opsonização e o reconhecimento pelo sistema retículo endotelial, aumentando o tempo de meia-vida das vesículas em torno 8-10 vezes quando comparados aos lipossomas convencionais, no entanto, deve-se levar em consideração fatores como, tamanho, comprimento do polímero, densidade e carga geral de superfície (MORENO et al., 2014; SCHIENER et al., 2014; SANTOS, 2010).

O polímero PEG ocupa o espaço adjacente à superfície dos lipossomas criando um impedimento estérico e, conseqüentemente, prejudicando a interação de macromoléculas e células com os lipossomas. Lipossomas peguilados demonstram uma afinidade mínima para os tecidos normais proporcionando uma plataforma biologicamente inerte e segura, como um sistema avançado de liberação de fármacos direcionado com o intuito de melhorar o potencial terapêutico (KOUDELKA et al., 2015).

O encapsulamento de fármacos em lipossomas proporciona liberação controlada, uma vez que este aumenta a sua biodisponibilidade e seu tempo de permanência na circulação por manter os níveis séricos do fármaco constante, além disso, favorece maior proteção ao medicamento contra a degradação extracelular, reduz a frequência de administração e a duração do tratamento, além de melhorar a seletividade em relação ao alvo (KOUDELKA et al., 2015; MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010).

No presente trabalho, a Diosgenina foi encapsulada em lipossomas convencionais e peguilados, os quais foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas, tempo de estabilidade e eficiência de encapsulação. Depois de verificado as adequadas condições de estabilidade e eficiência de encapsulação os lipossomas contendo Diosgenina foram utilizados para avaliar a ação no Sistema Cardiovascular em testes experimentais *in vivo*.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Preparação da formulação lipossomal contendo Diosgenina**

Os lipossomas contendo Diosgenina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico com adaptações (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014). A Diosgenina utilizada foi Diosgenin SIGMA-ALDRICH com pureza de 95% (São Paulo, Brasil). Inicialmente foram produzidos os lipossomas convencionais carregados positivamente contendo Diosgenina (DL), utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja (LIPOID S 100), colesterol (Sigma Pureza > 95%) e estearilamina (Octadecylamine Pureza 97% Sigma - lipídeo catiônico) a fim de conferir carga positiva à formulação (proporção de 80:10:10) e concentração de Diosgenina de 3,0 mg/mL para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídicas de 80 mM. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 40 min ( $37 \pm 1$  ° C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz para 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos, estes contendo Diosgenina e denominados anteriormente de DL. Os lipossomas peguilados contendo Diosgenina (DL<sub>PEG</sub>) foram preparados como descrito acima, sendo na fase orgânica a estearilamina foi removida e adicionado o polietilenoglicol (DSPE-PEG-2000), a preparação DL<sub>PEG</sub> continha fosfatidilcolina, colesterol e polietilenoglicol (85:10:5), com concentração lipídicas de 80 mM.

## 2.2 Caracterização das formulações

Após sua produção, as formulações lipossomais contendo Diosgenina foram caracterizadas. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, pH, tamanho das partículas (TP), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). O pH dos lipossomas foi aferido utilizando um medidor de pH digital (bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França) a temperatura ambiente. O tamanho de partículas e índice de polidispersão dos lipossomas foi determinado através da espectroscopia de correlação de fótons (analisador de partícula Beckman Coulter Delsa™ Nano S). Nesta análise 300µL da suspensão lipossomal foi diluída em 1 mL de água ultra-pura. O potencial zeta dos lipossomas, que corresponde à carga de superfície das vesículas, foi determinado diluindo 20 µL da suspensão lipossomal em 1 mL de água ultra-pura e lendo a solução resultante em aparelho Zetatrac NC-148 (Microtrac).

### 2.3 Determinação do teor de Diosgenina nos lipossomas

A quantificação foi realizada em sistema de UHPLC Waters® Acquity (Waters Corp., Milford, MA, USA), com metodologia adaptada pelo pesquisadores para quantificação da Diosgenina, consistindo de bomba quaternária, amostrador automático e espectrômetro de massas XevoTqD® equipado com fonte de ionização por eletro-spray e analisador tipo triplo-quadrupolo. Os parâmetros da fonte foram ajustados como segue: fluxo do gás de dessolvatação a 450 L/h, temperatura de dessolvatação a 200 °C, fluxo de gás de colisão a 1 L/h e temperatura da fonte a 150 °C. A voltagem do capilar foi ajustada em 2,50 V e a voltagem do cone em 48 V. A detecção da diosgenina foi realizada através de multiple reaction monitoring (MRM), pela transição 415 > 271 para quantificação e 415 > 253 para confirmação. Os dados foram coletados monitorando os íons pai e filho simultaneamente. Foi utilizada coluna Waters Acquity XBridge™ BEH C18 2,5µm, 2,1x100 mm XP com fase móvel consistindo de A (0,1 % de ácido fórmico, v/v) e B (metanol), em sistema gradiente: 0–4 min, 5-100 % A, fluxo de 0,5 mL/min. A coluna foi equilibrada por 2 minutos antes de cada injeção. A temperatura da coluna e o volume de injeção foram ajustados para 25 °C e 20 µL, respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o software MassLynx.

A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, sendo construída uma curva de calibração com as concentrações de cafeína de 0,38; 0,75; 1,25; 2,5; 5,0 e 20,0 ppm, em triplicata, e regressão linear. O valor encontrado para a amostra foi extrapolado na curva de calibração para a obtenção da concentração de Diosgenina. Foi preparada uma curva de calibração para Diosgenina livre com concentrações que variaram de 0,375 a 20 µg/mL em metanol grau massas.

### 2.4 Eficiência da encapsulação

A eficiência de encapsulação da Diosgenina foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação usando unidades Ultrafree® (Millipore, EUA). Uma alíquota de amostra lipossomal (1 mL) foi transferida para unidades filtrantes (Millipore®) e submetida à ultracentrifugação a 10.000 rpm por 1 h. Após a centrifugação, o filtrado foi dosado em UPLC Waters®. A quantidade de Diosgenina encapsulada foi obtida por diferença entre a quantidade total dosada na formulação e o obtido no filtrado por centrifugação nesta etapa experimental (LIRA et al., 2009).

### 2.5 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações

Para monitoramento das formulações a estabilidade em longo prazo foi iniciada logo após as formulações serem preparadas e ao longo dos dias. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, variação de pH, tamanho das partículas e índice de polidispersão (PDI) por um período de 21 dias (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014; LIRA et al., 2009). Após esta análise preliminar os lipossomas foram armazenados na forma liofilizados. Para liofilização foi acrescido na formulação 1g de Trealose, que foi solubilizada junto ao Tampão fosfato.

## **2.6 Animais**

Foram utilizados em todos os experimentos ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso entre 230 a 250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Piauí, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2$  °C) e fotoperíodo de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água.

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI nº 008/12). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram por superdosagem anestésica (tiopental sódico, 75 mg/kg, i.p.) em conformidade com a Resolução/Normativa Nº 13, 20 de setembro de 2013 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rozeverter Moreno Fernandes (CFMV-PI N0 0290).

## **2.7 Experimentos *in vivo* - Avaliação da atividade Cardiovascular**

### **2.7.1 Canulação arterial e venosa para registro da pressão arterial e da frequência cardíaca**

A cirurgia para a introdução da cânula arterial e venosa foi realizada após aplicação do anestésico tiopental sódico, 75 mg/kg, i.p. As ratas tiveram os membros fixados e a área inguinal da perna esquerda tricotomizada, desinfetada com etanol 70% e exposta para a realização da incisão na pele de 3 a 4 mm paralelo ao ligamento inguinal. Após essa abertura foi possível visualizar a artéria femoral, veia e nervo. Uma vez identificadas, essas estruturas, a veia e a artéria foram separadas dos tecidos conectivos por uma fita colocada sob os vasos. O pequeno orifício foi feito nos vasos e com o auxílio de uma pinça foi possível a introdução da cânula. Os cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na artéria e veia femoral esquerda, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados

subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*) (SABINO et al., 2013).

### 2.7.2 Avaliação do efeito do lipossoma contendo Diosgenina (DL) sobre a Pressão Arterial e Frequência Cardíaca em ratas

As medidas de PA e FC foram realizadas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) e com o programa AQCAD versão 2.3.9 (AVS-PROJETOS-SP). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das doses do lipossoma contendo Diosgenina (DL) e do controle positivo (Nitroprussiato) e controle negativo (lipossoma placebo) (SABINO et al., 2013).

## 2.8 Análises Estatísticas

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) dos dados. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t-Student- Newman-Keuls com post hoc teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $>$  a 5%. Toda a análise foi realizada no Programa estatístico GraphPadPrism 7.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização das formulações, eficiência de encapsulação e estabilidade

O encapsulamento de fármacos em sistemas de entrega coloidais é uma abordagem eficiente para melhorar a farmacocinética de novas moléculas com efeito terapêutico. São utilizados como estratégias terapêuticas as emulsões, micro e nanopartículas, micro e nanocápsulas e lipossomas, estes sistemas atuam protegendo o fármaco contra a degradação, asseguram a liberação controlada, aumentam a biodisponibilidade e reduzem os efeitos colaterais (ELOY et al., 2014).

Os primeiros medicamentos à base de lipossomas (Myocet e Doxil<sup>®</sup>) foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do câncer em 1995. Desde

então, uma vasta gama de agentes terapêuticos incluindo tanto fármacos hidrofóbicos (por exemplo, paclitaxel) e quanto hidrofílicos (por exemplo, hidroxiureia) a base de pequenas moléculas têm sido incorporado com sucesso em lipossomas com o intuito de melhorar a sua eficácia e/ou eficiência. Hoje existem cerca de 8 produtos comercializados e mais 53 formulações lipossômicas em diferentes etapas de ensaios clínicos (MOVAHEDI et al., 2015). Desde a sua descoberta por Bangham et al., em 1965, os lipossomas tornaram-se o mais bem sucedido nanossistema de liberação de fármacos, devido o significativo número de medicamentos que atingiu o mercado farmacêutico.

Os sistemas lipossomais de distribuição de fármacos são baseados em tecnologias industriais bem estabelecidas, com aplicações em medicina humana aprovados pelo FDA (KOUDELKA et al., 2015). Inúmeras são as aplicações dos lipossomas nas áreas biológicas, industrial e farmacêutica uma vez servem de veículo para regular a administração de medicamentos, material genético, proteínas, vitaminas e outras moléculas. Estas aplicações conhecidas como sistemas de entrega de fármacos exigem que esses nanossistemas apresentem tamanho e homogeneidade adequados para atingir seus alvos (ALINAGHI et al., 2014).

Os lipossomas contendo Diosgenina (DL e DL<sub>PEG</sub>) exibiram efeito Tyndall (não realizam a dispersão da luz), característico de partículas em escala nanométrica. Os resultados apontam que os lipossomas são do tipo vesículas unilamelares pequenas (SUV), com tamanho (TP), índice de polidispersão (PDI) e carga de superfície (PZ) compatível com aplicações em testes *in vivo* (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Características das formulações lipossomais contendo Diosgenina (DL e DL<sub>PEG</sub>).

	DL	DL <sub>PEG</sub>
<b>TP</b>	113,3± 3,20 nm	94,7 ± 0,28 nm
<b>PDI</b>	0,304 ± 0,018	0,285±0,024
<b>PZ</b>	+32,8 ± 1,39 mV	-11,6 ± 1,99 Mv
<b>pH</b>	7,4	7,4

TP: tamanho de partícula, PDI: Índice de polidispersão, PZ: potencial zeta (carga de superfície), DL: lipossomas convencionais carregados positivamente contendo Diosgenina, DL<sub>PEG</sub>: lipossomas peguilados contendo Diosgenina.

A composição da bicamada lipídica é um fator preponderante na produção dos lipossomas e na obtenção de formulações estáveis. Dentre os vários fosfolipídios que podem ser utilizados, a fosfatidilcolina foi escolhida para estas preparações lipossomais, pois apresenta grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sais no meio (GARCIA, 2014).

A adição de colesterol na bicamada lipídica dos lipossomas diminui a sua permeabilidade e aumenta a sua estabilidade *in vivo* e *in vitro*, porque a presença de colesterol induz um empacotamento denso de fosfolipídios inibindo a sua transferência para a lipoproteína de alta densidade (HDL - high density lipoprotein) e lipoproteína de baixa densidade (LDL - low density lipoprotein) (ERCOLE et al., 2015). O lipídeo de carga positiva utilizado (estearilamina) tem como finalidade evitar a agregação das vesículas aumentando a estabilidade em suspensão. A incorporação do polímero polietilenoglicol (PEG) ao nanocarreador lipídico procurou aumentar o tempo de circulação sanguínea, enquanto diminui a absorção pelo sistema retículo endotelial (RES), melhorando a farmacocinética dos lipossomas, porque a adição de PEG minimiza a agregação de vesículas e melhora a estabilidade a longo prazo da formulação (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; SCHIENER et al., 2014).

O potencial da estabilidade do sistema coloidal foi avaliado analisando a magnitude do potencial zeta de DL que foi de  $+32,8 \pm 1,39$  mV e DL<sub>PEG</sub> que foi de  $-11,6 \pm 1,99$  Mv. A maior magnitude do potencial zeta sugere o aumento da estabilidade de sistemas coloidais, visto que, as forças repulsivas geradas pela carga de superfície evitam que as partículas fiquem agregadas após colisão. O aumento do PZ indica que a repulsão entre as partículas é maior, este fenômeno contribui para uma dispersão coloidal mais estável (MENON et al., 2015). Já é enfatizado que as partículas em suspensão com grandes potenciais zeta negativos ou positivos terão baixa tendência para formar agregados, portanto, o aumento de magnitude no valor do potencial zeta, ocasionado pelo revestimento com PEG e incorporação da estearilamina, melhorou a estabilidade dos lipossomas contendo Diosgenina.

O potencial zeta é um parâmetro de caracterização, estabilidade e estudo do mecanismo de associação do fármaco. É capaz de influenciar na resposta biológica, pois permite que sejam feitas modificações na superfície do nanossistema para evitar a opsonização pelo sistema fagocítico mononuclear (SANTOS, 2010).

A formulação de DL após sua produção foi avaliada e os resultados mostraram estabilidade na forma de dispersão por 15 dias, por consequência, não apresentou mudanças nos seus aspectos macro e microscópico, assim como não ocorreu variação brusca de pH neste

intervalo de tempo. Após esse prazo, observou-se que a formulação (DL) não estava mais homogênea e apresentou precipitados indicativos da formação de cristais de Diosgenina.

A observação da mudança no pH, aumento no tamanho de partículas e no índice de polidispersão, foram outros indicativos que a formulação havia tornado-se instável. O pH variou de 7,4 (24 horas após a preparação) para 7,8 (21 dias após a preparação), o TP iniciou em tempo 0 (24h após manipulado) com 113,3 nm variando até 145,7 nm com 21 dias e o PDI iniciou em tempo 0 (24h após manipulado) com 0,304 variando até 0,438 com 21 dias

Em contrapartida a formulação DL<sub>PEG</sub> manteve-se estável em solução apresentando pequenas variações numéricas nos parâmetros envolvidos sem perda de estabilidade durante o período de 21 dias de monitoramento.

O comportamento morfológico dos lipossomas convencionais está de acordo com o resultado obtido a partir do teste de estabilidade que avaliou o tamanho de partícula e índice de polidispersão. O aumento do índice de polidispersão indica que a formulação pode conter grandes partículas ou os lipossomas estão se agregando, lentamente estes nanossistemas maiores tendem a sedimentar.

Após um período de armazenamento por 21 dias, os lipossomas convencionais eram maiores em comparação com o tamanho dos lipossomas peguilados sob as mesmas condições de preparação. Isto explica que o tamanho dos lipossomas convencionais tende a aumentar ao longo dos dias, sugerindo que a incorporação de PEG aos lipossomas minimiza a agregação de vesículas e melhora a estabilidade a longo prazo da formulação.

O armazenamento dos lipossomas na forma de suspensão aquosa é muitas vezes incompatível com a estabilidade requerida para os produtos farmacêuticos (de pelo menos um ano), mesmo se a substância encapsulada apresenta um baixo coeficiente de permeabilidade ou se a preparação é mantida na forma de sedimento com pequeno volume externo (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Os problemas com estabilidade de DL e DL<sub>PEG</sub> foram solucionados com a liofilização das formulações, que passaram a ser armazenadas na forma liofilizada e resuspensas com tampão fosfato pH 7,4 no momento da sua administração.

No sistema *in vivo* a peguilação dos lipossomas pode reduzir o efeito opsonização e absorção pelos macrófagos atenuando a resposta imunitária do hospedeiro, assim como potencializa a farmacocinética do fármaco encapsulado (MOGHIMI; SZEBENI, 2003). Para a realização dos testes *in vivo* optou-se por utilizar os lipossomas convencionais carregados positivamente contendo Diosgenina (DL), por vezes intitulado como Diosgenina lipossomal, por ser um teste de curta duração e a possível resposta hipotensora ser observada em poucos minutos, tornando-se desnecessário a utilização de lipossomas peguilados.

Os lipossomas são pH responsivos, mantendo-se estáveis em condições fisiológicas (pH 7,4) porém se desestabilizam em ambientes ácidos ou alcalinos. Estes sistemas apresentam grupos ácidos que funcionam como estabilizador no pH neutro, considerando que, em condições ácidas (comuns em tecidos patológicos), grupos carboxílicos estão protonados e desestabilizam o nanossistema lipossomal (MOVAHEDI et al., 2015).

A eficiência de encapsulação foi de 98,82% de Diosgenina em lipossomas convencionais carregados positivamente, demonstrando uma excelente eficiência da incorporação da Diosgenina neste modelo de sistema. Segundo Batista et al., (2007) o aumento da eficiência de encapsulação e de liberação do fármaco *in vivo* constitui o principal alvo das pesquisas envolvendo lipossomas.

Okawara et al., (2014) analisaram e compararam os efeitos de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) na permeabilidade da Diosgenina utilizando como modelo de perfusão células de jejuno Caco-2, chegaram à conclusão que a biodisponibilidade de Diosgenina na presença de derivados de  $\beta$ -CD foi de 4-11 vezes maior quando comparado com Diosgenina em suspensão, mostrando que este nanossistema melhorou significativamente a baixa solubilidade da Diosgenina. Os resultados apontados por estes autores afirmam a importância de incorporar a Diosgenina em nanossistemas lipossomais para aplicação *in vivo*, a fim de melhorar sua solubilidade, biodisponibilidade e por consequência potencializar o efeito terapêutico.

### **3.2 Avaliação da atividade Cardiovascular**

Doenças cardiovasculares são doenças do coração e vasos sanguíneos mais comumente diagnosticados em pacientes idosos (homens e mulheres). Este grupo de doenças inclui a doença cardíaca coronária, hipertensão, acidente vascular cerebral, hipercolesterolemia, diabetes, doença renal crônica, doença arterial e demência vascular. Apesar das diferentes sintomatologias que cada transtorno cardiovascular apresenta a associação entre eles refere-se a fatores de risco comuns como o tabagismo, alimentação inadequada, obesidade, pressão arterial elevada e altos níveis de glicose sanguínea (KORDALEWSKA; MARKUSZEWSKI, 2015).

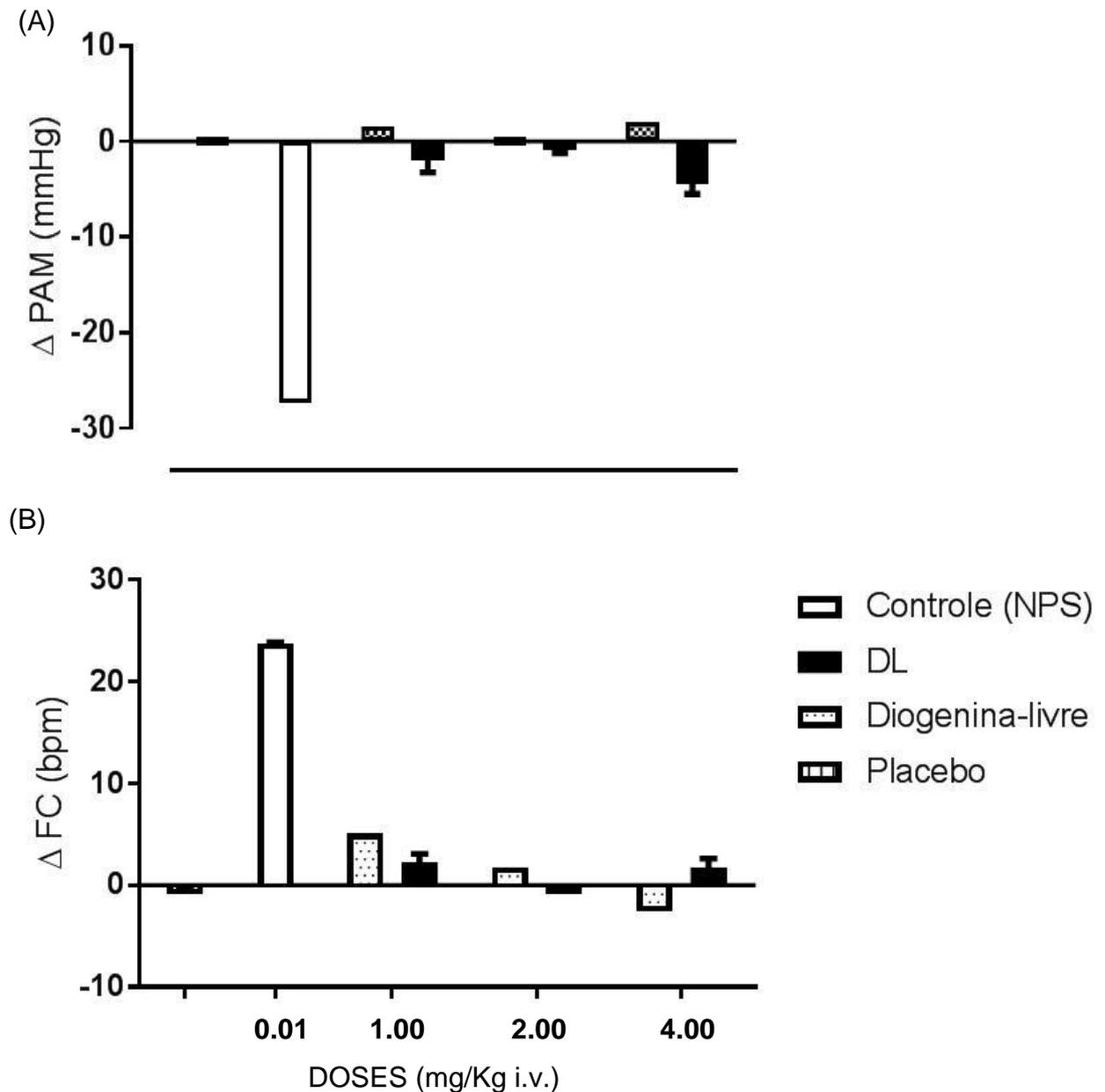
A doença cardiovascular é uma das mais prevalentes condições de saúde em todo o mundo e as espécies reativas de oxigênio estão implicadas na patogênese de várias desordens do sistema cardiovascular, incluindo a isquemia cardíaca, lesões de isquemia e reperfusão, aterosclerose e insuficiência cardíaca congestiva (NASH; AHMED, 2015).

A modulação da disfunção endotelial é comumente caracterizada por uma alteração da capacidade vasodilatadora do endotélio vascular e desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da hipertensão, sendo a hipertensão um fator de risco de doença cardiovascular típica. A atividade biológica do óxido nítrico (NO), um eficaz fator relaxante derivado do endotélio, está principalmente associada com a enzima endotelial óxido nítrico-sintase ou a sua interação com o ânion superóxido, que é produzido na parede vascular e pela geração de radicais livres (CHOI et al., 2016).

A Diosgenina possui várias atividades farmacológicas relacionadas diretamente para prevenção das desordens do sistema cardiovascular, atua em alvos terapêuticos para o tratamento de enfermidades cardiovasculares tais como hipertensão, vasoespasmos, aterosclerose, assim como, em doenças relacionadas, como a dislipidemias e desordens metabólicas (HAO et al., 2015).

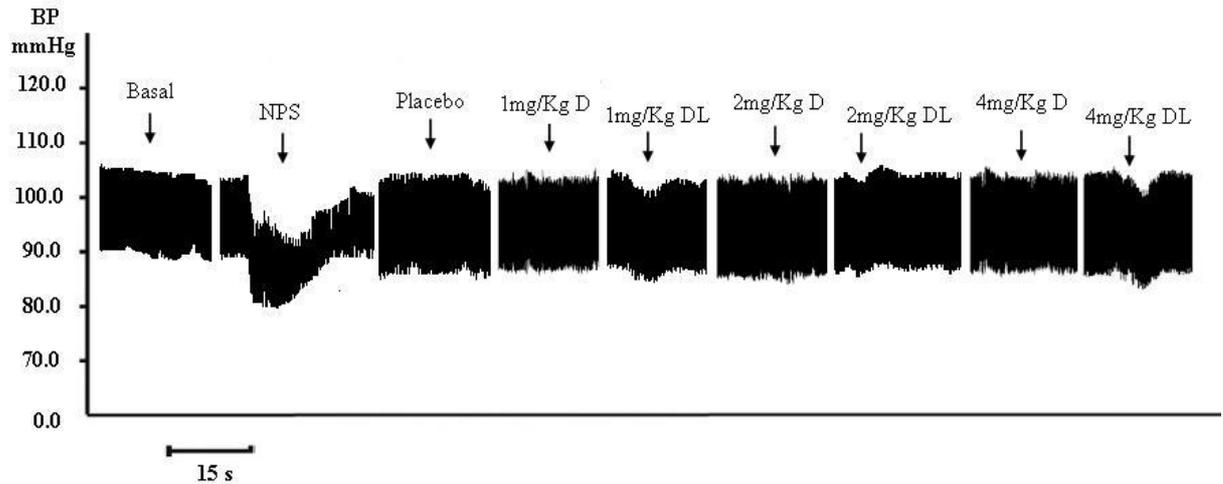
Os efeitos da Diosgenina livre (D) e Diosgenina lipossomal (DL) sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratas normotensas foram avaliados neste estudo. Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos e dos valores basais das ratas normotensas (PAM  $100 \pm 10$  mmHg e FC  $380 \pm 20$ ) foi administrado o Nitroprussiato de sódio (NPS) como controle positivo,  $10 \mu\text{g/kg}$  intra venoso (i.v.). As sucessivas administrações de D e DL (1, 2 e 4 mg/Kg i.v.) e lipossomas placebo foram realizadas em intervalos de tempos suficiente para permitir recuperação total do parâmetro basal (15 minutos), a fim de elucidar possíveis mecanismos subjacentes e resposta hipotensora. Os resultados estão expressos na **Figura 1**.

A administração de D e DL (1, 2 e 4 mg/Kg iv) apresentou resposta hipotensora não significativa em ratas normotensas não anestesiadas, assim como, não alterou de forma significativa a frequência cardíaca dos animais tratados nos testes realizados *in vivo*.



**Figura 1:** Efeito da Diosgenina livre (D) e Diosgenina lipossomal (DL) sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratas normotensas não anestesiadas. Valores para média e desvio padrão de cinco experimentos. \* $p < 0,05$ : Teste t-Student.

A resposta hipotensora apresentada para a Diosgenina lipossomal na dose de 1 mg/Kg foi de  $-1,93 \pm 1,32$ , para a dose de 2 mg/kg foi de  $-0,89 \pm 0,31$  e para a dose de 4 mg/kg foi de  $-4,42 \pm 1,05$ , para a Diosgenina Livre os resultados sobre a pressão arterial foram  $1,52 \pm 0,54$ ,  $0,00 \pm 0,00$  e  $1,96 \pm 0,69$  para as doses de 1, 2 e 4 mg/kg, respectivamente. Os valores da resposta hipotensora para o padrão Nitroprussiato foram de  $-27,34 \pm 0,72$ , com número de cinco experimentos para ambos os testes. Os registros originais estão demonstrados na **Figura 2**.



**Figura 2:** Traços originais do efeito produzido por D e DL sobre a pressão arterial em ratos normotensos não anestesiados.

O nitroprussiato, utilizado como controle positivo, é um vasodilatador de ação direta nos músculos lisos vasculares venoso e arterial. O mecanismo de ação do nitroprussiato é comum a todos os nitratos. O radical nitroso se decompõe, liberando óxido nítrico. O óxido nítrico é um composto instável, fugaz, que ativa a guanilatociclase. Disto resulta um aumento na concentração do monofosfato cíclico de guanosina, que causa relaxamento do músculo liso. Os efeitos hemodinâmicos do nitroprussiato de sódio são, principalmente, a redução da pós-carga pela vasodilatação arterial e alguma redução na pré-carga pelo aumento da capacitância venosa. Estes efeitos tipicamente causam um aumento reflexo na frequência cardíaca e na contração do miocárdio (SANTOS et al., 2015; CASTRO et al., 2011).

No presente estudo a Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal não apresentaram resposta hipotensora esperada, visto que, este fitoestrógeno vem sendo amplamente demonstrado na literatura como um excelente modulador no sistema cardiovascular. As doses escolhidas para administração (1, 2 e 4 mg/kg i.v.) foi conforme a taxa de rendimento da Diosgenina nos lipossomas que foi de 3mg/mL. Não foi proposto um possível mecanismo de ação hipotensor para a Diosgenina visto que os resultados não se mostraram satisfatórios.

Levando em consideração que as doses administradas de D e DL nos experimentos *in vivo* representam 2%, 4% e 6% respectivamente da dose habitual de Diosgenina livre que a maioria dos estudos utilizam para experimentação *in vivo* e *in vitro* (50 mg/Kg), o presente estudo traz a perspectiva que com o aumento do rendimento de Diosgenina incorporada em nanossistemas lipossomais, a resposta hipotensora esperada possa ser verificada.

Silva (2014) avaliou o efeito da Diosgenina e do 17- $\beta$  estradiol em artéria mesentérica de ratos e investigar se a Diosgenina e o estradiol modulavam o tônus basal de anéis mesentéricos. Foi constatado inicialmente que concentrações de Diosgenina administradas

cumulativamente às cubas não alteraram o tônus basal dos anéis mesentéricos, tanto na ausência como na presença do endotélio funcional. Resultados similares foram obtidos com a administração cumulativa de concentrações crescentes de 17- $\beta$  estradiol o que sugere que Diosgenina ou 17- $\beta$  estradiol parecem não modificar o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato. A administração de concentrações crescentes de Diosgenina ou 17- $\beta$  estradiol induziu um relaxamento dependente de concentração na presença do endotélio e na ausência do mesmo, sugerindo que a Diosgenina, assim como o 17- $\beta$  estradiol, apresentam efeito relaxante dependente e independente de endotélio funcional.

Dias (2007), em seus estudos realizados em ratos observou que a Diosgenina induziu efeito vasorrelaxante dependente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior de rato normotenso mediado pela liberação de óxido nítrico através de ativação de receptores muscarínicos e uma possível ativação dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis a voltagem, sensíveis ao ATP e sensíveis ao cálcio de larga condutância. Assim como, os efeitos relaxantes independentes do endotélio funcional induzidos pelo fitoestrógeno parecem envolver o bloqueio dos canais para cálcio operados por voltagem nas maiores concentrações (1 e 2 mM) e a inibição da liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a trifosfato de inositol (WILLIAMS; GONG, 2007).

A hipertensão arterial é uma doença complexa, multifatorial e poligênica dependente da dieta, fatores demográficos e genéticos, resultante do desequilíbrio de vários sistemas, sendo considerada um problema de saúde pública e um fator de risco para doenças cardiovasculares, promovendo a insuficiência cardíaca, renal e acidente vascular cerebral. A associação entre hipertensão, obesidade e diabetes é atualmente um importante problema de saúde pública (WATANABE; CASARINI, 2015).

Moraes (2015) investigou o efeito do fitoestrogeno Diosgenina sob a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia. Este estudo demonstrou que administração subcrônica de Diosgenina na dose de 50 mg/Kg por via oral não apresentou toxicidade, essa comprovação foi através da determinação dos parâmetros bioquímicos Alanina transaminase, Aspartato aminotransferase, Ureia, Creatinina. Houve também a redução do desequilíbrio metabólico e risco cardiovascular após verificar os valores para Glicose, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol – LDL, Colesterol – HDL e comparado com o grupo tratado e o não tratado com Diosgenina. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo as dosagens de Mieloperoxidase, Malondialdeído e Glutathione no tecido cardíaco e Superoxido dismutase e Nitrito no plasma e foi notado que ocorreu redução de peroxidação lipídica e elevação de enzimas antioxidantes. O estudo sugere como alicerce para

demais pesquisas a cerca da utilização deste fitoestrógeno como terapêutica de reposição hormonal alternativa na menopausa com a finalidade de melhorar a função cardiovascular.

De acordo com o estudo realizado por Gong et al., (2010) o pré-tratamento com Diosgenina impediu o processo de apoptose em células da musculatura lisa de humanos induzida por peróxido de hidrogênio em testes realizados *in vitro*, através do mecanismo de regulação mitocondrial. Desta forma, a Diosgenina é um composto promissor para o controle da hipercolesterolemia, pois auxilia no controle dos níveis de colesterol melhorando o perfil lipídico e apresentando a capacidade de modular o estresse oxidativo.

A utilização de lipossomas para incorporação da Diosgenina apresentou como um dos propósitos melhorar a solubilidade deste fitoestrógeno em meios aquosos, a fim de facilitar a interação da Diosgenina com fluidos biológicos e verificar uma possível resposta hipotensora. As possíveis aplicações da nanomedicina nas desordens cardiovasculares estão expandindo rapidamente, proporcionando opções promissoras através da liberação específica de fármacos favorecendo um tratamento mais eficaz (WINTER et al., 2006).

Dvir et al., (2011) mostraram direcionamento de lipossomas para modelar o infarto do miocárdio utilizando um ligante específico para o receptor de tipo 1 da angiotensina II que só é sobre-expresso em casos de infarto. Confirmaram a especificidade dos lipossomas para cardiomiócitos em cultura de células e demonstraram que os lipossomas poderiam atravessar barreiras endoteliais mais facilmente quando perturbado pelas consequências da isquemia, e que estes lipossomas especificamente marcados para o miocárdio lesionado, verificaram os benefícios de uma estratégia de transporte ativo durante o processo do infarto do miocárdio *in vivo*. Sugeriram que este modelo pode ser utilizado para veicular diferentes fármacos.

## CONCLUSÃO

Diosgenina incorporada em preparações lipossomais produzidas pelo método da hidratação de filme lipídico apresentaram resultados que apontam que é possível a encapsulação de Diosgenina em lipossomas convencionais e lipossomas peguizados com características que são satisfatórias para testes *in vivo*, além disso, as formulações apresentaram estabilidade por tempo mais prolongado quando liofilizadas. No presente estudo a Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal não apresentaram resposta hipotensora esperada, visto que, este fitoestrógeno vem sendo amplamente demonstrado na literatura como um excelente modulador no sistema cardiovascular. Contudo, traz-se a perspectiva que com o aumento do rendimento de Diosgenina incorporada em nanossistemas lipossomais, a resposta hipotensora esperada possa ser verificada.

## REFERÊNCIAS

- ANCHIÊTA-JUNIOR, J. J. L.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, J. M. F.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975-999, 2015.
- CASTRO, P. F. S.; PEREIRA, A. C.; ROGRIGUES, G. J.; BATISTA, A. C.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.; ROCHA, M. L. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 5, p. 370-377, 2011.
- CHEN, F. X.; ZHAO, M. R.; LIU, C. C.; PENG, F. F.; REN, B. Z. Application of the NRTL method to correlate solubility of diosgenin. **J. Chem. Thermodynamics**, v. 71, p. 231-235, 2014.
- CHEN, F. X.; ZHAO, M. R.; LIU, C. C.; PENG, F. F.; REN, B. Z. Determination and correlation of the solubility for diosgenin in alcohol solvents. **J. Chem. Thermodynamics**, v. 50, p. 1-6, 2012.
- CHOI, S.; RYU, K. H.; PARK, S. H.; JUN, J. Y.; SHIN, B. C.; CHUNG, J. H.; YEUM, C. H. Direct vascular actions of quercetin in aorta from renal hypertensive rats. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 35, n. 1, p. 15-21, 2016.
- CONTRERAS-PACHECO, M. L.; RUVALCABA, F. S.; FAJARDO, J. A. G.; SANCHES, J. J.; RUÍZ, M. A.; ESPINOSA, M. E.; CASTRO, A. Diosgenin quantification, characterisation and chemical composition in a tuber collection of *Dioscorea* spp. In the state of Jalisco, México. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 10, p. 2111-2118, 2013.
- DIAS, K. L. G.; CORREIA, N. A.; PEREIRA, K. K. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CAVALCANTE, K. V. M.; ARAÚJO, I. G. A.; SILVA, D. F.; GUEDES, D. N.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M.; MEDEIROS, I. A. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 574, n. 2 p.172-178, 2007.
- DVIR, T.; BAUER, M.; SCHROEDER, A.; ET AL. Nanoparticles targeting the infarcted heart. **Nano Lett.**, v.11, n. 10, p. 4411-4414, 2011.

ELOY, J. O.; SOUZA, M. C.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J. P. A.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, n. 1, p. 345-363, 2014.

ERCOLE, F.; WHITTAKER, M. R.; QUINN, J. F.; DAVIS, T. P. Cholesterol Modified Self-Assemblies and Their Application to Nanomedicine. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 7, p. 1886-1914, 2015.

GARCIA, F. M. Avanços da nanomedicina: a nova fronteira da medicina – Artigo de atualização. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 110-117, 2014.

GONG, G.; QIN, Y.; HUANG, W.; ZHOU, S.; WU, X.; YANG.; ZHAO, Y. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3 p. 366-375, 2010.

HAO, S.; XU, R.; LI, D.; ZHU, Z.; WANG, T.; LIU, K. Attenuation of Streptozotocin-Induced Lipid Profile Anomalies in the Heart, Brain, and mRNA Expression of HMG-CoA Reductase by Diosgenin in Rats. **Cell Biochem Biophys**, v. 72, n. 3, p. 741-749, 2015.

KALAILINGAM, P.; KANNAIAN, B.; TAMILMANIL, E.; KALIAPERUMAL, R. Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 10, p. 1154-1161, 2014.

KORDALEWSKA, M.; MARKUSZEWSKI, M. J. Metabolomics in cardiovascular diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. suplementar, 2015.

KOUDELKA, S.; KNOTIGOVA, P. T.; MASEK, J.; PROCHAZKA, L.; LUKAC, R.; MILLER, A.D.; NEUZIL, J.; TURANEK, J. Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. **Journal of Controlled Release**, v. 207, n. 10, p. 59-69, 2015.

LIRA, M. C. B.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ROLIM-SANTOS, H. M. L.; GALETTI, F. C. S.; SIMONI, A. R.; SANTOS, N. P.; EGITO, E. S. T.; SILVA, C. L.; TEDESCO, A. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 37-41, 2009.

LIU, K.; ZHAO, W.; GAO, X.; HUANG, F.; KOU, J.; LIU, B. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK $\beta$  and IRS-1 pathways. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 2, p. 350-358, 2012.

MAGALHÃES, N. S. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

MENON, P.; YIN, T. Y.; MISRAN, M. Preparation and characterization of liposomes coated with DEAE-Dextran. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 345-350, 2015.

MOGHIMI S.M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Prog Lipid Res** v. 42, n. 6, p. 463-478, 2003.

MORAES, I. C. P. S. **Efeito do fitoestrógeno diosgenina sob a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia**. 2015. 105f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Piauí.

MORENO, L. C.; SILVA-OLIVEIRA, G. Z.; CAVALCANTI, I. M.; SANTOS MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 116, p. 64-8, 2014.

MOVAHEDI, F.; HU, R. G. BECKER, D. L.; XU, C. Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1575-1584, 2015.

NASH, K. M.; AHMED, S. Nanomedicine in the ROS-mediated pathophysiology: Applications and clinical advances. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.11, n. 8, p. 2033-2040, 2015.

OKAWARA, M.; TOKUDOME, Y.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; HASHIMOTO, F. Effect of  $\beta$ -Cyclodextrin Derivatives on the Diosgenin Absorption in Caco-2 Cell Monolayer and Rats. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, n.1, p. 54-59, 2014.

PETROS, R. A.; DE SIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615-627, 2010.

SABINO, C.K.B.; FERREIRA-FILHO, E. S.; MENDES, M. B.; SILVA-FILHO, J. C.; PONTE, M. P. T. R.; MOURA, L. H. T.; OLIVEIRA, E. C .A.; QUINTAS-JUNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Cardiovascular effects induced by a-terpineol in Hypertensive rats. **Flavour Frag. J.** v.28, p.333-339, 2013.

SANTOS, M. E. P.; MOURA, L. H. P.; MENDES, M. B.; ARCANJO, D. D. R.; MONÇÃO, N. B. N.; ARAÚJO, B. Q.; LOPES, J. A. D.; SILVA-FILHO, J. C.; FERNANDES, R. M.;

OLIVEIRA, R. C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; OLIVEIRA, A. P. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 120-128, 2015.

SANTOS, J. S. **Nanopartículas: aplicações cosméticas e farmacêuticas**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

SCHIENER, M.; HOSSANN, M.; VIOLA, J. R.; ORTEGA-GOMEZ, A.; WEBER, C.; LAUBER, K.; LINDNER, L. H.; SOEHNLEIN, O. Nanomedicine-based strategies for treatment of atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 5, p. 271-281, 2014.

SILVA, J. S. F. **Efeito do relaxamento induzido por diosgenina em artéria mesentérica de rato após administração de 17- $\beta$  estradiol**. 2014. 33f. Monografia (Graduação), Universidade Federal da Paraíba.

SONG, J. X.; MA, L.; KOU, J. P.; YU, B. Y. Diosgenin reduces leukocytes adhesion and migration linked with inhibition of inter cellular adhesion molecule-1 expression and NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells. **Chin.J.Nat.Med.**, v. 10, n. 2, p. 142-149, 2012.

TOBA, H.; KOJIMA, Y.; WANG, J.; NODA, K.; TIAN, W.; KOBARA, M.; NAKATA, T. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 691, n. 1-3, p. 190-197, 2012.

WATANABE, I. K. M.; CASARINI, D. E. Renin-angiotensin system, new evidence in the pathophysiology of hypertension: critical role for the clinical practice. **Rev Soc Cardiol Estado de Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 14-22, 2015.

WEI, M.; BAI, Y.; MI, W.; AO, M.; JIN, W.; YU, P.; ZHU, M.; YU, L. Novel method utilizing microbial treatment for cleaner production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW). **Bioresource Technology**, v. 146, p. 549-555, 2013.

WILLIAMS, J.R.; GONG, H. Biological activities and syntheses of steroidal saponins: the shark-repelling pavoninins. **Lipids**, v. 42, n. 77, p. 59-67, 2007.

WINTER, P. M.; NEUBAUER, A. M.; CARUTHERS, S. D.; HARRIS, T. D.; ROBERTSON, J. D.; WILLIAMS, T. A.; SCHMIEDER, A. H.; HU, G.; ALLEN, J. S.; LACY, E. K.; ZHANG, H.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Endothelial  $\alpha(v)\beta3$  integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 9, p. 2103-2109, 2006.

WNAG, W. C.; LIU, S. F.; CHANG, W. T.; SHIU, Y. L.; HSIEH, P. F.; HUNG, T. J.; HUNG, C. Y.; HUNG, Y. J.; CHEN, M. F.; YANG, Y. L. The effects of diosgenina in the Regulation of renal proximal tubular fibrosis. **Experimental cell research**, v. 323, n. 2, p. 255-262, 2014.

XIN, G.; WNAG, Y.; GUO, X.; HUANG, B.; DU, D.; HE, S.; ZHANG, R.; XING, Z.; ZHAO, H.; CHEN, Q.; HUANG, W.; HE, Y. Synthesis of Diosgenin-Ibuprofen Derivatives and Their Activities against Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Chem. Pharm. Bull.** v. 61, n.5, p.532-538, 2013.

YANG, H. P.; YUE, L.; JIANG, W. W. Diosgenin inhibits tumor necrosis factor- induced tissue factor activity and expression in THP-1 cells via down-regulation of the NF-B, Akt, and MAPK signaling pathways, **Chin.J.Nat.Med.**, v. 11, n. 6, p. 608-615, 2013.

YUN-CHENG L. V.; YANG, J.; YAO, F.; XIE, W.; TANG, Y. Y.; OUYANG, X. P.; HE, P. P.; TAN, Y. L.; LI, L.; ZHANG, M.; LIU, D.; CAYABYAB, F. S.; ZHENG, X. L.; TANG, C. K. Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the MiR-19b induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 1, p. 80-89, 2015.

**CAPÍTULO III:** Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo Diosgenina

## Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo Diosgenina

Michely Laiany Vieira Moura<sup>1,3</sup>, Alexandre Xavier de Lira da Silva<sup>1</sup>, Aldeídia Pereira de Oliveira<sup>2</sup>, Hercília Maria Lins Rolim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina – Brasil.

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí.

<sup>3</sup>Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada (NANOSFAR).

### RESUMO

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Os agentes antioxidantes podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos nos tecidos humanos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da Diosgenina livre (D) e de Diosgenina incorporada em nanovesículas lipídicas, denominada de Diosgenina lipossomal (DL) por meio da eliminação do radical livre estável, 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH), 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico) (ABTS), potencial redutor (Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>), radical nitrito (NO<sup>•</sup>) e peroxidação lipídica (TBARS), assim como, determinar a concentração efetiva inibitória (CE<sub>50</sub>) capaz de remover 50% desses radicais dos testes antioxidantes envolvidos nesse estudo. Para os testes de DPPH e ABTS foi verificada a atividade antioxidante pela remoção destes radicais. Para avaliação do potencial redutor, foi preparado uma mistura reacional de ferricianeto de potássio, de ácido tricloroacético, água destilada e cloreto férrico. Para determinação da peroxidação lipídica foi quantificado o conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico, já o óxido nítrico (NO) formado foi determinado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio. Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidas pela reação de Griess. Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M). Análise estatística foi realizada utilizando *one way* ANOVA, seguido pelo teste *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism 6.02* (San Diego, CA, USA). A análise dos resultados mostrou baixos percentuais de inibição dos radicais DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal, não mostrando diferença estatística entre ambos, quando comparado ao trolox. No entanto, a Diosgenina tanto na sua forma livre quanto na sua forma lipossomal exibiu significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico e ao radical nitrito, evidenciado pelo cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE<sub>50</sub>). Também foi possível perceber que a forma nanocarreada exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada. Desta forma, se faz necessário avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* no sentido que esta formulação possa ser caracteriza ou não com atividade antioxidante e sua aplicação para uso em processos oxidativos, como as que acometem o sistema cardiovascular.

**Palavras-chave:** Diosgenina; Lipossomas; DPPH; ABTS; Potencial Redutor; Peroxidação lipídica; Nitrito; Antioxidante.

## ABSTRACT

Maintaining the balance between the production of free radicals and antioxidant defenses is an essential condition for the normal functioning of the body. The antioxidants can prevent or reduce oxidative damage in human tissues. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant potential in vitro Diosgenin (D) and Diosgenin incorporated in nanovesicles lipid, called Diosgenin liposomal (DL) through the stable free radical elimination, 2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH), 2,2`- azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS), reducing potential ( $Fe^{3+} / Fe^{2+}$ ), nitrite radical ( $NO \bullet$ ) and lipid peroxidation (TBARS) as well as determining inhibitory effective concentration ( $EC_{50}$ ) able to remove 50% of these radicals antioxidants tests involved in this study. For DPPH and ABTS tests was checked for antioxidant activity by removal of these radicals. To evaluate the potential reducing a reaction mixture of potassium ferricyanide was prepared, trichloroacetic acid, distilled water and ferric chloride. For determination of lipid peroxidation was quantified content of reactive species with thiobarbituric acid, as nitric oxide (NO) formed was determined from the spontaneous decomposition of sodium nitroprusside. Once generated NO, it interacts with oxygen to produce nitrite ions, which were measured by Griess reaction. All results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (E.P.M). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons as post hoc test. The results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 2.6 (San Diego, CA, USA). The results showed low percentage of inhibition of DPPH  $\bullet$ , ABTS  $\bullet$  + and potential reducer Diosgenin and liposomal Diosgenin, showing no statistical difference between the two when compared to trolox. However, diosgenin both in form and in their liposomal form exhibited significant antioxidant potential across the lipid peroxidation by reactive forms associated thiobarbituric acid and the radical nitrite, evidenced by calculating their median effective concentrations ( $EC_{50}$ ). You can also see that the liposomic form exhibited greater antioxidant potential in relation to its isolation. Thus, it is necessary to evaluate the antioxidant capacity in vivo in the sense that this formulation can be characterized or not with antioxidant activity and its application for use in oxidation processes, such as those that affect the cardiovascular system.

**Keywords:** Diosgenin; liposomes; DPPH; ABTS; Reduction potential; Lipid peroxidation; Nitrite; Antioxidant.

## 1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres apresentam papel fundamental no organismo sendo responsáveis pela sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, devido suas características em facilitar a doação de seus elétrons para outras moléculas causando reações em cadeia (SUCUPIRA et al., 2012). Uma parte do oxigênio metabolizado é direcionada para outra via metabólica dando origem aos radicais livres como o superóxido ( $O_2\bullet$ ), hidroxila ( $OH\bullet$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ROHENKOHL; CARNIEL; COLPO, 2011). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são importantes na regulação das funções fisiológicas celulares normais, mas quando produzida em excesso levam a patogênese de várias doenças (NASH; AHMED, 2015).

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010). O excesso de radicais livres no organismo leva ao estresse oxidativo, o que pode estar associado às causas de doenças crônicas como, infarto do miocárdio e demais doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce e câncer (COSTA et al., 2013), além de doenças metabólicas como o diabetes melitus (JAGADEESAN et al., 2012).

Os antioxidantes são compostos que têm a capacidade de bloquear ou reduzir o processo de oxidação através da inibição da iniciação de reações em cadeia de oxidação (AHMAD; RAB; AHMAD, 2016). Desempenham importante papel na melhoria de muitos danos oxidativos mediada em sistemas biológicos e têm sido utilizados para enfrentar os radicais livres que são gerados *in vivo* (OLIVEIRA, 2015). As enzimas antioxidantes formam a primeira linha de defesa contra os danos no tecido cardíaco e um aumento do estresse oxidativo pode ser devido à depleção dos antioxidantes (CHEN et al., 2015).

Diosgenina é uma saponina esteroide encontrada no inhame, os tubérculos comestíveis de espécies do gênero *Dioscorea sp.* sendo uma das plantas mais utilizadas no mundo. Diosgenina demonstrou efeitos favoráveis como atividade anti-inflamatório, modulação do metabolismo lipídico, diminuição da glicose (MCANUFF et al., 2005), e atividades antioxidantes (SON et al., 2007; HSU et al., 2006). Uma suplementação de alimentos ricos em diosgenina tem apresentado o efeito de proteção do miocárdio em ratos, regredindo lesões decorrentes da necrose e apoptose (VASANTHI et al., 2010).

A Diosgenina apresentou-se eficaz na proteção contra a necrose induzida por isoproterenol em miocárdio de ratos (JAYACHANDRAN; VASANIHI; RAJAMANICKAM, 2009). Além disso, um estudo realizado por Choi et al., (2010), descobriu que a Diosgenina aumenta a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio. Outro achado importante sugere que a diosgenina tem um papel benéfico contra o remodelamento da aorta induzida pelo estresse oxidativo em estado diabético e diminui a peroxidação lipídica em aorta (PARI; MONISHA; JALALUDEEN, 2012). Os antioxidantes podem também reduzir a toxicidade de alguns fármacos quando associados com a quimioterapia, a diosgenina é uma molécula potencialmente antioxidante que possui um efeito útil na cardioproteção contra doxorubicina (CHEN et al., 2015).

Existem inúmeras substâncias de origens naturais e sintéticas que possuem consagrado efeito antioxidante. Porém, por vezes, essas substâncias apresentam algumas limitações nas

suas propriedades farmacocinética e farmacodinâmica que dificultam a expressão desse efeito terapêutico, como é o caso da baixa disponibilidade oral, da insolubilidade aquosa e do elevado mecanismo de primeira passagem (ZHAO et al., 2011; PENG et al., 2010; MANDAL et al., 2008).

Os lipossomas são sistemas tecnológicos propostos para liberação de substâncias biologicamente ativas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os lipossomas podem ser classificados em função do método de preparação (vesículas de evaporação de fase reversa ou técnica de extrusão), tamanho (vesícula pequena, intermédia ou grande), lamelaridade (vesículas unilamelares e multilamelares) e segundo a interação com os sistemas biológicos, como convencionais, de longa circulação e sítio-específicos. A formação de vesículas unilamelares (ULVs) ou vesículas multilamelares (MLVs) depende dos métodos de síntese e processamento utilizados após a sua preparação (BOZUTTO; MOLINARI, 2015).

Têm sido demonstrado o envolvimento dos lipossomas no aumento da eficácia antioxidante dos fármacos testados, protegem células do estresse oxidativo (RENGEL et al., 2005), reduzem a peroxidação lipídica (TIANG et al., 2007) e promovem uma melhor ativação de enzimas antioxidantes (PENG et al., 2010). Estudo realizado por Oliveira et al., (2013) sugeriu um positivo potencial antioxidante de lipossomas contendo nimodipina, ação verificada pela redução de radicais nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de Diosgenina incorporada em nanovesículas lipídicas, denominada de Diosgenina lipossomal (DL) em comparação com a Diosgenina livre (D) por meio da eliminação do radical livre estável, 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH), 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico) (ABTS), potencial redutor ( $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ), radical nitrito ( $NO^{\bullet}$ ) e peroxidação lipídica (TBARS), assim como, determinar a concentração efetiva inibitória (CE50) capaz de remover 50% desses radicais dos testes antioxidantes envolvidos nesse estudo.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Diosgenina na forma lipossomal

Os lipossomas contendo Diosgenina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico segundo Anselem, (1993) e modificado (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014). Inicialmente foram produzidos os lipossomas convencionais contendo diosgenina carregados positivamente (DL), utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina (lipídeo catiônico) a fim de conferir carga positiva à

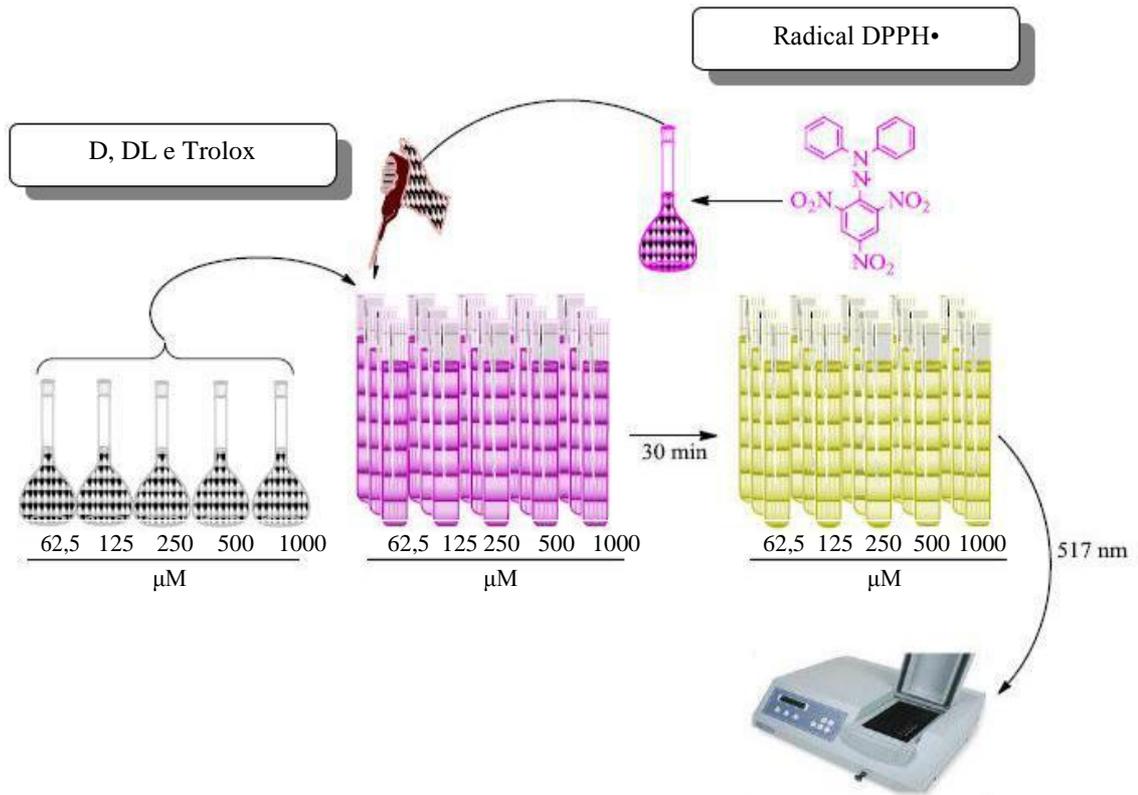
formulação (proporção de 80:10:10) e 3,0 mg/mL Diosgenina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídicas de 80 mM. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 40 min ( $37 \pm 1$  ° C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

## 2.2 Capacidade antioxidante contra o radical DPPH• (2,2-difenil-1- picrilhidrazil)

Para a avaliação antioxidante *in vitro* foi preparada uma solução estoque da Diosgenina livre (D), Diosgenina lipossomal (DL) e do padrão antioxidante trolox, diluídas em solução salina 0,9 % + Tween 0,05 %. Em seguida por diluições seriadas, foram obtidas soluções cujas concentrações foram 62,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM e 1000 µM. A seguir, preparou-se o radical DPPH• na concentração de 40 µg/mL em etanol, e ajustado sua absorvância em 1,00 no espectrofotômetro em leitura de 517 nm (**Figura 1**). A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores das absorvâncias expressos como porcentagem de inibição da absorvância da solução de DPPH• pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}\bullet = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual,  $A_{\text{controle}}$  é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH• e  $A_{\text{mistura reacional}}$  é a absorvância da mistura reacional contendo o radical DPPH• e as concentrações dos compostos. A concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) de DL, D e trolox necessária para inibir o radical DPPH• em 50% a 517 nm foi determinada (ABDERRAHIM et al., 2013).



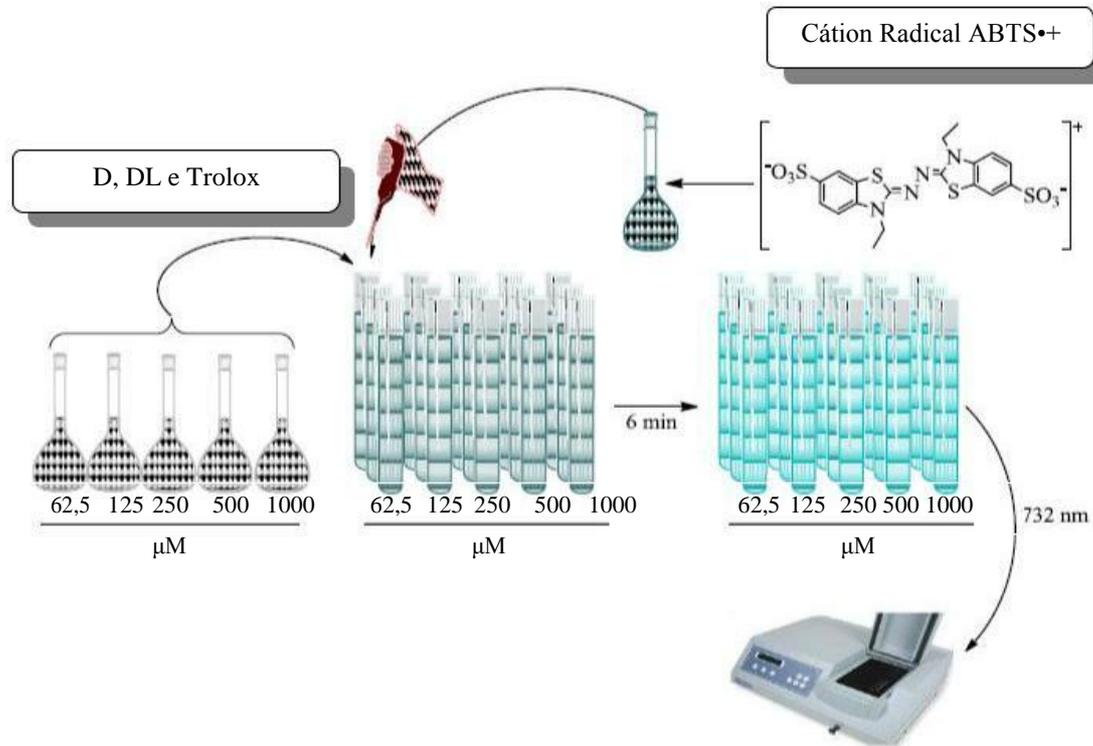
**Figura 1.** Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método DPPH•

### 2.3 Avaliação da capacidade antioxidante contra o radical ABTS•+ (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+, é formado o cátion radical ABTS•+ a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS•+ com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorvância de 1,00 a 734 nm. Na ausência de luz foi transferida uma alíquota de 200 µL de várias concentrações da Diosgenina anteriormente diluída e padrão para tubos de ensaio contendo 1960 µL do radical ABTS•+. A leitura da absorvância a temperatura ambiente foi realizado no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm (**Figura 2**) e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da absorvância da solução de ABTS•+ pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição do radical ABTS}\bullet+ = (A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100 / A_{\text{controle}}$$

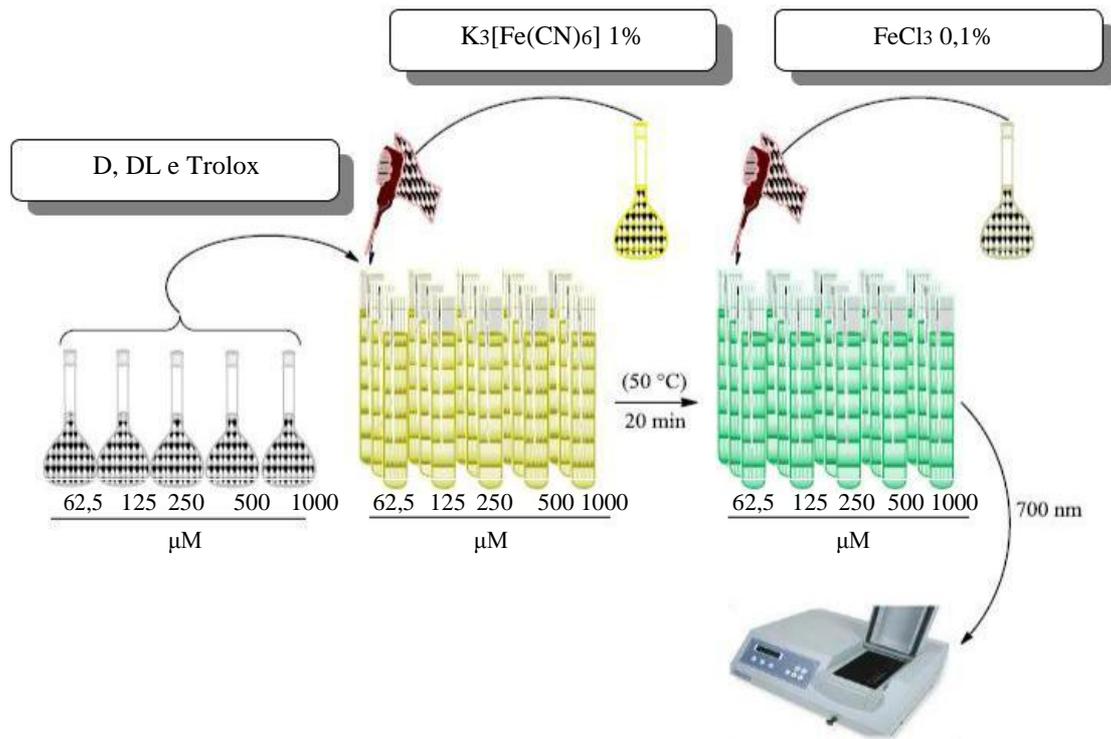
na qual,  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância inicial da solução etanólica de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e  $A_{\text{mistura reacional}}$  é a absorbância da mistura reacional contendo o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e as concentrações dos compostos (RE et al., 1999).



**Figura 2.** Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método  $\text{ABTS}^{\bullet+}$

#### 2.4 Avaliação do Potencial Redutor

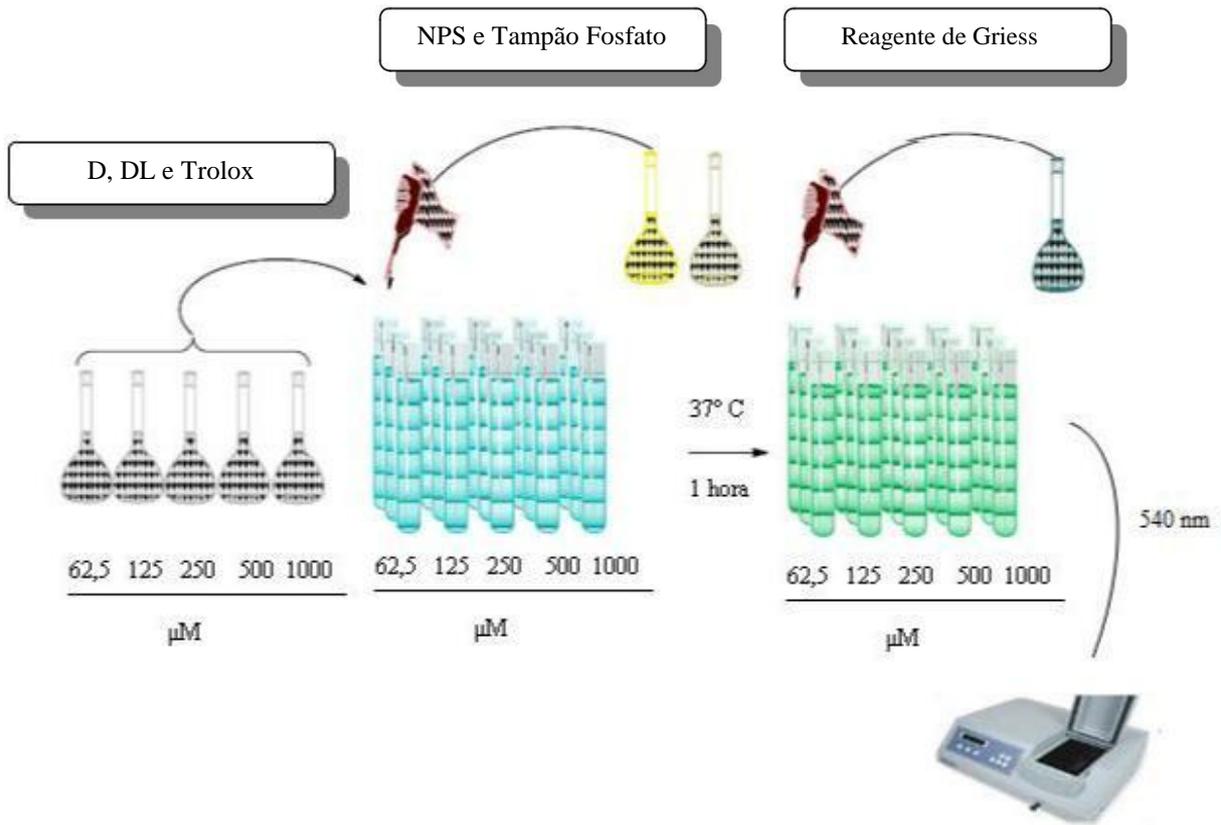
Para avaliação do potencial redutor, foi preparada uma mistura reacional contendo concentração única da Diosgenina livre, Diosgenina lipossomal e do padrão antioxidante trolox, diluídas em solução salina 0,9 % + Tween 0,05 %. Em seguida por diluições seriadas, foram obtidas soluções com concentrações de 62,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM e 1000 µM. À estas, adicionou-se 0,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6). A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 20 minutos, seguido pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 10 %, 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,1 %. A absorbância da mistura reacional foi mensurada a 700 nm contra branco que continham apenas tampão fosfato (**Figura 3**). A concentração de Diosgenina livre, Diosgenina lipossomal e trolox que proporcionou um aumento de 0,5 da absorbância ( $\text{CE}_{50}$ ) foi calculada (SINGHAL; PAUL; SINGH, 2013).



**Figura 3.** Avaliação do potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal

## 2.5 Capacidade antioxidante contra o radical nitrito (NO•)

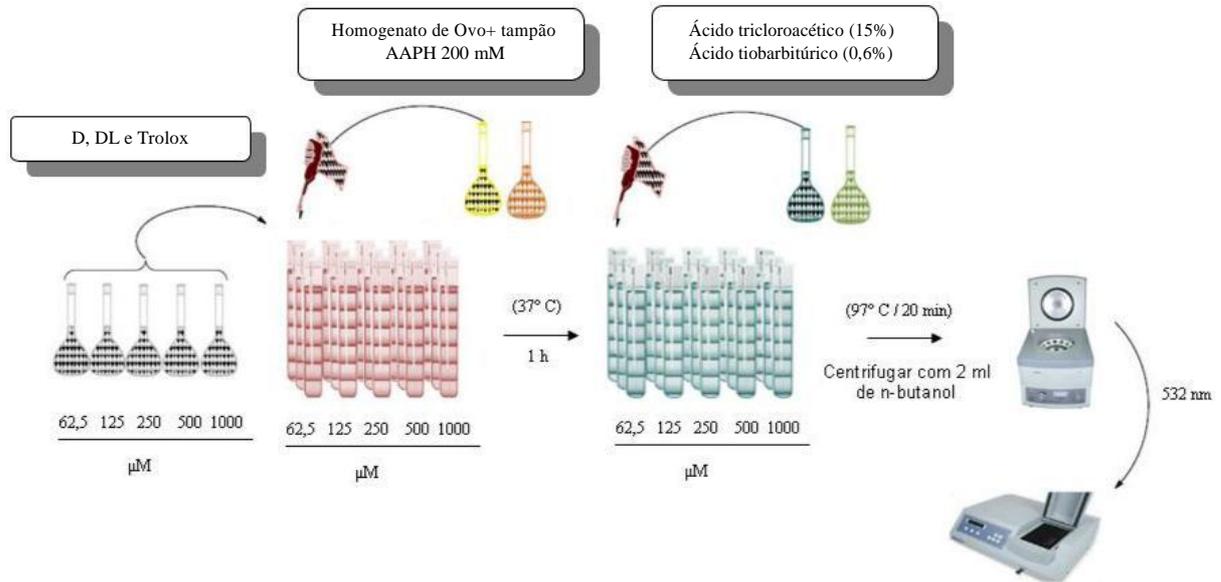
Nesta avaliação, o óxido nítrico foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o óxido nítrico interage com oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess. A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em tampão fosfato e várias concentrações Diosgenina livre e nanoencapsulada, além do trolox foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm em espectrofotômetro e os resultados foram expressos como porcentagem de nitrito formado pelo meio reacional, conforme **Figura 4**.



**Figura 4.** Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método do radical  $\text{NO}\cdot$

## 2.6 Capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica (TBARS)

Para a determinação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e lipossomal na inibição da peroxidação lipídica, foi utilizado o método TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico). Preparou-se uma solução estoque da Diosgenina livre, Diosgenina lipossomal e do padrão antioxidante Trolox, diluídas em solução salina 0,9 % + Tween 0,05 %. Em seguida por diluições seriadas, foram obtidas soluções com concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ . O homogenato da gema de ovo (1% w/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) é utilizado como substrato rico em lipídios. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida 200 mM), Ácido tricloroacético (15 %) e ácido tiobarbitúrico (0,6 %) (**Figura 5**). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de TBARS formadas a partir do AAPH (controle induzido).



**Figura 5.** Avaliação da capacidade antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal pelo método **TBARS**.

## 2.6 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Análise estatística foi realizada utilizando *one way* ANOVA, seguido pelo teste *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism 6.02* (San Diego, CA, USA). Os valores antioxidantes *in vitro* da CE50 foram obtidos por regressão linear utilizando o software *GraphPad Prism 6.02* (*GraphPad, Inc., Califórnia, EUA*).

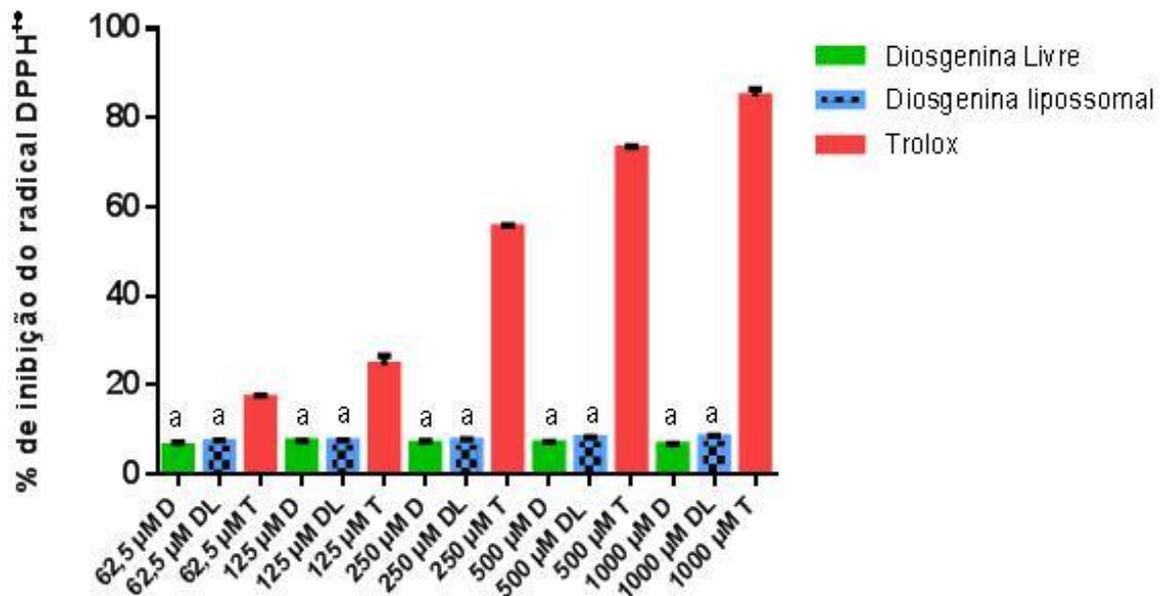
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Capacidade antioxidante contra o radical DPPH•

A Diosgenina livre nas concentrações de 62,5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM e 1000 µM produziu a remoção do radical DPPH (sistema), reduzindo seus níveis em 6,31%, 7,34%, 6,87%, 6,97%, e 6,51% respectivamente. A fração lipossomal nas mesmas concentrações finais da forma livre produziu a remoção do radical DPPH (sistema), reduzindo seus níveis em 7,20%, 7,37%, 7,47%, 8,06%, e 8,26% respectivamente. O trolox, usado como padrão antioxidante, nas mesmas concentrações reduziu os percentuais do radical DPPH em 17,09%,

24,57%, 55,49%, 73,08% e 84,75% respectivamente. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos para a Diosgenina lipossomal e livre (**Figura 6**).

Quando se comparam as concentrações efetivas medianas ( $CE_{50}$ ) observa-se que o potencial antioxidante da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal frente a este radical é extremamente baixo, quando comparado ao Trolox (Trolox;  $CE_{50} = 238,3 \mu\text{M} > DL CE_{50} = 1,629 \times 10^{21} \mu\text{M} > D CE_{50} = 1,745 \times 10^{22} \mu\text{M}$ ). Embora haja uma pequena diferença entre as  $CE_{50}$  da DL e D, esta diferença não é significativa.

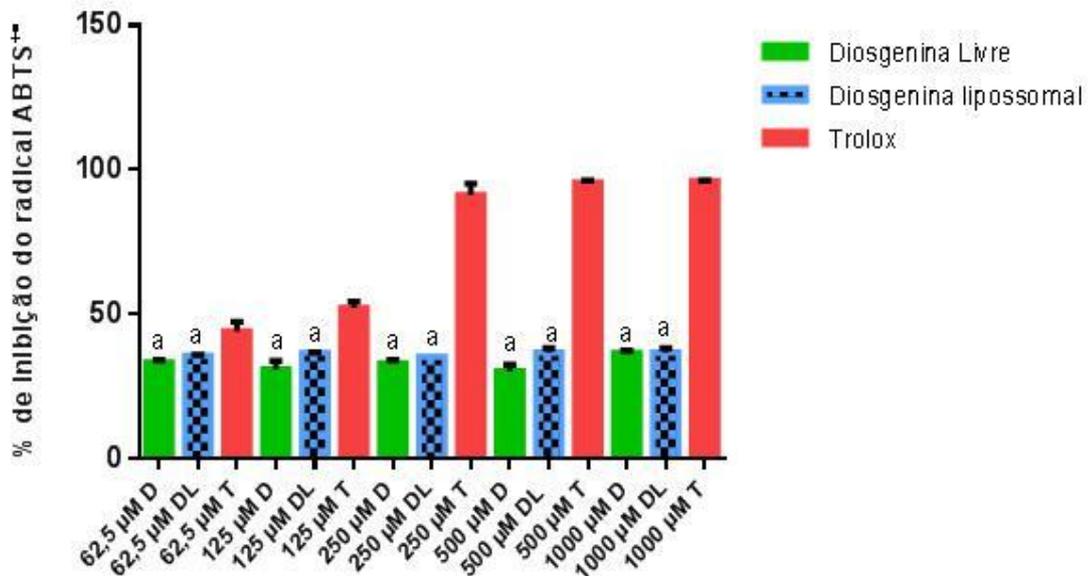


**Figura 6.** Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução do radical DPPH•. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , experimentos em triplicata. O trolox foi usado como padrão antioxidante. <sup>a</sup>  $p < 0,0001$  controles versus trolox (ANOVA e *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste).

### 3.2 Capacidade antioxidante contra o radical ABTS•+

A Diosgenina livre nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  produziu a remoção do radical ABTS, reduzindo seus níveis em 33,13%, 30,70%, 32,90%, 30,04%, e 36,59% respectivamente. A fração lipossomal nas mesmas concentrações da D produziu a remoção do radical ABTS (sistema), reduzindo seus níveis em 35,59%, 36,56%, 35,13%, 36,72%, e 36,65% respectivamente. O trolox, utilizado como padrão antioxidante reduziu os percentuais do radical ABTS em 43,98%, 52,22%, 91,14%, 95,74% e 96,06% respectivamente. No geral, não houve diferença estatística entre as versões da Diosgenina, lipossomal e livre (**Figura 7**).

Quando se comparam as concentrações efetivas medianas ( $CE_{50}$ ) observa-se que o potencial antioxidante da D e DL frente a este radical também é extremamente baixo, quando comparado ao Trolox (Trolox;  $CE_{50} = 86,17 \mu\text{M} > \text{DL}; CE_{50} = 4,29 \times 10^9 \mu\text{M} > \text{D}; CE_{50} = 9,49 \times 10^9 \mu\text{M}$ ). Embora haja uma pequena diferença entre as  $CE_{50}$  das diosgeninas, a mesma não é significativa.



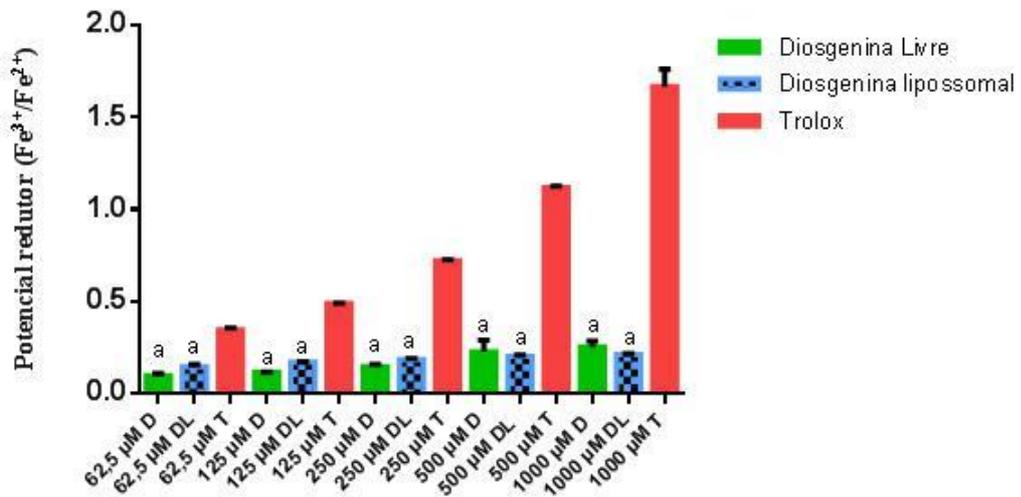
**Figura 7.** Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , experimentos em triplicata. O trolox foi usado como padrão antioxidante. <sup>a</sup>  $p < 0,0001$  controles versus trolox (ANOVA e Tukey multiple comparisons como *post hoc* teste).

### 3.3 Potencial Redutor

O potencial redutor em diferentes concentrações da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal, quando comparado ao padrão antioxidante Trolox é baixo, nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ , ambas as formas, livre e lipossomal aumentam a absorbância em 700 nm discretamente, demonstrando fraco a moderado poder redutor (**Figura 8**).

De acordo com esses resultados, os valores da  $CE_{50}$  de Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal necessárias para reduzir ferricianeto de potássio ( $\text{Fe}^{3+}$ ) à ferrocianeto de potássio ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em 50% da sua absorbância inicial foi de  $9,976 \times 10^3 \mu\text{M}$  e  $3,849 \times 10^6 \mu\text{M}$ ,

respectivamente. Ambas baixas, quando comparadas ao Trolox ( $CE_{50} = 110,6 \mu\text{M}$ ). Embora haja uma pequena diferença entre as  $CE_{50}$  da DL e D, esta diferença não é significativa.

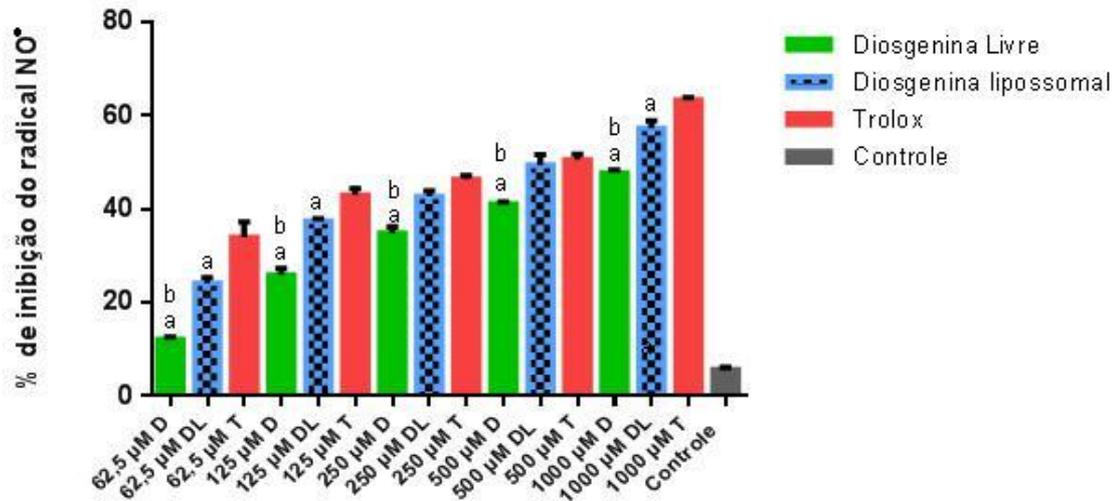


**Figura 8.** Potencial redutor da Diosgenina livre e Diosgenina Lipossomal. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das absorvâncias em 700 nm;  $n = 5$ , experimentos em triplicata. O trolox foi usado como padrão antioxidante.  $p < 0,0001$  controles versus trolox (ANOVA e *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste).

### 3.4 Capacidade antioxidante contra o radical nitrito ( $\text{NO}^{\cdot}$ )

As diferentes concentrações da Diosgenina livre e lipossomal exibiram atividade antioxidante dose-dependente, frente ao radical nitrito quando comparadas ao padrão antioxidante Trolox e em relação ao controle negativo. A diosgenina livre nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  inibiu a formação do radical nitrito em 12,19 $\pm$ 0,26%, 25,96 $\pm$ 0,79%, 34,92 $\pm$ 0,77%, 41,11 $\pm$ 0,22%, e 47,85 $\pm$ 0,32% respectivamente. A Diosgenina lipossomal nas mesmas concentrações inibiu a formação do radical nitrito em 24,19 $\pm$ 0,68%, 37,51 $\pm$ 0,26%, 42,71 $\pm$ 0,67%, 49,44 $\pm$ 1,28%, e 57,29 $\pm$ 0,94% respectivamente.

O Trolox, utilizado como padrão antioxidante, nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  inibiu a formação do radical nitrito em 34,07 $\pm$ 1,88%, 43,04 $\pm$ 0,79%, 46,45 $\pm$ 0,45%, 50,56 $\pm$ 0,72% e 63,37 $\pm$ 0,26% respectivamente (**Figura 9**). Foi observada diferença estatística significativa ante  $CE_{50}$  da DL e D, mostrando um resultado dose-dependente.



**Figura 9.** Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na inibição da formação do radical nitrito ( $\text{NO}^\bullet$ ). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , experimentos em triplicata. O Trolox foi usado como padrão antioxidante. <sup>a</sup> $p < 0,05$  concentrações-teste (D e DL) versus Trolox (ANOVA e *Tukey multiple comparisons* como *post hoc* teste) e <sup>b</sup> $p < 0,05$  Diosgenina livre versus Diosgenina lipossomal.

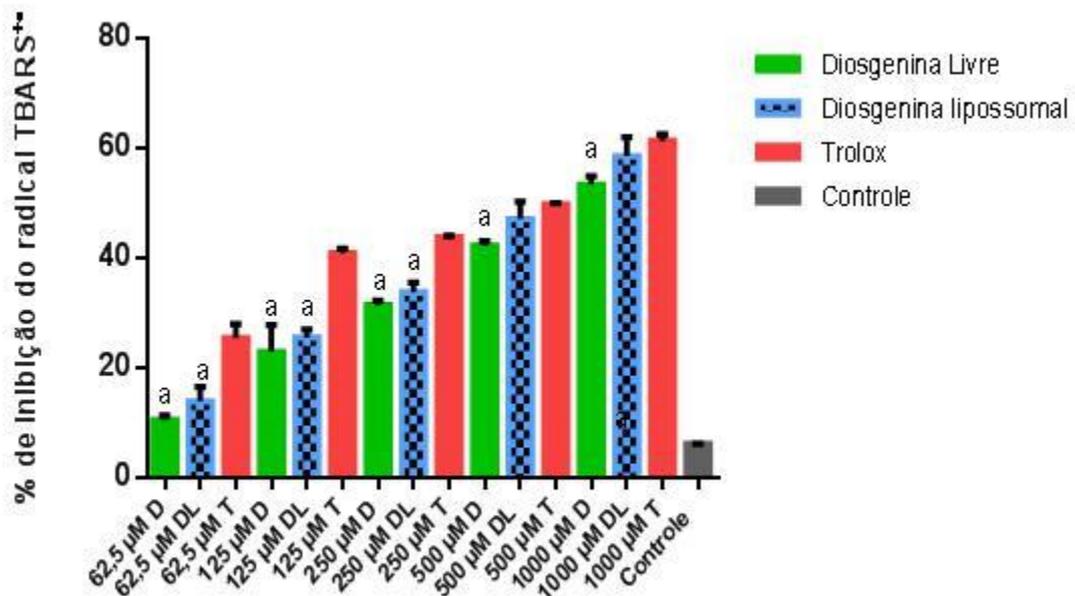
As concentrações efetivas medianas ( $\text{CE}_{50}$ ) obtidas foram: Trolox;  $\text{CE}_{50} = 372,5 \mu\text{M} > \text{DL}$ ;  $\text{CE}_{50} = 501,2 \mu\text{M} > \text{D}$ ;  $\text{CE}_{50} = 984,8 \mu\text{M}$ ; quanto menor a  $\text{CE}_{50}$ , melhor a atividade antioxidante uma vez que se necessita de uma menor concentração efetiva para se obter 50% da atividade; Pelas  $\text{CE}_{50}$  obtidas, observa-se que a Diosgenina livre apresenta uma atividade antioxidante frente ao radical nitrito menor quando comparada com sua forma lipossomal e com o Trolox.

### 3.5 Potencial antioxidante frente às formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As diferentes concentrações da Diosgenina livre e lipossomal exibiram atividade antioxidante dose-dependente, frente às formas reativas ao TBARS quando comparadas ao padrão antioxidante Trolox e em relação ao controle negativo. A Diosgenina livre nas concentrações de  $62,5 \mu\text{M}$ ,  $125 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  e  $1000 \mu\text{M}$  inibiu a peroxidação lipídica (TBARS) em  $10,46 \pm 0,44\%$ ,  $22,82 \pm 2,81\%$ ,  $31,37 \pm 0,45\%$ ,  $42,15 \pm 0,50\%$ , e  $53,29 \pm 0,88\%$  respectivamente. A Diosgenina lipossomal nas mesmas concentrações inibiu a

peroxidação lipídica em  $13,84 \pm 1,49\%$ ,  $25,45 \pm 0,82\%$ ,  $33,73 \pm 0,98\%$ ,  $47,02 \pm 1,85\%$ , e  $58,47 \pm 2,00\%$  respectivamente.

O Trolox, usado como padrão antioxidante, nas concentrações de  $62,5 \mu\text{M}$ ,  $125 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  e  $1000 \mu\text{M}$  inibiu a peroxidação lipídica em  $25,37 \pm 1,45\%$ ,  $40,86 \pm 0,44\%$ ,  $43,76 \pm 0,12\%$ ,  $49,69 \pm 0,17\%$  e  $61,29 \pm 0,65\%$  respectivamente (**Figura 10**). Foi observada diferença estatística significativa ante  $CE_{50}$  da DL e D, mostrando um resultado dose-dependente.



**Figura 10.** Efeitos da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal na redução da peroxidação lipídica em decorrência das formas associadas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS•). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , experimentos em triplicata. O Trolox foi usado como padrão antioxidante. <sup>a</sup> $p < 0,05$  concentrações-teste (D e DL) versus Trolox (ANOVA e Tukey multiple comparisons como *post hoc* teste).

As concentrações efetivas medianas ( $CE_{50}$ ) obtidas foram: Trolox;  $CE_{50} = 415,6 \mu\text{M} > \text{DL}$ ;  $CE_{50} = 607,9 \mu\text{M} > \text{D}$ ;  $CE_{50} = 788,7 \mu\text{M}$ ; quanto menor a  $CE_{50}$ , melhor a atividade antioxidante uma vez que se necessita de uma menor concentração efetiva para se obter 50% da atividade; Pelas  $CE_{50}$  obtidas, observa-se que a Diosgenina livre apresenta uma atividade antioxidante menor quando comparada com sua forma lipossomal e com o Trolox.

#### 4 DISCUSSÃO

O interesse crescente no estudo dos antioxidantes é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é indispensável à vida aeróbica e, dessa

forma, os radicais livres são produzidos naturalmente. Essas moléculas geradas *in vivo* estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (PEREIRA et al., 2009). O aumento na produção de radicais livres pode ocorrer devido à hiperóxia e à exposição das células ou indivíduos a certos componentes químicos, à radiação ou à inflamação tecidual local, resultando em estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, no qual ocorre predominância de radicais livres (HAIDA, 2011).

O radical DPPH• possui a cor púrpura ou violeta com uma absorção em solução de etanol ou metanol a 515-520 nm. Uma substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH•, que aceita para se tornar uma molécula estável diamagnético originando a forma reduzida DPPH-H com a perda da cor violeta de acordo com o tempo para amarelo pálido ou violeta claro. Mudança da cor violeta escuro para violeta claro, que resulta na diminuição da absorbância do radical DPPH•, pode ser monitorada por um espectrofotômetro UV/visível para a determinação da capacidade antioxidante. Esse monitoramento deve que ser realizado sempre na ausência de luz, por que a mesma é um fator que interfere diretamente na reação do radical DPPH• com uma substância, acelerando a diminuição da absorbância e consequente alterando os resultados finais (OLIVEIRA, 2015).

O método DPPH• é considerado fácil, altamente sensível, preciso, rápido, simples, econômico e o radical DPPH• não precisa ser gerado e o sistema de reação envolve somente o radical e o antioxidante (KEDARE; SINGH, 2011). Segundo Ferreira et al., (2012) o trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico) é utilizado como fármaco antioxidante padrão para experimentos *in vitro* e possui características semelhantes a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol).

Com base neste princípio, o resultado obtido no presente estudo demonstrou que a DL apresentou baixa capacidade antioxidante, na remoção do radical DPPH• como mostrado na **Figura 6** em comparação ao controle Trolox. Quando se comparam as concentrações efetivas medianas ( $CE_{50}$ ) observa-se que o potencial antioxidante da diosgenina livre e lipossomal frente a este radical é extremamente baixo, quando comparado ao Trolox (Trolox;  $CE_{50} = 238,3 \mu\text{M} > \text{DL}$ ;  $CE_{50} = 1,629 \times 10^{21} \mu\text{M} > \text{D}$ ;  $CE_{50} = 1,745 \times 10^{22} \mu\text{M}$ ), com diferença estatística não significativa para D e DL.

No estudo realizado por Selim e Jaouni (2015), onde se avaliou a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiangiogênica de Diosgenina isolado de *Costus speciosus* verificou-se que a amostra testada possuía afinidade antioxidante para uma eliminação eficaz contra o radical DPPH• em comparação com a atividade antioxidante da vitamina C,

resultados obtidos a partir do seu baixo valor  $CE_{50}$  que foi de 10,18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em comparação com a atividade antioxidante do padrão de vitamina C (ácido ascórbico) ( $CE_{50}$  3,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

O selenourea N-fenil (selenourea 13), um derivado esteroide da Diosgenina, apresentou-se com um positivo potencial antioxidante, em particular, contra os radicais livres DPPH• e glutathione peroxidase pela eliminação de peróxido de hidrogênio. O valor de  $CE_{50}$  para selenourea 13 foi de  $CE_{50}$  29,47  $\pm$  2,33  $\mu\text{M}$ , sendo notavelmente mais potente do que o Butilato de hidroxitolueno (70  $\pm$  9  $\mu\text{M}$ ), um antioxidante sintético amplamente conhecido, utilizado como um controle positivo (ROMERO-HERNANDEZ et al., 2015).

O radical ABTS•+ produzido por meio da oxidação da solução de ABTS+ pelo persulfato de potássio apresenta coloração azul/verde e a reação com um composto antioxidante é monitorada pela diminuição da absorvância da reação a 734 nm. Desta forma, o presente estudo demonstrou que a DL apresentou baixo potencial antioxidante na remoção do radical ABTS•+ em comparação ao trolox. Como ilustrado na **Figura 7** a capacidade antioxidante não foi dependente da concentração, nas concentrações testadas produziu a remoção do radical ABTS (sistema) reduzindo seus níveis, quando os resultados são comparados com a Diosgenina livre é possível observar que não há diferenças entre a capacidade antioxidante da DL contra o radical ABTS•+.

O cátion radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS•+) é um composto cromóforo quimicamente muito estável, solúvel em água e com um máximo de absorvância a 414 nm, incluindo medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815 nm. É solúvel tanto em solventes aquosos como orgânicos e não é afetado pela força iônica podendo então ser usado em muitos meios para determinar a capacidade antioxidante de extratos lipofílicos e hidrofílicos, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos (SUCUPIRA et al., 2012; AWIKA et al., 2003; MAZZA et al., 2002; SCALFI et al., 2000).

O poder redutor da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal foram avaliados pela transformação do ferricianeto de potássio ( $\text{Fe}_{3+}$ ) de cor amarela à ferrocianeto de potássio ( $\text{Fe}_{2+}$ ) de cor verde. Essa mudança de cor ocorre por meio da capacidade de transferência de elétrons, na qual, serve como um importante indicador da capacidade antioxidante. Processos como eliminação de radicais livres e/ou inibição da peroxidação lipídica é mediada pela reação redox e de acordo com o resultado obtido no presente estudo (**Figura 8**), a DL e D apresentaram baixo potencial redutor quando comparado ao padrão utilizado.

Durante condições patológicas e estresse oxidativo, um desequilíbrio no estado oxidante e antioxidante tem sido bem relatado em ambos os estudos humanos e experimentais. Reativos intermediários de oxigênio, incluindo o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e óxido nítrico (NO), a peroxidação

lipídica mediada por eventos de oxidação pode danificar biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono (RAJALINGAM et al., 2012).

O radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ), por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador de tal processo. Entretanto, a participação do ferro também é considerada fator determinante, ressaltando-se a importância da relação equimolar entre  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , para possibilitar a iniciação desse processo, por que os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (BARBOSA et al., 2010).

Na avaliação da capacidade antioxidante contra o radical nitrito o óxido nítrico (NO) foi produzido através da decomposição do nitroprussiato de sódio. As diferentes concentrações da Diosgenina livre e lipossomal exibiram atividade antioxidante dose-dependente, frente ao radical nitrito quando comparadas ao padrão antioxidante Trolox e em relação ao controle negativo, conforme **Figura 9**. Na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  a Diosgenina lipossomal inibiu a formação do radical nitrito em  $57,29 \pm 0,94\%$ , próximo ao padrão Trolox que foi de  $63,37 \pm 0,26\%$  na mesma concentração. É importante ressaltar que embora a Diosgenina livre tenha exibido um significativo potencial antioxidante, em todas as concentrações, esta foi menos efetiva em reduzir a formação do radical nitrito quando comparado ao Trolox e especialmente a DL, atraindo a atenção para a forma nanotecnológica, que se fez mais efetiva.

O NO é uma molécula sinalizadora envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive na sinalização da dor e inflamação (KAWANO et al., 2009). O tratamento realizado com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Diosgenina em cultura celular contendo macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi capaz de inibir significativamente a produção de óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) estimulada por lipopolissacarídeo bacteriano. O tratamento da amostra com Diosgenina reduziu em 38,1% os níveis de óxido nítrico e foi 3,7 vezes mais eficiente que o controle positivo utilizado, que neste estudo foi o metotrexato (SELIM; JAOUNI, 2015).

No estudo realizado por Jung et al., (2010), a Diosgenina inibiu a produção de NO por meio da diminuição da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) mostrado por uma redução na expressão dos níveis de RNAm da enzima e da proteína iNOS. Estes resultados excluem a possibilidade de que a Diosgenina afetada a estabilidade de iNOS pela expressão de RNAm, implicando que a ação da diosgenina é presumivelmente através da inibição da transcrição do gene de iNOS. Ficou demonstrado que a Diosgenina inibe a produção de mediadores

inflamatórios, visto que, o excesso na produção de óxido nítrico contribui para inúmeros processos patológicos, incluindo a inflamação.

Existem disponíveis na literatura outros relatos de lipossomas que atuam de forma promissora melhorando a ação antioxidante de determinadas substâncias. Como é o caso do pré-tratamento de células epiteliais do pulmão humano com lipossomas convencionais contendo Cu/Zn superóxido-dismutase que se mostraram eficientes para proteger essas células contra o estresse oxidativo, além de elevar consideravelmente as defesas antioxidantes celulares (RENGEL et al., 2005).

A peroxidação lipídica foi analisada pelo método de quantificação do TBARS, que é um ensaio utilizado extensivamente para estimar a peroxidação dos lipídeos nas membranas e sistemas biológicos. As diferentes concentrações da Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal exibiram atividade antioxidante dose-dependente, frente às formas reativas ao TBARS quando comparadas ao padrão antioxidante Trolox e em relação ao controle negativo (**Figura 10**). Enquanto a D foi menos efetiva em reduzir a peroxidação lipídica quando comparado ao Trolox, a DL nas maiores concentrações (500  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M) exibiu potencial antioxidante semelhante ao Trolox.

Uma das principais consequências do estresse oxidativo que leva a peroxidação lipídica, ocorre em ácidos graxos polinsaturados e se inicia com o radical  $\text{OH}\cdot$ , que ao capturar um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo, forma um radical. O fato do  $\text{O}_2$  ser mais solúvel em meio não polar que em meio polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de  $\text{O}_2$  na região hidrofóbica medial, na qual este tem potencial para realizar o maior dano aos ácidos graxos polinsaturados da membrana (REED, 2011).

A peroxidação lipídica é induzida por estresse oxidativo e pode ser minimizada pelo uso de antioxidantes (CHENNURU; SALEEM, 2013). Os antioxidantes são conhecidos como um grupo de substâncias que em ideais concentrações podem atrasar ou inibir os processos oxidativos (BOLISSETTY; JAIMES, 2013; VICENTINO; MENEZES, 2007).

A administração oral de Diosgenina tem sido associada a sua capacidade de eliminação de radicais livres e captura de moléculas de oxigênio de forma isolada. A Diosgenina foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- $\alpha$ , proteína-1 quimioatrativa de monócitos e de óxido nítrico induzido pela interação entre adipócitos e macrófagos (HIRAI et al., 2010). Saha et al., (2014), verificaram que a Diosgenina apresenta propriedades antioxidantes, visto que, suprimiu a peroxidação lipídica induzida por cristais de oxalato de cálcio monohidratado e aumentou os níveis de

glutationa peroxidase, assim como, o efeito protetor foi associado à inibição de caspases e do estresse oxidativo.

A administração oral de Diosgenina em estudos experimentais *in vivo* diminuiu significativamente os níveis de TBARS no plasma e nos eritrócitos de hamsters tratados com 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA), sugerindo que a Diosgenina apresenta potencial antioxidante melhorando o estado de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, com potencial anti-lipidioperoxidativo no processo de carcinogênese oral. Quantificação de TBARS no plasma é considerada como um verdadeiro biomarcador para avaliar a extensão de danos nos tecidos durante condições patológicas (RAJALINGAM et al., 2012). Do mesmo modo, um estudo sobre a aorta de ratos diabéticos tem igualmente demonstrado os efeitos benéficos de Diosgenina em melhorar estado antioxidante e diminuindo a peroxidação lipídica (PARI; MONISHA; JALALUDEEN, 2012).

O tratamento com 100 mg/kg com Diosgenina reduziu significativamente os danos hemodinâmicos, minimizou o estresse oxidativo, inflamatório e apoptóticos provocados em ratos pela administração de monocrotalina. A Diosgenina melhorou significativamente os níveis de TBARS, glutaciona, mieloperoxidase e conteúdo de TNF-α nos tecidos cardíacos e pulmonar nos ratos tratados com monocrotalina, visto que, o estresse oxidativo foi associado a elevação dos níveis de TNF-α e mieloperoxidase (AHMED et al., 2014). O mecanismo molecular da Diosgenina está diretamente relacionado à sua notável capacidade para eliminar a maior parte das espécies reativas de oxigênio, devido à presença de um grupo hidroxila na sua estrutura (HAMRITA et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que Diosgenina fortalece e regula positivamente defesa antioxidante contra os radicais livres em modelos de estresse oxidativo induzido (CHIU et al., 2011). O elevado conteúdo de glutaciona após tratamento com Diosgenina é um dos principais mecanismos antioxidante na mediação da proteção cardiovascular (MANIVANNAN et al., 2013).

Dentro dessa mesma perspectiva, pode ser atribuída a superior capacidade antioxidante de vesículas lipossomais carregadas com Diosgenina devido ao menor tamanho dos carreadores nanométricos, que aumentam a extensão de contato com o meio e conseqüentemente, melhora da solubilidade do fármaco, assim como seu potencial de interação, além dessas vesículas poderem promover a liberação controlada da Diosgenina.

Em adição, foi sugerido a provável influência dos lipídeos de membrana, fosfatidilcolina e colesterol, com a propagação do potencial antioxidante desse fármaco. De modo que quando a Diosgenina foi encapsulada em lipossomas a atividade antioxidante aumentou nos testes de nitrito e TBARS, indicado haver maior liberação e dispersão do fármaco nesses meios reacionais. No entanto, o potencial antioxidante frente aos radicais

DPPH•, ABTS•+ e potencial redutor não aumentou, sugerindo que neste meio a Diosgenina liberada pode interagir com moléculas de fosfatidilcolina e colesterol, fazendo ligações de hidrogênio entre os oxigênios destes compostos e os hidrogênios contidos na molécula, impedindo dessa forma que a Diosgenina exerça sua ação antioxidante de forma efetiva.

## 5 CONCLUSÃO

A análise dos resultados mostrou baixos percentuais de inibição dos radicais DPPH•, ABTS•+ e potencial redutor da Diosgenina livre e da Diosgenina lipossomal, não mostrando diferença estatística entre ambos, quando comparado ao trolox. No entanto, a Diosgenina tanto na sua forma livre quanto na sua forma lipossomal exibiu significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico e ao radical nitrito, evidenciado pelo cálculo de suas concentrações efetivas medianas (CE<sub>50</sub>), também é possível perceber que a forma nanotecnológica exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada. Desta forma, se faz necessário avaliar a capacidade antioxidante *in vivo* no sentido de esta formulação possa ser caracterizada ou não com atividade antioxidante e sua aplicação para uso em processos oxidativos, como os que acometem o sistema cardiovascular.

## REFERÊNCIAS

ABDERRAHIM, F.; ARRIBAS, S.M.; GONZALEZ, M.C.; CONDEZO-HOYOS, L. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 788-794, 2013.

AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 154, p. 51-56, 2016.

AHMED, L. A.; OBAID, A. A. Z.; ZAZI, H. F.; AGHA, A. M. Role of oxidativ estress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.740, n. 5, p. 379-387, 2014.

ANCHIÊTA-JUNIOR, J. J. L.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, J. M. F.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumoraes humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E.A. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n. 3, p. 6306-6344, 2013.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975-999, 2015.

CHEN, C. T.; WANG, Z. H.; HSU, C. C.; LIN, H. H.; CHEN, J. H. In Vivo Protective Effects of Diosgenin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Nutrients**, v. 7, p. 4938-4954, 2015.

CHEN, Y.; TANG, Y. M.; YU, S. L.; HAN, Y. W.; KOU, J. P.; LIU, B. L.; YU, B. Y. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 8, p. 578-587, 2015.

CHENNURU, A.; SALEEM, M. T. Antioxidant, lipid lowering, and membrane stabilization effect of sesamol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in experimental rats. **BioMed research international**, v. 2013, p. 934-939, 2013.

CHIU, C. S.; CHIU, Y. J.; WU, L. Y.; LU, T. C.; HUANG, T. H.; HSIEH, M. T.; LU, C. Y.; PENG, W. H. Diosgenin ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. **Am. J. Chin. Med.**, v. 39, n. 3, p. 551-563, 2011.

CHOI, K. W.; PARK, H. J.; JUNG, D. H.; KIM, T. W.; PARK, Y. M.; KIM, B. O.; SOHN, E. H.; MOON, E. Y.; UM, S. H.; RHEE, D. K. Inhibition of TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via down regulation of the MAPK, Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Vasc. Pharmacol.**, v. 53, n. 5-6, p. 273-280, 2010.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes de noni (*Morinda citriflora* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

FERREIRA, P. B.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. M. Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 5, p. 153-156, 2012.

HAIDA, K. S.; BARON, A.; SILVA, F. J.; ARCELES, M. L.; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A. P. COSTA, J. H. B. Free radicals' sequestering activities and the determination of total phenolic contents of sage and eucalyptus. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61-66, 2011.

HAMRITA, B.; ROUISSI, K.; KOUIDHI, S.; JAOUADI, B.; ELGAAIED, A. B. Do diosgenin ameliorate urinary bladder toxic effect of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine in experimental animal models? **Afr. J. Biotechnol**, v. 11, n. 8, p. 2146-2153, 2012.

HIRAI, S.; UEMURA, T.; MIZOGUCHI, N.; LEE, J. Y.; TAKETANI, K.; NAKANO, Y.; HOSHINO, S.; TSUGE, N.; NARUKAMI, T.; YU, R.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Diosgenin attenuates inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 54, n. 6, p. 797-804, 2010.

HSU, C. C.; HUANG, Y. C.; YIN, M. C.; LIN, S. J. Effect of yam (*Dioscorea alata* vs. *Dioscorea japonica*) on gastrointestinal function and antioxidant activity in mice. **J. Food Sci.**, v. 71, n. 7, p. 513-516, 2006.

JAGADEESAN, J.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Diosgenin, a steroidal saponin, exhibits anticancer activity by attenuating lipid peroxidation via enhancing antioxidant defense system during NMU-induced breast carcinoma. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 31, n. 2, p.121-129, 2012.  
JAYACHANDRAN, K. S.; VASANTHI, H. R.; RAJAMANICKAM, G.V. Antilipoperoxidative and membrane stabilizing effect of diosgenin, in experimentally induced myocardial infarction. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 327, n. 1-2, p. 203-210, 2009.

JUNG, D. H.; PARK, H. J.; BYUN, H. E.; PARK, Y. M.; KIM, T. W.; KIM, B. O.; UM, S. H.; PYO, S. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through down regulation of CK2, JNK, NF- $\kappa$ B and AP-1 activation. **International Immuno pharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1047-1054, 2010.

KAWANO, S.; YAMANO, K.; NAOÉ, M.; MOMOSE, T.; TERAOKA, K.; NISHIKAWA, S.; WATANABE N.; ENDO T. Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n. 34, p. 14403-14407, 2009.

KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

MANDAL, A.K.; DAS, S.; MITRA, M.; CHAKRABARTI, R.N.; CHATTERJEE, M.; DAS, N. Vesicular flavonoid in combating diethylnitrosamine induced hepatocarcinoma in rat model. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2008.

MANIVANNAN, J.; BALAMURUGAN, E.; SILAMBARASAN, T.; RAJA, B. Diosgenin improves vascular function by increasing aortic eNOS expression, normalize dyslipidemia and ACE activity in chronicrenal failure rats. **Mol. Cell. Biochem**, v. 384, n. 1-2, p. 113-120, 2013.

MAZZA, G.; KAY, C. D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7731-7737, 2002.

MCANUFF, M. A.; HARDING, W. W.; OMORUYI, F. O.; JACOBS, H.; MORRISON, E. Y.; ASEMOTA, H. N. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, n 11, p.1667-1672, 2005.

MORENO, L. C.; SILVA-OLIVEIRA, G. Z.; CAVALCANTI, I. M.; SANTOS MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 116, p. 64-8, 2014.

NASH, K. M.; AHMED, S. Nanomedicine in the ROS-mediated pathophysiology: Applications and clinical advances. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.11, n. 8, p. 2033-2040, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, G. Z. S. **Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais**. 2013. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí - UFPI, Piauí.

PARI, L.; MONISHA, P.; JALALUDEEN, A. M. Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 691, p. 143-150, 2012.

PENG, C.H.; CHANG, C.H.; PENG, R.Y.; CHYAU, C.C. Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 154-161, 2010.

PEREIRA, A.L.F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P.B.L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

RAJALINGAM, K.; SUGUNADEVI, G.; VIJAYAANAND, M. A.; KALAIMATHI, J.; SURESH, K. Anti-Tumour and Anti-Oxidative Potential of Diosgenin against 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Experimental Oral Carcinogenesis. **Pathol. Oncol. Res**, v. 18, n. 2, p. 405-412, 2012.

RE, R., PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RENGEL, R. G.; GRČIĆ, J. F.; ČEPELAK, I.; GRUBIŠIĆ, T. Z.; BARIŠIĆ, K. The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2005.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.

ROMERO-HERNANDEZ, L. L.; MERINO-MONTIEL, P.; MONTIEL-SMITH, S.; MAEZA-REYES, S.; VEJA-BAEZ, L.; ABASOLO, I.; SCHWARTZ-JR, S.; LOPEZ, O.; FERNANDEZ-BOLANOS, J. Diosgenin-based thio(seleno)ureas and triazolyl glycoconjugates as hybrid drugs. Antioxidant and antiproliferative profile. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.99, p. 67-81, 2015.

ROHENKOHL, C. C.; CARNIEL, A. P.; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 24, n. 1, p. 107-112, 2011.

SAHA, S.; GOSWAMI, G.; PANDRANGI, A. Isolation and prevention of calcium oxalate-induced apoptotic death and oxidative stress in MDCK cells by diosgenina. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 51–57, 2014.

SCALFI, L.; FOGLIANO, V.; PENTANGELO, A.; GRAZIANI, G.; GIORDANO, I.; RITIENI, A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1363-1366, 2000.

SELIM, S.; JAOUNI, S. A. Anti-inflammatory, antioxidant and antiangiogenic activities of diosgenina isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm. **Natural Product Research**, v. 29, p. 1-4, 2015.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, *In press*, 2013.

SON, I. S.; KIM, J. H.; SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KIM, J. S.; KWON, C. S. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.) on high-cholesterol fed rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71, n. 12, p. 3063-3071, 2007.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A. G.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TIANG, Y.Y.; GE, L.; DUAN, X.L.; GAO, Z. Q.; CHANG, Y. Z. Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1107-1111, 2007.

VASANTHI, H. R.; MUKHERJEE, S.; RAY, D.; PANDIAN JAYACHANDRAN, K. S.; LEKLI, I.; DAS, D. K. Protective role of air potato (*Dioscorea bulbifera*) of yam family in myocardial ischemic reperfusion injury. **Food Funct.**, v. 1, n. 3, p. 278–283, 2010.

VICENTINO, A. R. R; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

ZHAO, G.; ZANG, S.Y.; JIANG, Z.H.; CHEN, Y.Y.; JI, X.H.; LU, B.F.; WU, J.H.; QIN, G.W.; GUO, L.H. Postischemic administration of liposome-encapsulated luteolin prevents against ischemia-reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 929-936, 2011.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas realizadas em bancos de dados tecnológicos e científicos mostraram que a Diosgenina é uma molécula que vêm sendo estudada para diversos fins terapêuticos e no âmbito de ação no sistema cardiovascular, porém o campo continua aberto para novas pesquisas serem desenvolvidas, visto que, não foram constatadas patentes brasileiras envolvendo a utilização de Diosgenina. Deve-se destacar que há o interesse da indústria farmacêutica por novos produtos gerados a partir de fontes naturais.

Portanto, é necessário estimular uma cultura que incentiva a proteção dos resultados das invenções através das patentes, com o propósito de crescimento científico e tecnológico com ênfase na descoberta de um maior número de moléculas derivadas de produtos naturais evidenciando suas aplicações farmacológicas.

A Diosgenina foi incorporada em nanossistemas lipossomais e os resultados apontam que é possível a encapsulação de Diosgenina em lipossomas convencionais e peguilados, com eficiente taxa de encapsulação, através da utilização do método de hidratação do filme lipídico. A caracterização físico-química destes sistemas apresentaram características que são satisfatórias para testes *in vivo*, além disso, as formulações apresentaram estabilidade por tempo mais prolongado quando liofilizadas. Quanto a resposta hipotensora esperada não foi verificada.

As análises antioxidantes realizadas com o Diosgenina livre e Diosgenina lipossomal frente aos radicais DPPH•, ABTS•+ e potencial redutor não apresentaram bons efeitos redutores. Entretanto, a Diosgenina tanto na sua forma livre quanto na sua forma lipossomal exibiu significativo potencial antioxidante frente à peroxidação lipídica por formas reativas associadas ao ácido tiobarbitúrico e ao radical nitrito, é possível perceber através dos resultados obtidos que a forma nanotecnológica exibiu um maior potencial antioxidante em relação à sua forma isolada.

## 7 PERSPECTIVAS

A Diosgenina é um fitohormônio com diversas aplicações farmacológicas, porém devido sua baixa solubilidade aquosa foi proposto à incorporação desta molécula em um nanossistema lipossomal, os resultados mostraram que é possível a encapsulação de Diosgenina em lipossomas convencionais e peguilados, com eficiente taxa de encapsulação, com características satisfatórias para realização de testes *in vivo* e *in vitro*. No entanto, para aplicação no sistema cardiovascular a Diosgenina lipossomal na concentração de produção de 3 mg/mL não apresentou resultados satisfatórios, desta forma o estudo traz como perspectivas aumentar a concentração de Diosgenina nos sistemas lipossomais, mantendo a eficiência de encapsulação o mais próximo possível de 100% e avaliar a resposta sobre o sistema cardiovascular.

Com uma formulação estável, com uma boa resposta farmacológica sobre o sistema cardiovascular o grupo de pesquisa pretende solicitar junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial o pedido de depósito de patente, a fim de proteger a invenção e utilização desta formulação em variados sistemas biológicos, incluindo o sistema cardiovascular, mecanismos antioxidantes e frente a processos oncogênicos.