



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dara Djenifer Rodrigues Grundmann

Dissertação de mestrado

**Nanopartículas híbridas visando aumento da biodisponibilidade oral de
sinvastatina associada a coenzima Q10 – Estudos *in vitro* e *in vivo***

FLORIANÓPOLIS

2024

Dara Djenifer Rodrigues Grundmann

**Nanopartículas híbridas visando aumento da biodisponibilidade oral de
sinvastatina associada a coenzima Q10 – Estudos *in vitro* e *in vivo***

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a
obtenção do título de mestre em
Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Hellen
Karine Stulzer

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Grundmann, Dara Djenifer
Nanopartículas híbridas visando aumento da
biodisponibilidade oral de sinvastatina associada a
coenzima Q10 - Estudos in vitro e in vivo / Dara Djenifer
Grundmann ; orientador, Hellen Stulzer, 2024.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Nanopartículas Híbridas. 3. Supersaturação.
4. Sepse. 5. Sinvastatina e coenzima Q10. I. Stulzer,
Hellen . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Dara Djenifer Rodrigues Grundmann

**Nanopartículas híbridas visando aumento da biodisponibilidade oral de
sinvastatina associada a coenzima Q10 – Estudos *in vitro* e *in vivo***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luis Felipe Costa Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dra. Camila Fabiano de Freitas Marin
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dra. Christiane Fernandes Horn
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química obtido pelo
Programa de Pós-Graduação em Química.

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Coordenador do Programa

Prof^a. Dra. Hellen Karine Stulzer
Orientadora

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Uma pesquisa não se realiza apenas com o esforço individual, mas sim com a colaboração de várias pessoas e a troca de conhecimentos através de inúmeras discussões. Da mesma forma, nossa jornada na vida requer fonte de apoio: pessoas que nos inspiram, nos amam e nos motivam, boas amizades, escolhas sábias e oportunidades que surgem. É essa rede de suporte e influências positivas que nos fortalece e nos impulsiona a alcançar nossos objetivos e encontrar significado em nossa jornada.

Portanto, agradeço...

A Deus

Por ser fonte de esperança, força, luz e energia. Pelo dom da vida, pela saúde, coragem e proteção. E principalmente por ser presente em minha vida.

A minha família

Que de alguma forma sempre esteve presente no processo. Obrigada pela confiança em mim depositada. Agradeço especialmente a minha avó e mãe de coração, Darli Grundmann, por ser um exemplo de garra e força.

Ao meu companheiro de vida, Leonardo

Por ser fonte inesgotável de incentivo, paciência, conforto, compreensão e carinho. Por ser o meu amor, meu ponto de paz, meu melhor amigo e por entender e aceitar todas as minhas escolhas.

As minhas amigas – Carolina Lourenço, Izabelle Boza e Nicolly Bittencourt

Por toda ajuda, incentivo, dicas compartilhadas, boas risadas e pela nossa grande amizade. Agradeço especialmente a melhor aluna de iniciação científica que eu poderia ter durante o mestrado, Carolina Lourenço, obrigada por todo auxílio durante os experimentos, pelas inúmeras discussões sobre o nosso projeto e pelas boas reflexões sobre a vida durante esse processo.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Hellen Karine Stulzer

Por ter aceitado me orientar, por todos os ensinamentos, confiança e por me incentivar a sempre manter o foco naquilo que almejamos.

Ao Prof^o Dr. Fabio Sonvico

Pela parceria e apoio no nosso trabalho conjunto, além das generosas doações das matérias-primas. Sua contribuição foi fundamental para o sucesso do nosso projeto.

Ao LabCQ

Por todas as contribuições, estrutura e por serem estas pessoas sempre dispostas a ajudar.

Ao POLIMAT, POLISSOL, LABCARE, LCME-UFSC, CENTRALCRON e Central de análises do departamento de química da UFSC

Pela infraestrutura, contribuição e realização das análises.

A UFSC e ao PPGQ

Pela infraestrutura, apoio técnico, administrativo e financeiro

A Capes

Pela concessão da bolsa de estudos

Por fim, deixo o meu muito obrigada e agradeço a todos que fizeram parte dessa etapa.

“ A ciência se compõem de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”

Júlio Verne

RESUMO

A baixa solubilidade de fármacos representa um desafio significativo no desenvolvimento de formulações eficazes. A sinvastatina (SIN), usada no tratamento da hipercolesterolemia, e por apresentar efeitos pleiotrópicos também é utilizada na sepse, enfrenta limitações devido a efeitos adversos, como miopatias, o que restringe sua utilização. Portanto, a associação entre SIN e coenzima Q10 (Q10) é considerada biologicamente plausível e pode auxiliar a minimizar os efeitos adversos. Porém, ambas substâncias são classificadas como classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS, do inglês *Biopharmaceutic Classification System*), devido às suas características físico-químicas. Uma estratégia tecnológica promissora para melhorar as propriedades biofarmacêuticas dessas substâncias são os Sistemas Supersaturados de Liberação de Fármacos (SDDS, do inglês *Supersaturating Drug Delivery Systems*), que mantêm um estado de supersaturação transitório no trato gastrointestinal, aumentando assim a biodisponibilidade. Os SDDS incluem várias abordagens tecnológicas, como as nanopartículas híbridas. Neste estudo, nanopartículas híbridas foram produzidas pela técnica de *self-assembly* e utilizadas para encapsular SIN e Q10, resultando em formulações com propriedades biofarmacêuticas aprimoradas. Este estudo incluiu avaliações *in vitro* e *in vivo*. Os resultados indicaram que as nanopartículas de 1mg.mL⁻¹ apresentaram alta eficiência de encapsulação de aproximadamente 80%, distribuição uniforme de tamanho (NH SIN 214,03 ± 2,95, NH Q10 238,8 ± 1,70 e NH SQ 254,63 ± 3,19), morfologia esférica e estáveis num período de 28 dias a 5°C. Duas das formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto ao seu perfil de supersaturação e seu potencial contra a sepse, comparadas com sua forma em pó não encapsulada. O estudo de supersaturação revelou um aumento transitório da solubilidade de 10,56 vezes devido à formação do *parachute* em meio biorrelevante FaSSGF, que simula condições estomacais, indicando uma possível melhora da solubilidade já na fase inicial do trato gastrointestinal. Estudos *in vivo* foram conduzidos para avaliar o potencial das nanopartículas híbridas produzidas em um modelo experimental de sepse. No entanto, as nanoformulações não demonstraram efeito protetor neste modelo experimental. Ademais, foram realizados estudos de secagem por liofilização para melhorar a estabilidade das nanopartículas, e as propriedades do estado sólido avaliadas, mostraram formulações com características amorfas, o que é promissor para melhorar a solubilidade.

Palavras-chave: Sinvastatina. Coenzima Q10. Solubilidade. Nanopartículas híbridas. Supersaturação. Sepse.

ABSTRACT

The low solubility of drugs represents a significant challenge in the development of effective formulations. Simvastatin (SIN), used in the treatment of hypercholesterolemia and due to its pleiotropic effects also utilized in sepsis, faces limitations due to adverse effects such as myopathies, which restrict its use. Therefore, the association between SIN and coenzyme Q10 (Q10) is considered biologically plausible and may help minimize adverse effects. However, both substances are classified as Class II in the Biopharmaceutic Classification System (BCS) due to their physicochemical characteristics. A promising technological strategy to improve the biopharmaceutical properties of these substances is Supersaturating Drug Delivery Systems (SDDS), which maintain a transient supersaturation state in the gastrointestinal tract, thus increasing bioavailability. SDDS includes various technological approaches such as hybrid nanoparticles. In this study, hybrid nanoparticles were produced by the self-assembly technique and used to encapsulate SIN and Q10, resulting in formulations with enhanced biopharmaceutical properties. This study included *in vitro* and *in vivo* evaluations. The results indicated that nanoparticles at 1 mg/mL exhibited high encapsulation efficiency of approximately 80%, uniform size distribution (NH SIN 214.03 ± 2.95 , NH Q10 238.8 ± 1.70 , and NH SQ 254.63 ± 3.19), spherical morphology, and stability over a period of 28 days at 5°C. Two of the developed formulations were evaluated for their supersaturation profile and potential against sepsis, compared with their unencapsulated powder form. The supersaturation study revealed a transient increase in solubility of 10.56 times due to the formation of the parachute in FaSSGF biorelevant medium, simulating stomach conditions, indicating a possible improvement in solubility already in the initial phase of the gastrointestinal tract. *In vivo* studies were conducted to evaluate the potential of the produced hybrid nanoparticles in an experimental sepsis model. However, the nanoformulations did not demonstrate a protective effect in this experimental model. Furthermore, lyophilization studies were performed to improve the stability of nanoparticles, and the properties of the solid state evaluated showed formulations with amorphous characteristics, which is promising for enhancing solubility.

Keywords: Simvastatin. Coenzyme Q10. Solubility. Hybrid nanoparticles. Supersaturation. Sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutico.....	25
Figura 2. O conceito Spring and Parachute	29
Figura 3. Estratégias de formulações supersaturáveis.....	30
Figura 4. Estrutura de NH lipídico-poliméricas	32
Figura 5. Ação das estatinas na síntese do colesterol	35
Figura 6. Ativação <i>in vivo</i> da sinvastatina.	36
Figura 7. Estrutura química do HMG-CoA e seu análogo na estrutura ativa da sinvastatina	37
Figura 8. Ciclo do mevalonato.....	39
Figura 9. Cadeia transportadora de elétrons	40
Figura 10. Estrutura química da Q10	41
Figura 11. Processo de liofilização.....	45
Figura 12. Representação do processo de desenvolvimento das NH.....	48
Figura 13. Representação esquemática do experimento de avaliação hemodinâmica	56
Figura 14. Grupos experimentais: intervenção e tratamento.....	58
Figura 15. Delineamento experimental.....	59
Figura 16. Curvas de distribuição de tamanho de partícula das (A) NH BRANCA, (B) NH S, (C) NH Q e (D) NH SQ obtidas através do Zetasizer	64
Figura 17. Imagens de TEM das (A) NH BRANCA, (B) NH S, (C) NH Q e (D) NH SQ.....	67
Figura 18. Estudos de supersaturação das NH S, NH SQ e SS e suas respectivas AUC nos meios biorrelevantes (A-B) FaSSGF e (C-D) FaSSIF	73
Figura 19. Efeito do tratamento com SIN nos valores basais da pressão arterial, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal.....	76
Figura 20. Efeito do tratamento com SIN na resposta a angiotensina II na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal em ratos sépticos.....	77
Figura 21. Efeito do tratamento com SIN no perfil lipídico em ratos sépticos ..	79
Figura 22. Curvas de DSC (A) substâncias puras e mistura física entre SIN e Q10, (B) NH liofilizadas	82

Figura 23. Espectros de FTIR (A) substâncias puras e mistura física entre SIN e Q10, (B) NH liofilizadas	84
Figura 24. Curvas de DSC: (A) Manitol-MA e trealose-TRE (B) NH com manitol no t_0 (C) NH com manitol no t_{30} ; (D) NH com trealose no t_0 (E) NH com trealose no t_{30}	88
Figura 25. Espectros de FTIR: (A) Manitol-MA e trealose-TRE (B) NH com manitol no t_0 (C) NH com manitol no t_{30} ; (D) NH com trealose no t_0 (E) NH com trealose no t_{30}	89
Figura A1. (A) Curva de calibração da SIN (B) curva de calibração da Q10..	105
Figura A2. Cromatogramas (A) NH branca, (B) diluente e (C) NH SQ.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições avaliadas durante o experimento de estabilidade.....	51
Tabela 2. Dados de eficiência, tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das três formulações testadas.	61
Tabela 3. Valores de eficiência, tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das NH BRANCA, NH S, NH Q e NH SQ de 1mg.mL ⁻¹	63
Tabela 4. Valores de Rh, D, e PDI das NH BRANCA, NH S, NH Q e NH SQ..	66
Tabela 5. Estudos de estabilidade das NH BRANCA, NH S, NH Q, NH QS....	70
Tabela A 1. Condições cromatográficas do método analítico.....	102
Tabela A 2. Análise de precisão do método cromatográfico para a SIN.	110
Tabela A 3. Análise de precisão do método cromatográfico para a Q10.	110
Tabela A 4. Análise de exatidão do método cromatográfico para a SIN.	111
Tabela A 5. Análise de exatidão do método cromatográfico para a Q10.	111
Tabela A 6. Análise de robustez do método cromatográfico para a SIN e Q10.	112

LISTA DE ACRÔNIMOS SIGLAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA – Acetil Coenzima A

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Trifosfato de adenosina

AUC - Área sob a curva, do inglês, *area under the curve*

BCS - Sistema de Classificação Biofarmacêutico, do inglês, *Biopharmaceutics Classification System*

C - Concentração de fármaco

CCS - Centro de Ciências da Saúde da UFSC

CentralCrom - Central de cromatografia multiusuária do Centro de Ciências da Saúde da UFSC

CEUA- Comitê de ética no Uso de Animais

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

D - Coeficiente de difusão

DLS - Espalhamento de luz dinâmico, do inglês, *dynamic light scattering*

DLVO - Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek

DRX - Difração de raios X de pó

DSC - Calorimetria exploratória diferencial, do inglês, *differential scanning calorimetry*

EE % - Eficiência de encapsulação

FaSSGF - Fluido gástrico simulado em jejum, do inglês, *fasted state simulated gastric fluid*

FaSSIF - Fluido intestinal simulado em jejum, do inglês, *fasted state simulated intestinal fluid*

FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, do inglês, *Fourier transform infrared*

HDL - Lipoproteínas de alta densidade, do inglês, *high density lipoproteins*

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilgluratil Coenzima A

i.m – Intramuscular

i.p - Intraperitonal

IS - Índice de supersaturação

J – Fluxo

K_b – Constante de Boltzmann

LabCaRe - Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal

LabCQ - Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da UFSC

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC

LD - Limite de detecção

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês, *low density lipoproteins*

Log P - Coeficiente de Partição ou Lipossolubilidade

LQ - Limite de quantificação

m/v - Massa/volume

MA - Manitol

NH - Nanopartícula híbrida

NH Q - Nanopartícula de coenzima Q10

NH S – Nanopartícula de sinvastatina

NH SQ - Nanopartícula de sinvastatina e coenzima Q10

P – Permeabilidade

PA – Pressão arterial

PDI – Índice de polidispersão

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – Potencial de ionização ácida

POLISSOL - Laboratório de Polímeros e Surfactantes da UFSC

PZ - Potencial Zeta

Q10 - Coenzima Q10

q² – Vetor de onda

R² - Coeficiente de determinação

Rh - Raio hidrodinâmico

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês, *Reactive Oxygen Species*

rpm – Rotações por minuto

SDDS - Sistemas supersaturados de Liberação de Fármacos, do inglês, *Supersaturating Drug Delivery Systems*

SIN – Sinvastatina

SS – Suspensão de sinvastatina

T - Temperatura

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês, *transmission electron microscopy*

TGI – Trato gastrointestinal

TRE – Trealose

TRI – Triglicerídeos

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV-VIS – Ultravioleta-visível, do inglês, *ultraviolet-visible*.

v.o – Via oral

Γ - Frequência de relaxação

ΔG – Variação da energia livre de Gibbs

η - Viscosidade

θ - Ângulo de espalhamento

λ - Comprimento de onda

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Solubilidade, Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) e suas implicações farmacêuticas	23
3.2 Sistemas supersaturados de liberação de fármacos.....	26
3.3.1 NH de lecitina e quitosana	32
3.4 Sinvastatina	34
3.5 Coenzima Q10	38
3.6 Uso concomitante de Sinvastatina e Coenzima Q10	42
3.7 Uso de sinvastatina no tratamento de sepse	43
3.8 Importância da secagem de NH.....	44
4. METODOLOGIA	47
4.1 Materiais	47
4.2 Métodos	47
4.2.2 Caracterização das NH.....	48
4.2.2.1 Eficiência de encapsulação	48
4.2.2.2 Tamanho de partícula e índice de polidispersão	49
4.2.2.3 Potencial Zeta.....	50
4.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	51
4.2.3 Estudos de Estabilidade	51
4.2.4 Estudos de supersaturação	52
4.2.5 Estudos <i>in-vivo</i>	52
4.2.5.1 Animais.....	52
4.2.5.2 Preparação da suspensão de conteúdo cecal.....	53
4.2.5.3 Indução de sepse por aplicação de suspensão de conteúdo cecal (CS, do inglês cecal slurry).....	54
4.2.5.4 Avaliações hemodinâmicas	55
4.2.5.5 Coleta de sangue e eutanásia	56
4.2.5.6 Avaliações do perfil lipídico	56
4.2.5.7 Delineamento experimental	57

4.2.6 Estudos de secagem das NH por liofilização	59
4.2.6.1 Caracterização das NH liofilizadas	59
4.2.6.1.1 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	59
4.2.6.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	60
4.2.6.1.3 Difração de Raios-x de Pó (DRX).....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 Desenvolvimento das NH.....	61
5.2 Caracterização das NH desenvolvidas	63
5.2.1 Eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta	63
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	66
5.3 Estudos de estabilidade	67
5.4 Estudos de supersaturação	71
5.5 Estudos <i>in vivo</i>	73
5.5.1 Avaliações hemodinâmicas	73
5.5.2 Avaliações do perfil lipídico.....	78
5.6 Estudos de secagem por liofilização e caracterizações do estado sólido.....	80
5.6.1 Estudos de estabilidade das NH na presença de crioprotetores.	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE.....	102
APÊNDICE A – Desenvolvimento e validação analítica para quantificação de SIN e Q10	102

1. INTRODUÇÃO

As estatinas são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da hipercolesterolemia e fazem parte do grupo de medicamentos que são agentes redutores de colesterol, pois inibem a enzima chave na síntese dessa substância a HMG-CoA redutase (HARISA; ALOMRANI; BADRAN, 2017). Além disso, as estatinas possuem uma ampla gama de efeitos pleiotrópicos (i.e. anti-inflamatórios e antimicrobianos), demonstrando benefício clínico em doenças cardiovasculares, cerebrovascular, inclusive na sepse (OESTERLE; LAUFS; LIAO, 2017). A sepse, uma condição grave desencadeada por uma resposta imunológica descontrolada à infecção, é uma das principais causas de morte em ambiente hospitalar. Entre 2010 e 2019, o Brasil registrou 463 mil óbitos decorrentes dessa enfermidade (ALMEIDA et al., 2022). Embora não haja tratamentos específicos, um estudo recente em humanos mostrou que o uso prévio de estatinas está associado a uma redução significativa no risco de mortalidade. Estudos experimentais em animais também sugerem que as estatinas podem melhorar a sobrevivência em modelos de sepse, possivelmente através de efeitos anti-inflamatórios (BRAGA FILHO et al., 2018; LIANG et al., 2022).

Apesar do potencial clínico das estatinas, o uso crônico desse medicamento também pode resultar em efeitos colaterais no músculo esquelético, sendo essa a principal limitação da sua utilização a longo prazo (STROES et al., 2015). As miopatias relacionadas às estatinas são decorrentes do próprio mecanismo de inibição da via do mevalonato, que induz a diminuição dos níveis da Q10, que é um importante antioxidante mitocondrial. Portanto, para minimizar esses efeitos colaterais, estudos sugerem a associação da Q10 à terapia com estatinas (FARRAG et al., 2018; QU et al., 2018).

Entretanto, essas duas substâncias possuem baixa hidrofiliabilidade, dificultando a identificação de benefícios nessa associação. Ambas são absorvidas pelo trato gastrointestinal quando ingeridas via oral, mas apresentam baixa biodisponibilidade sistêmica. A concentração plasmática da sinvastatina (SIN) após administração oral é inferior a 5% (PADHYE; NAGARSENKER, 2013; TODD; GOA, 1990). Devido às limitações biofarmacêuticas de moléculas com

baixa solubilidade nos últimos anos, diversos sistemas de administração de fármacos surgiram com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção e aumentar a estabilidade. A solubilidade aquosa de um fármaco é o requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica para a maioria dos medicamentos administrados por via oral, sendo que fármacos pouco solúveis são lentamente absorvidos quando comparados aos que possui alta solubilidade em água (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). Dessa forma, uma estratégia bastante utilizada para melhorar esses aspectos é a incorporação de fármacos em nanopartículas híbridas (NH).

As NH são especialmente consideradas por serem compostas por lipídios e polímeros, apresentarem método de preparo relativamente simples, elevada capacidade de encapsulação e ainda podem modular a liberação dos fármacos (MALAQUIAS et al., 2022).

A formulação de SIN em NH facilita sua difusão através da membrana celular, o que melhora o acesso ao receptor intracelular (KORANI et al., 2019). Essa abordagem pode levar à redução da dose necessária do fármaco para alcançar o efeito terapêutico desejado, potencialmente minimizando os efeitos colaterais associados à sinvastatina, especialmente quando associada à Q10. No entanto, ainda não foram realizados estudos para avaliar o impacto do uso de sistemas de liberação de estatinas na sepse experimental.

Considerando o contexto apresentado, o uso dessa nova estratégia pode ser um sistema de liberação promissor para aumentar a biodisponibilidade oral das estatinas associada a Q10 (FATTAHI et al., 2016; HARISA; ALOMRANI; BADRAN, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar NH como estratégia tecnológica visando o aumento da biodisponibilidade oral da SIN associada a Q10.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Encapsular a SIN e a Q10 em NH;
- ✓ Avaliar a eficiência de encapsulação da SIN e da Q10 nas NH quantificadas por metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) previamente validada;
- ✓ Determinar o tamanho de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersão (PDI) através da dispersão de luz dinâmica (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS e Goniômetro multicolorrelator;
- ✓ Avaliar a morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- ✓ Avaliar a estabilidade física e química das NH por um período de 28 dias em diferentes condições de temperatura;
- ✓ Realizar estudos de supersaturação das NH de SIN (NH S), NH de SIN e Q10 (NH SQ) e suspensão de SIN (SS) em meios biorrelevantes simulando o fluido gástrico em jejum (FaSSGF) e fluido intestinal em jejum (FaSSIF);
- ✓ Realizar estudos *in-vivo* utilizando as NH e investigar possíveis alterações na hemodinâmica e o no perfil lipídico de ratos *Wistar* submetidos a um modelo de indução de sepse;
- ✓ Comparar a ação da formulação nanoencapsulada contendo SIN com o fármaco isolado na modelo experimental de sepse;
- ✓ Avaliar a implicação da adição da Q10 na formulação de SIN na sepse experimental;
- ✓ Realizar secagem das NH por liofilização e caracterizar as mesmas por técnicas de calorimetria diferencial exploratória (DSC), difração de raios-

X do pó (DRX) e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

- ✓ Avaliar o uso de agentes crioprotetores durante a liofilização e caracterizar as amostras através das análises de estado sólido (DSC e FTIR).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Solubilidade, Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) e suas implicações farmacêuticas

Dentre as propriedades físico-químicas de um fármaco, a solubilidade está diretamente ligada a eficácia e a biodisponibilidade. A compreensão deste parâmetro, é essencial no desenvolvimento e otimização de formulações farmacêuticas, uma vez que o mesmo afeta a velocidade e a extensão da absorção do fármaco no trato gastrointestinal. A solubilidade aquosa limitada é o principal obstáculo no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas (BARRETT et al., 2022; LIU et al., 2023; MIAO et al., 2022).

Sendo assim, durante o planejamento e desenvolvimento de uma nova formulação onde almeja-se a mínima toxicidade e uma boa biodisponibilidade, a solubilidade aquosa é uma propriedade termodinâmica que deve ser avaliada, independente da forma farmacêutica utilizada, sendo que para que ocorra absorção, o fármaco precisa encontrar-se solubilizado (LIU et al., 2023).

O processo de solubilização requer fornecimento de energia para que as ligações intermoleculares do sólido sejam rompidas e o mesmo possa passar para um estado solúvel, bem como a geração de energia em virtude das interações fármaco-solvente formadas (solvatação) (ÁNGELES PEÑA et al., 2022; BHOLA et al., 2022). Neste processo, a variação da energia de Gibbs (ΔG_s) que é uma função termodinâmica pode ser definida como a diferença entre os valores inicial e final de G no processo, como mostrado na equação 1:

$$\Delta G_s = G_{\text{solução}} - G_{\text{componentes isolados}} \quad (1)$$

Além disso a ΔG_s relaciona matematicamente os efeitos termodinâmicos de entalpia e entropia, e determina a possibilidade e extensão de dois compostos se misturarem para formar uma solução, sendo que esta mistura ocorre sempre quando o ΔG_s for negativa (ÁNGELES PEÑA et al., 2022; BHOLA et al., 2022; QIU, 2009).

Efeitos referentes ao soluto são extremamente relevantes no processo de solubilização de fármacos, por exemplo, a força das interações soluto-soluto, e também a afinidade das moléculas por solventes polares são fatores determinantes quando se trata de solubilidade. De um modo geral, a solubilidade aquosa tende a ser baixa para fármacos que possuem grandes forças atrativas entre suas moléculas e baixa afinidade pela água. Portanto, o valor de ΔG_s é altamente dependente das propriedades e do estado sólido inicial do fármaco. (ÁNGELES PEÑA et al., 2022; QIU, 2009).

Nos anos 1990, a área farmacêutica testemunhou um novo paradigma com o advento das Ciências da Computação, resultando na seleção de candidatos a novos fármacos por meio da modulação de alvos terapêuticos. Essa abordagem trouxe consigo a capacidade de desenvolver fármacos mais potentes e específicos, embora muitas vezes com baixa solubilidade, sendo classificados como classes BCS II ou IV. Esses desafios impulsionaram a busca por alternativas para contornar a baixa solubilidade dos fármacos, explorando abordagens químicas, físicas ou de formulação, tais como: modificação da estrutura molecular, formação de sais, métodos de moagem, dispersões sólidas amorfas, uso de co-solventes entre outros (JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018).

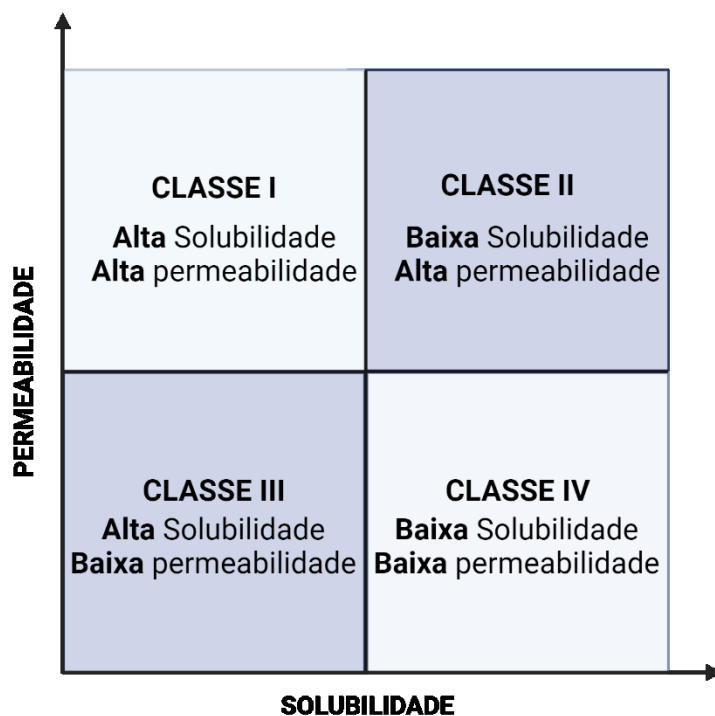
Estima-se que quase 40 % dos medicamentos aprovados e 90 % das moléculas em desenvolvimento são pouco solúveis, sendo que dependendo da categoria do fármaco essa porcentagem pode variar. Assim, estratégias tecnológicas poderiam auxiliar a superar esta limitação, e fazer destas novas moléculas candidatas mais promissoras e eficazes para o uso terapêutico. Porém, o desenvolvimento de novas formulações e a otimização das existentes é um grande desafio para os pesquisadores quando se trata de solubilidade aquosa. Um dos principais obstáculos do desenvolvimento ou otimização de uma formulação com fármaco de baixa solubilidade oral é manter a solubilidade do fármaco no trato gastrointestinal e, em particular, maximizar essa solubilidade no principal local de absorção (DA SILVA et al., 2020; JERMAIN; BROUGH; WILLIAMS, 2018; O'DRISCOLL; GRIFFIN, 2008)

Entre as características físico-químicas que impactam altamente a absorção de fármacos administrados por via oral citam-se a solubilidade no trato

gastrointestinal e sua permeabilidade através das membranas celulares. Em 1995 Amidon e colaboradores, sabendo da importância destes parâmetros, propuseram um sistema de classificação biofarmacêutico (SCB, do inglês Biopharmaceutic Classification System) que correlaciona a dissolução *in vitro* com a biodisponibilidade *in vivo* dos fármacos. Esse sistema classifica os fármacos em quatro categorias distintas, conforme demonstrado na figura 1 (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021; AMIDON et al., 1995; LIU et al., 2023).

Por considerar os dois fatores que mais impactam na absorção oral de fármacos, a solubilidade e a permeabilidade, esse sistema tem se mostrado um ponto de partida extremamente útil e amplamente aceito no desenvolvimento de novas formulações. O SCB constitui uma ferramenta importante para auxiliar no prognóstico do comportamento *in vivo* de um medicamento, contribuindo na tomada de decisões, do ponto de vista farmacêutico, indicando possíveis obstáculos na etapa de formulação.

Figura 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutico



Fonte: Adaptado de (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021; AMIDON et al., 1995).
Criado a partir do BioRender, (2024).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) classifica fármacos classe I ou III, como aqueles que apresentam elevada solubilidade, podendo ser formulado com estratégias mais simples. Já os fármacos Classe II ou IV, de baixa solubilidade e permeabilidade variada, necessitam de alternativas inovadoras para melhorar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (AMIDON et al., 1995; LIU et al., 2023).

Diversas técnicas têm sido estudadas com o intuito de aumentar a solubilidade aquosa dos fármacos pouco solúveis, como por exemplo, produção de dispersões sólidas (WON et al., 2023; XI et al., 2023), a complexação com β -ciclodextrina (DING et al., 2023; GARIBYAN et al., 2023), além da obtenção de sistemas autoemulsificantes (KADIAN; NANDA, 2023), nanoemulsões (AL-HUSSANIY et al., 2023) e NH (CLEMENTINO; SONVICO, 2018; KAMBAR; LEAL, 2023; REN et al., 2023). Estas técnicas são selecionadas levando em consideração as propriedades dos fármacos tais como pH, log P, pKa, massa molar e estabilidade química, além dos excipientes e formas farmacêuticas almeçadas.

3.2 Sistemas supersaturados de liberação de fármacos

Os Sistemas Supersaturados de Liberação de Fármacos (do inglês *Supersaturating Drug Delivery Systems*, SDDS) são formulações que podem gerar concentrações intraluminais de fármacos acima de sua solubilidade de saturação. Essas formulações contêm o fármaco em um estado de dissolução rápida, promovendo uma supersaturação temporária que melhora sua absorção e aumenta a capacidade de fornecer respostas clinicamente reprodutíveis, seguras e eficazes após administração oral (BROUWERS; BREWSTER; AUGUSTIJNS, 2009; THAKORE et al., 2021).

A área de descoberta e desenvolvimento de fármacos tem aumentado constantemente a cada ano. No entanto, apesar desses avanços, enfrenta-se desafios significativos relacionados à baixa solubilidade e biodisponibilidade de muitos compostos em desenvolvimento (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021; LIU et al., 2023).

Nos últimos anos, SDDS tem ganhado considerável atenção na busca por melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Nestes sistemas o fármaco se dissolve rapidamente no local da administração, resultando em uma concentração muito acima de sua solubilidade saturada, formando assim uma solução supersaturada. Essa solução supersaturada de fármaco é termodinamicamente instável, o que promove uma supersaturação temporária capaz de melhorar sua absorção e aumentar a capacidade de fornecer respostas clinicamente reprodutíveis, seguras e eficazes após a administração oral. No entanto, se essa solução supersaturada de fármaco puder manter um estado metaestável no trato gastrointestinal por um período de tempo suficiente, é provável que resulte em uma absorção ainda maior (YANG et al., 2016; ZAKKULA et al., 2020).

A primeira Lei de Fick (equação 2) regula a difusão passiva de fármacos, onde o movimento das moléculas depende do gradiente de concentração nos dois lados das membranas gastrointestinais. Essa lei estabelece que o fluxo (J) de um fármaco através da parede gastrointestinal é determinado pelo coeficiente de permeabilidade (P) da barreira gastrointestinal para o fármaco e pela concentração (C) do fármaco no mesmo ambiente (GROSU et al., 2018).

$$J = P.C \quad (2)$$

Portanto, para fármacos de baixa solubilidade, a concentração intraluminal máxima é determinada por sua solubilidade de saturação, podendo limitar sua absorção. No entanto, se uma solução supersaturada do fármaco persistir no ambiente gastrointestinal por tempo suficiente para permitir a absorção, o aumento da concentração intraluminal resultará em um maior fluxo do fármaco através da parede intestinal, uma vez que esses dois fatores são diretamente proporcionais (TAYLOR; ZHANG, 2016).

O grau de supersaturação alcançado por estes sistemas pode ser expresso como índice de supersaturação (IS), que é calculado dividindo a concentração do fármaco em um determinado tempo pela sua solubilidade em equilíbrio. Valores de IS superiores a 1 indicam um estado de supersaturação (BEVERNAGE et al., 2011, 2012).

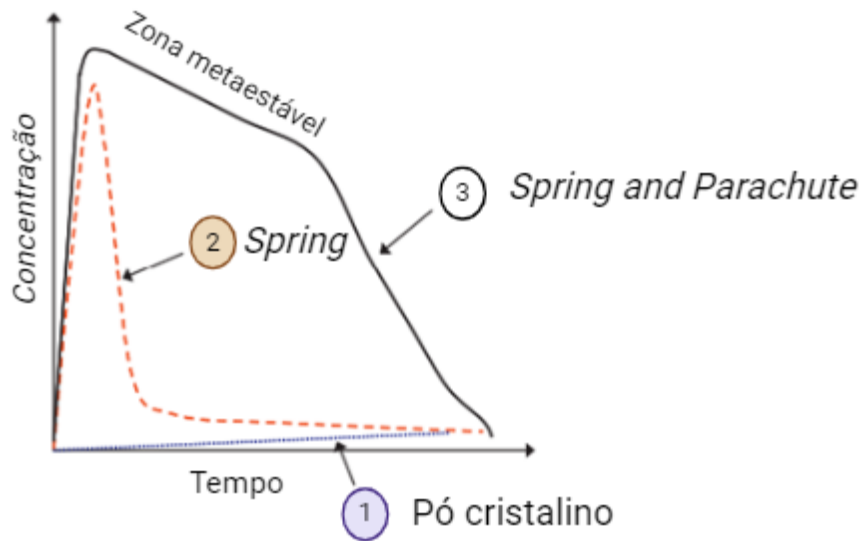
Para o desenvolvimento bem-sucedido de um SDDS, é crucial uma seleção adequada de inibidores de precipitação, dada a sua natureza termodinamicamente instável. Esses excipientes incluem diferentes moléculas, tais como: surfactantes, ciclodextrinas e polímeros (XI et al., 2023; YANG et al., 2015).

A adição de alguns polímeros como inibidores de precipitação pode favorecer a supersaturação do fármaco no meio, impedindo a cristalização ao diminuir seu potencial químico e formar interações específicas. Isso resulta em uma redução na nucleação e nas taxas de crescimento dos cristais (PARK; HA; KIM, 2020; SHARMA et al., 2022).

Quando as formulações supersaturáveis são expostas ao ambiente aquoso do sistema gastrointestinal, liberam uma concentração suficientemente alta de fármaco para supersaturar a solução. Para garantir a absorção adequada dos fármacos, é essencial criar e manter a supersaturação. A capacidade de uma formulação para formar e manter uma solução supersaturada é determinada por diversos fatores, incluindo os métodos de fabricação, as propriedades físico-químicas da substância e sua capacidade de manter a supersaturação (PARK; HA; KIM, 2020).

Portanto, para que a estratégia seja eficaz, é essencial estabilizar a solução supersaturada formada, garantindo assim uma absorção e biodisponibilidade suficientes. A estabilização pode ser alcançada pela adição de inibidores de precipitação, que atuam por meio de diversos mecanismos. O conceito "*Spring and Parachute*" ilustra como os inibidores de precipitação influenciam o estado de supersaturação de fármacos pouco solúveis. Esse conceito descreve a geração e manutenção de um estado supersaturado, como representado na figura 2 (XU; DAI, 2013).

Figura 2. O conceito *Spring and Parachute*



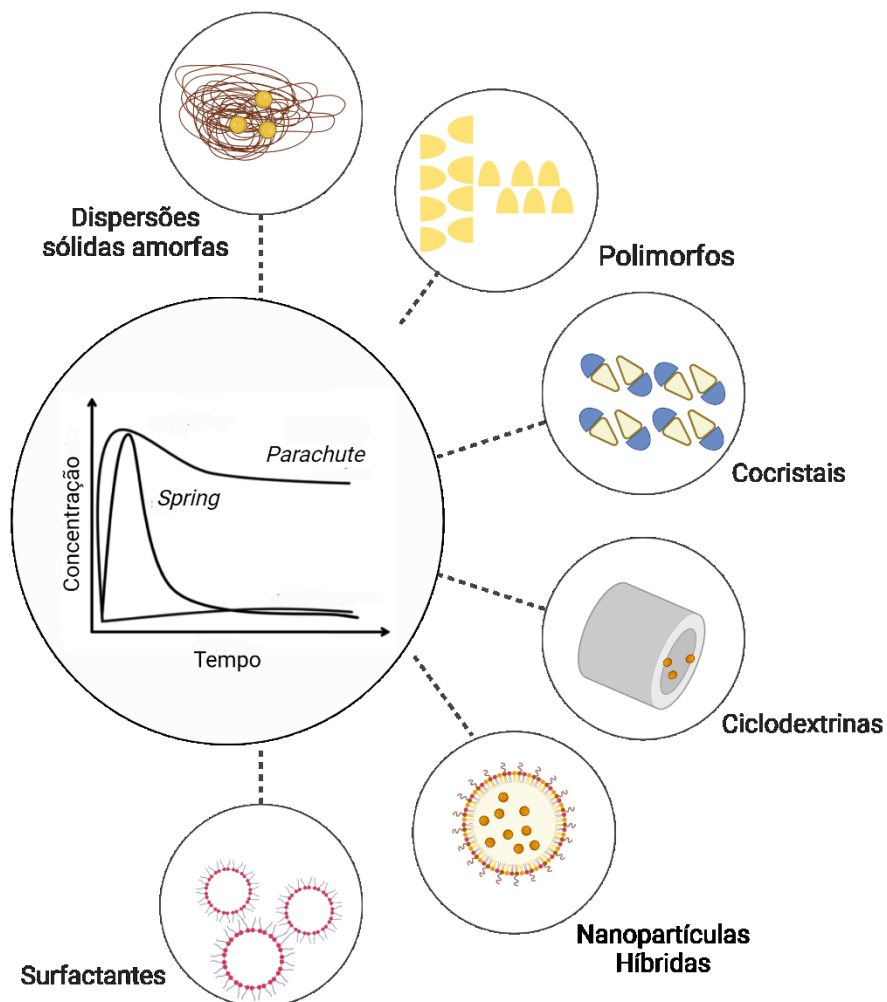
Fonte : Adaptado de (XU; DAI, 2013).

A comparação dos perfis 1 e 2 ilustrado na figura 2 revela que esta última é capaz de induzir o estado de supersaturação (*Spring*), alcançando concentrações de fármaco solúvel superiores à sua solubilidade em equilíbrio. No entanto, ao longo do tempo, ocorre recristalização e precipitação, resultando na diminuição da supersaturação do fármaco, até que retorne à sua condição de solubilidade em equilíbrio. O potencial químico de uma solução supersaturada é maior do que aquele apresentado na condição de equilíbrio, o que torna essa solução termodinamicamente instável. Ela tem a tendência de retornar ao seu estado de potencial químico mais baixo por meio da precipitação do fármaco.

No perfil 3, observa-se o comportamento do fármaco na forma de dissolução rápida com a presença dos inibidores de precipitação. Nesse caso, ocorre a formação de uma zona metaestável, que mantém o estado de supersaturação ao longo do tempo (conceito de *Spring and Parachute*). Essa zona metaestável é caracterizada pelo fármaco estar em um sistema diferente de seu estado de equilíbrio mais estável, devido à presença dos inibidores de precipitação, que impedem sua transição imediata para a forma cristalina estável (XU; DAI, 2013).

Diversas estratégias podem ser empregadas para obter essa condição e são apresentadas na figura 3.

Figura 3. Estratégias de formulações supersaturáveis



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

3.3 NH e sua utilização como estratégia para incremento da solubilidade

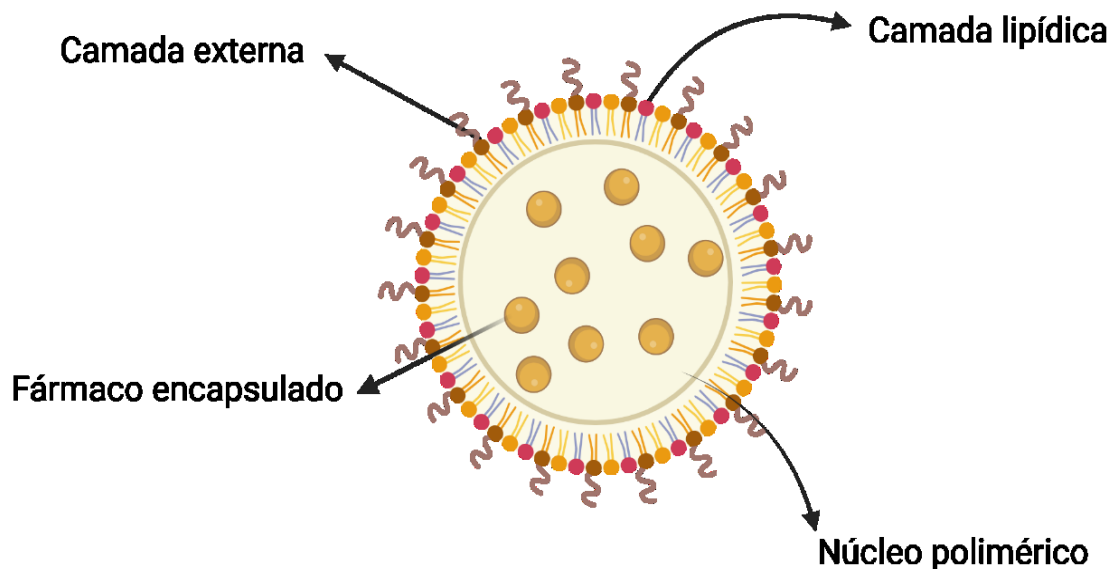
A nanotecnologia é uma ferramenta de extrema importância na área da medicina, pois pode ser utilizada como recurso para o melhoramento das propriedades dos fármacos, potencializando o tratamento de diversas doenças capaz de combater uma gama diversificada de doenças. Não é surpreendente

que estruturas em nanoescala (<1000 nm) tenham sido amplamente adotadas. O uso generalizado de nanopartículas como transportadores terapêuticos é principalmente atribuído ao seu tamanho reduzido, que possibilita a entrega direcionada ao local de ação, resultando em maior eficácia terapêutica. Polímeros (por exemplo, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, dendrímeros), lipídios (por exemplo, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas) e metais (por exemplo, ouro) têm sido comumente usados como nanocarreadores (DALI; SHENDE, 2023; LI et al., 2017; WANG et al., 2012)

As NH representam um avanço recente nos sistemas de administração de fármacos utilizados como nanocarreadores. Elas consistem em um núcleo polimérico envolto por um invólucro lipídico, proporcionando estabilidade físico-química e biocompatibilidade às nanopartículas. O lipídio aumenta a capacidade de carga e permeação, enquanto o polímero controla a liberação do fármaco. As NH combinam características positivas de lipossomas e nanopartículas poliméricas, eliminando assim suas falhas individuais, tais como baixa eficiência de encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água, degradação de compostos ativos incorporados e instabilidade na formulação (DALI; SHENDE, 2023; DAVE et al., 2019; LI et al., 2017).

As NH apresentam três componentes principais (figura 4): um núcleo polimérico onde os fármacos são encapsulados, uma camada lipídica interna que envolve o núcleo polimérico para conferir biocompatibilidade, e uma camada externa lipídio-polímero que atua como um revestimento, prolongando o tempo de circulação *in vivo* das nanopartículas, além de fornecer estabilização estérica. A camada lipídica interna também funciona como uma barreira molecular, retardando a liberação do fármaco encapsulado durante o preparo das nanopartículas. Além disso, retarda a taxa de degradação do polímero das NH, limitando a difusão da água para o interior (DALI; SHENDE, 2023).

Figura 4. Estrutura de NH lipídico-poliméricas



Fonte: Adaptado de (HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013). Criado a partir do BioRender, (2024).

Esses sistemas oferecem diversas vantagens, como tamanho de partícula controlável, funcionalidade de superfície, alta capacidade de carregamento de fármaco, estabilidade no meio gastrointestinal e maior taxa de dissolução do composto encapsulado. Essas características resultam em um aumento da absorção pelo intestino delgado e, conseqüentemente, uma maior biodisponibilidade oral (IMAM et al., 2021, 2022).

3.3.1 NH de lecitina e quitosana

Estratégias tecnológicas que se baseiam na nanotecnologia têm desempenhado um papel significativo na melhoria da administração oral de fármacos utilizados em diversas doenças e condições. Esse avanço é amplamente atribuído ao potencial dos nanocarreadores em modular suas características físico-químicas, como superfície, morfologia e tamanho. A utilização desses materiais possibilita a prevenção da desestabilização dos ingredientes ativos ao longo do trato gastrointestinal, o aumento da

permeabilidade dos medicamentos através da parede intestinal, a melhoria da solubilidade em água de fármacos hidrofóbicos e o direcionamento preciso do medicamento para o local de ação. Esses sistemas baseados em nano representam uma abordagem altamente promissora para a entrega eficiente de medicamentos por via oral, proporcionando melhorias significativas na terapia médica (AL THAHER; PERNI; PROKOPOVICH, 2017; PRASAD et al., 2018; VECCHIONE et al., 2017).

Dessa forma nanocarreadores à base de lecitina e quitosana são uma classe de sistemas de entrega de medicamentos que são desenvolvidos para melhorar a eficácia e a segurança de fármacos. A lecitina é um composto natural encontrado em tecidos vegetais e animais, geralmente extraído de fontes como a soja, o girassol e a gema de ovo. É um fosfolipídio que possui propriedades emulsificantes e é frequentemente usado em formulações farmacêuticas como um agente de encapsulamento ou estabilizador. A lecitina é conhecida por sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, tornando-a uma escolha para aplicações biomédicas. Por outro lado, a quitosana é um polissacarídeo natural derivado da quitina, um componente encontrado no exoesqueleto de crustáceos. A quitosana possui propriedades interessantes, incluindo biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de formar nanocarreadores estáveis. Devido à sua carga positiva em condições ácidas, a quitosana pode interagir com moléculas carregadas negativamente, como ácidos nucleicos e alguns fármacos, facilitando sua liberação (LANG et al., 2020; ZHAI et al., 2011).

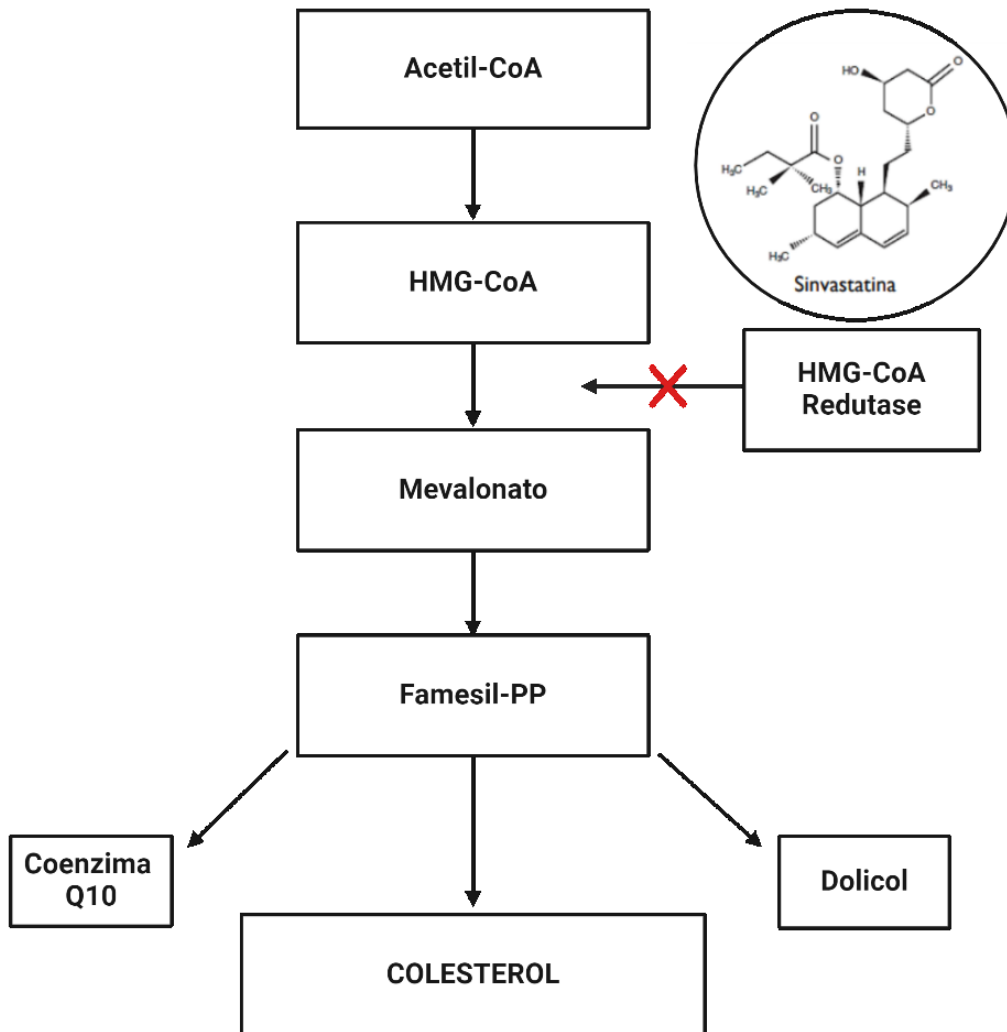
Os nanocarreadores formados pela combinação de lecitina e quitosana aproveitam as propriedades desses materiais para criar partículas pequenas e estáveis que podem encapsular fármacos ou agentes terapêuticos. Esses nanocarreadores podem ser utilizados para melhorar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade de fármacos, bem como para direcionar a liberação de medicamentos para tecidos específicos ou células-alvo. Além disso, a combinação de lecitina e quitosana pode fornecer benefícios adicionais, como a capacidade de proteger o fármaco contra a degradação enzimática, prolongar o tempo de circulação no corpo e promover a internalização celular (ZEWAIL et al., 2024).

Essa abordagem tem sido explorada em uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo tratamento de câncer, terapia genética, terapia de doenças infecciosas e entrega de agentes de diagnóstico (PRASAD et al., 2018). No entanto, é importante ressaltar que o desenvolvimento e a otimização de nanocarreadores à base de lecitina e quitosana ainda estão em curso, e há desafios a serem superados, como a escalabilidade da produção e a garantia da segurança e eficácia clínica desses sistemas de entrega.

3.4 Sinvastatina

A SIN faz parte da família das estatinas, que são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da hipercolesterolemia, ou seja, participam do grupo de medicamentos que são agentes redutores de colesterol, pois inibem a enzima chave na síntese dessa substância, figura 5. Atuam primariamente no fígado inibindo a ação da enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, essa enzima catalisa a reação de produção do mevalonato, sendo esse o primeiro passo da via biosintética de produção do colesterol (CHAUHAN et al., 2022a; IZAR et al., 2021).

Figura 5. Ação das estatinas na síntese do colesterol



Fonte: Adaptado de (SHI et al., 2022; WHITLON, 2022). Criado a partir do Biorender, (2024).

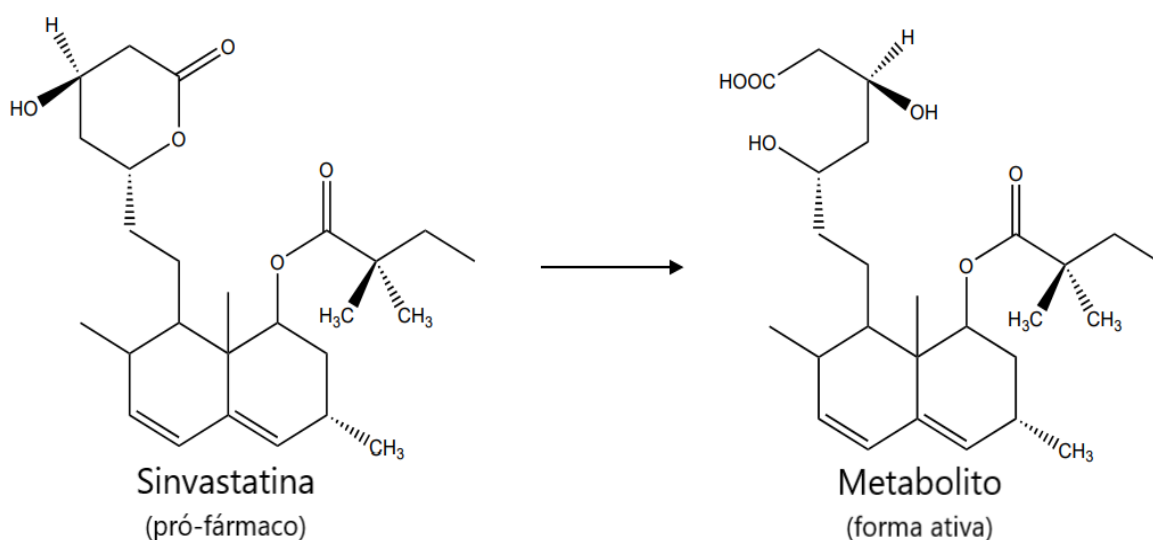
Estudos indicam que as estatinas, além de seus efeitos hipolipemiantes, também manifestam uma ampla gama de efeitos adicionais no metabolismo celular. Esses efeitos, que se somam aos seus efeitos principais, são denominados efeitos pleiotrópicos. Os mecanismos subjacentes a esses efeitos são diversos e ainda não completamente compreendidos. As estatinas demonstraram ações anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomoduladoras e antitrombóticas, além da capacidade de estabilizar placas ateroscleróticas, contribuindo para a saúde do sistema cardiovascular. Esses efeitos sugerem que as estatinas podem ter aplicações mais amplas em outras condições, como

artrite reumatóide, doenças neurodegenerativas e até mesmo sepse (CLEMENTINO et al., 2016; FERNANDES SILVA et al., 2022; OESTERLE; LAUFS; LIAO, 2017).

Caracteriza-se por ser um sólido cristalino, solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio ($0,0005 \text{ g.mL}^{-1}$ a 25°C), dimetilsulfóxido ($0,003 \text{ g.mL}^{-1}$ a 25°C), acetonitrila ($0,0005 \text{ g.mL}^{-1}$ a 25°C) e metanol ($0,001 \text{ g.mL}^{-1}$ a 25°C). Sua fórmula molecular é $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$, apresentando uma massa molar de $418,6 \text{ g/mol}$, $\text{pKa} = 14,9$ e $-2,8$ e $\log P = 6,5$ sendo considerada insolúvel em água ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 25°C . Conforme o SCB é caracterizada como II, baixa solubilidade e alta permeabilidade (HAMELIN; TURGEON, 1998; SARIISIK et al., 2019).

A SIN é administrada como pró-fármaco na forma de lactona, sendo hidrolisada enzimaticamente *in vivo* em seu correspondente β -hidroxiácido, conforme apresentado na figura 6 (SARIISIK et al., 2019).

Figura 6. Ativação *in vivo* da sinvastatina.

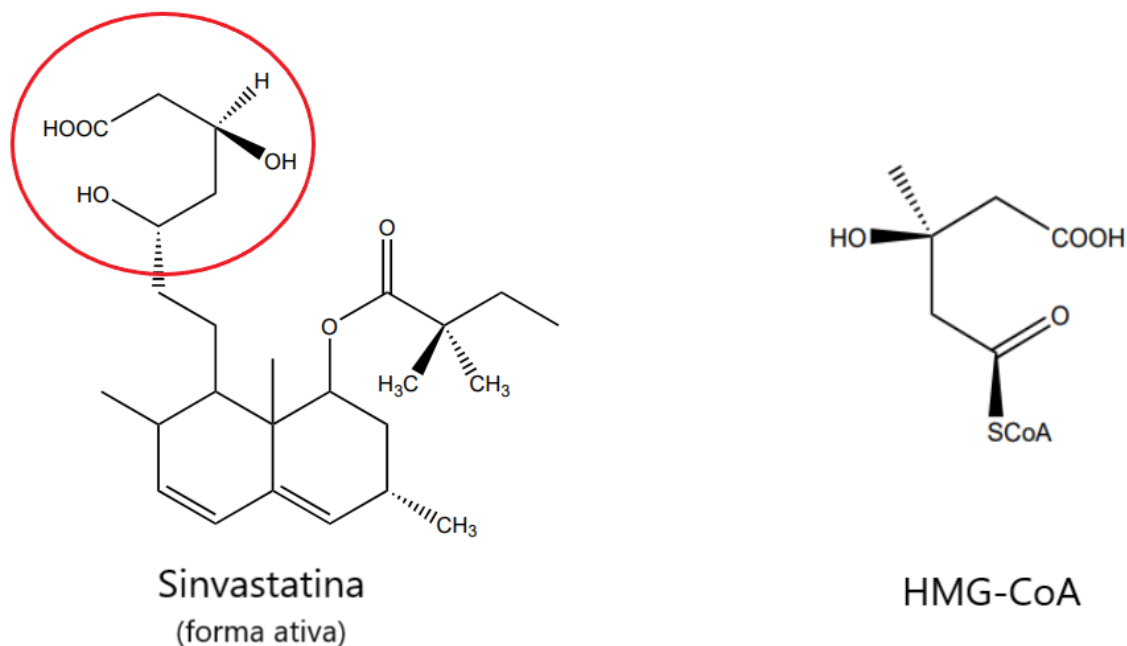


Fonte: Adaptado de (SARIISIK et al., 2019).

A estrutura química da SIN quando na forma ativa é semelhante à HMG-CoA, substrato da enzima alvo, tal como mostra a figura 7. A estrutura geral pode ser dividida em três partes: um análogo da HMG-CoA; um anel hidrofóbico, ligado covalentemente ao análogo do substrato e que está envolvido na ligação à enzima redutase; grupos laterais no anel, que definem a solubilidade da

molécula e, conseqüentemente, as suas propriedades farmacocinéticas (CLIMENT; BENAIGES; PEDRO-BOTET, 2021; SARIISIK et al., 2019).

Figura 7. Estrutura química do HMG-CoA e seu análogo na estrutura ativa da sinvastatina



Fonte: Adaptado de (CLIMENT; BENAIGES; PEDRO-BOTET, 2021).

Como a conversão da SIN ocorre pela ação das enzimas carboxiesterases presentes no fígado, intestino e plasma, esses fármacos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, porém, devido à alta biotransformação no fígado, apresenta uma baixa biodisponibilidade sistêmica. Quando administrada por via oral, a concentração plasmática da SIN é relatada como sendo inferior a 5%. Este dado destaca a baixa biodisponibilidade oral desse fármaco e sugere a possibilidade de implicações significativas na sua eficácia terapêutica. (AHMAD et al., 2023; CHUNG et al., 2023; LÖNNBERG et al., 2023). Já é bem estabelecido que a etapa crítica e limitante que influencia a taxa e a absorção de um fármaco é a dissolução deste, especialmente para um fármaco SCB classe II (MAHBOOBIAN et al., 2022).

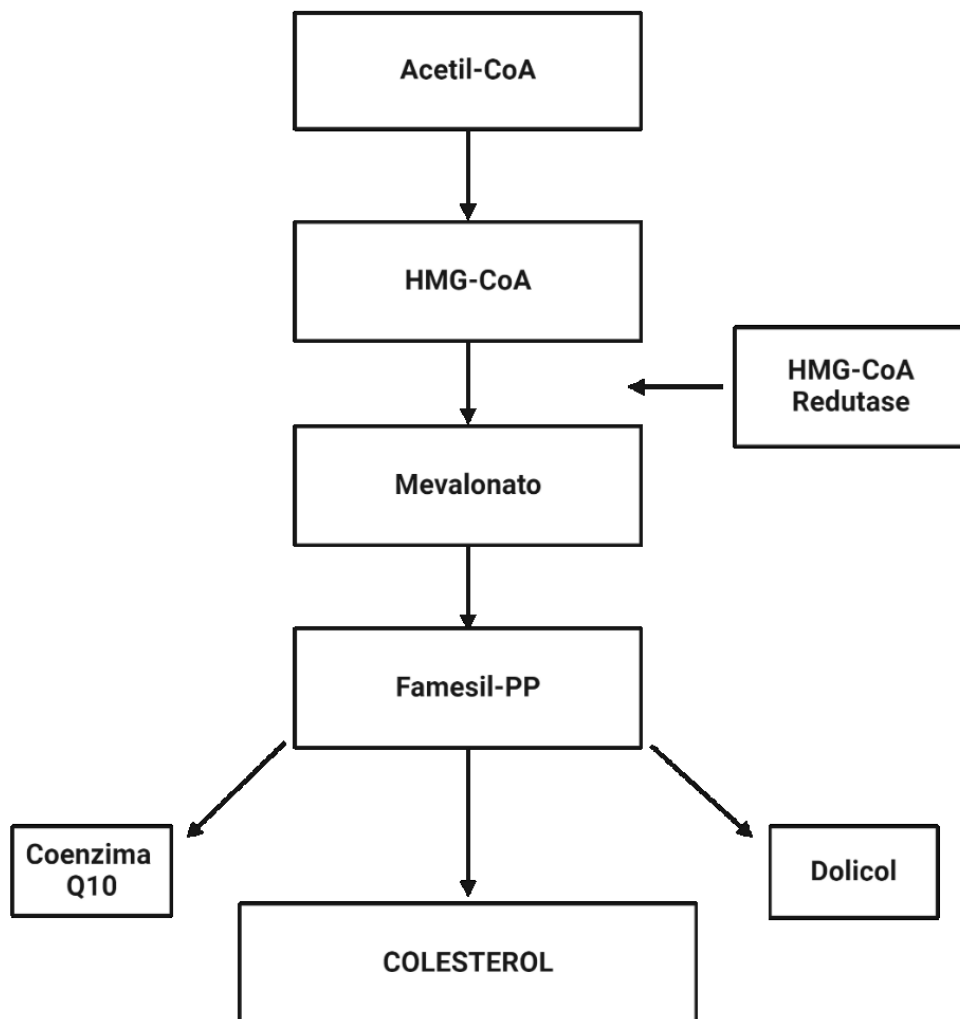
Embora as estatinas tenham um potencial clínico significativo, seu uso prolongado pode ocasionar efeitos colaterais no músculo esquelético,

representando a principal limitação da sua utilização. As miopatias associadas às estatinas surgem devido à própria inibição da via do mevalonato, levando à diminuição dos níveis de Q10, um antioxidante mitocondrial essencial (CSOMÓ et al., 2022; STROES et al., 2015).

3.5 Coenzima Q10

A Q10 também conhecida como ubiquinona ou ubidecarenona, é um importante antioxidante que desempenha função na cadeia transportadora de elétrons e na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (ALIMOHAMMADI et al., 2021). Além disso essa molécula é sintetizada endogenamente a partir de compostos intermediários da síntese do mevalonato, mesma via bioquímica que dá origem ao colesterol, figura 8. O ciclo do mevalonato é a via endógena na qual se obtém a Q10. Esta via tem como substrato inicial a acetilcoenzima-A (acetil-CoA) e prossegue com a produção do mevalonato e outros intermediários, que para além de ter o colesterol como produto final também tem o dolicol e a Q10 (HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020).

Figura 8. Ciclo do mevalonato

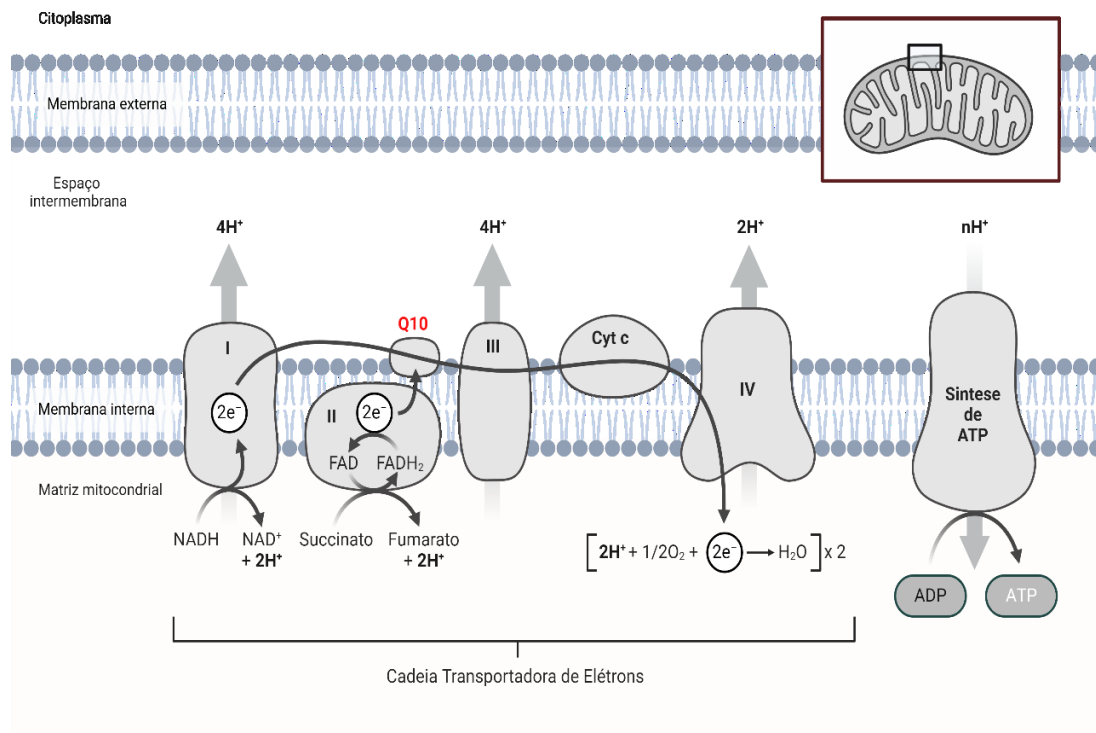


Fonte: Adaptado de (SHI et al., 2022; WHITLON, 2022).

A Q10 tem muitas funções relevantes, tanto nas mitocôndrias como em outras partes da célula. Dentro das mitocôndrias, a Q10 desempenha um papel importante na geração de ATP através da fosforilação oxidativa, servindo como transportador de elétrons dos complexos I e II para o complexo III na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, figura 9 (RAUCHOVÁ, 2021; RIZZARDI et al., 2021). Além disso a Q10 é o principal antioxidante solúvel em gordura sintetizado endogenamente que protege todos os tipos de membranas celulares contra danos oxidativos causados por radicais livres. E também media a expressão de uma variedade de genes, particularmente aqueles

envolvidos na inflamação. Portanto é um composto fisiologicamente importante com aplicações como antioxidante e no tratamento de doenças cardiovasculares e também miopatias causadas pelo uso de estatinas (DOHLMANN et al., 2022).

Figura 9. Cadeia transportadora de elétrons



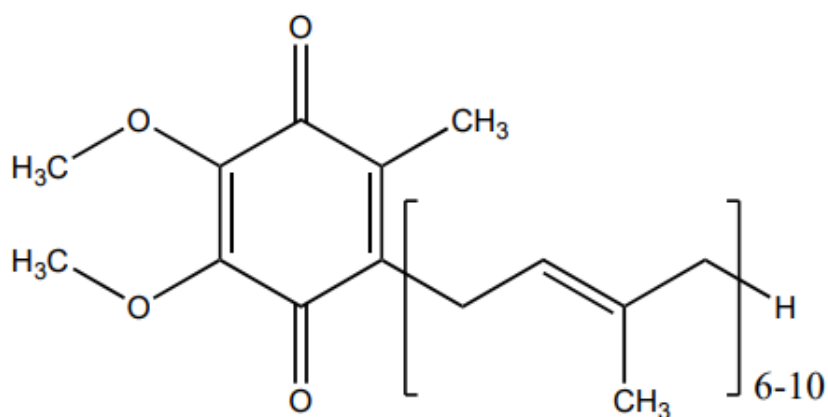
Fonte: Adaptado de (RAUCHOVÁ, 2021). Criado a partir do BioRender, (2024).

A etiologia da mialgia induzida por estatinas não é totalmente compreendida, mas diversos estudos indicam os níveis reduzidos de Q10 muscular e a função mitocondrial comprometida como principais responsáveis por essas miopatias (DOHLMANN et al., 2022). Na mitocôndria, a Q10 desempenha a função como transportador de elétrons no sistema de transferência de elétrons, como citado anteriormente, e a escassez de Q10 no músculo pode prejudicar a função respiratória mitocondrial e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A disfunção respiratória mitocondrial e a elevada produção de ROS estão previamente associadas à

ativação de nociceptores e ao desenvolvimento de dor (DOHLMANN et al., 2022; MIKASHINOVICH; BELOUSOVA; SARKISYAN, 2017).

A Q10 apresenta-se como pó cristalino de cor amarelo-laranja com ponto de fusão de cerca de 48 °C, apresenta baixa estabilidade química contra raios ultravioleta e altas temperaturas, além disso é altamente lipofílica ($\text{Log } P = 21$) e facilmente solúvel em solventes orgânicos e lipídios. Quimicamente, é designado como 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona (figura 10). Sua estrutura é formada por uma quinona ligada a uma cadeia lateral isoprenóide, sendo que a sua longa cadeia carbônica que possui várias insaturações é o que confere uma grande atividade oxidante a molécula. Ademais a presença desta longa cadeia lateral isoprenóide na molécula torna esta coenzima pouco solúvel em água, e sua elevada massa molecular (863,3 g/mol) leva a uma baixa biodisponibilidade oral, sendo um fator limitante para seu uso farmacêutico (ALIMOHAMMADI, M et al., 2021).

Figura 10. Estrutura química da Q10



Fonte: (HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020).

A Q10 pode ser obtida por duas vias: por via exógena pela ingestão de alimentos e por via endógena, pelo ciclo do mevalonato. No entanto, a dose de Q10 que se consegue obter com a ingestão de alimentos é cerca 2-5 mg/dia, mas apenas 10% é absorvida pelo trato gastrointestinal devido a sua baixa solubilidade, sendo classificada na classe II do SCB (SATO et al., 2020).

3.6 Uso concomitante de Sinvastatina e Coenzima Q10

O uso de SIN inibe a produção de Q10 durante o ciclo do mevalonato, resultando em níveis reduzidos desta substância (HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020). A terapia combinada de estatina com Q10 é indicada para tratar as miopatias no músculo esquelético causadas pelo uso crônico das estatinas. Porém, há uma escassez de estudos comparando a monoterapia com estatinas versus a terapia combinada com Q10.

Estudos têm investigado se a suplementação oral de Q10 alivia os sintomas da mialgia induzida por estatinas, mas os resultados são inconclusivos. Alguns estudos relatam nenhum efeito da suplementação de Q10 (BOGSRUD et al., 2013; TAYLOR et al., 2015; YOUNG et al., 2007), enquanto outros relatam uma diminuição dos sintomas de mialgia (SKARLOVNIK et al., 2014). Portanto, ainda não se sabe se a suplementação oral de Q10 aumenta os níveis de Q10 e se as mudanças nestes níveis afetam realmente a função mitocondrial e a intensidade da mialgia.

A Q10 é amplamente consumida para várias finalidades, no entanto, a recomendação de suplementação oral de Q10 para usuários de estatinas tem sido um tema de debate contínuo entre médicos e pesquisadores. Até o momento, ainda faltam evidências científicas sólidas para respaldar os potenciais benefícios da suplementação de Q10 para usuários de estatinas em relação à mialgia (DOHLMANN et al., 2022).

Embora não confirmada na literatura, a associação entre estatinas, depleção de Q10 muscular, disfunção mitocondrial e mialgia é biologicamente plausível. Ademais, ambas as substâncias são classificadas como classe II segundo o BCS. Atualmente, estratégias tecnológicas visando melhorar a biodisponibilidade de substâncias poucos solúveis em água têm sido utilizadas e o emprego das mesmas nas moléculas em estudo poderia potencialmente trazer resultados relevantes (CHAUHAN et al., 2022b; CHRISTENSEN et al., 2016; DOHLMANN et al., 2022).

3.7 Uso de sinvastatina no tratamento de sepse

A sepse é uma resposta extrema do corpo às infecções, sendo responsável por até 30% da mortalidade hospitalar. Ela ocorre devido a uma resposta imune desregulada do hospedeiro, resultando em disfunção de múltiplos órgãos e, em última instância, morte (SINGER et al., 2016). O manejo da sepse consiste em diagnóstico precoce, ressuscitação com fluídos, administração rápida de antibióticos, ventilação e manutenção de pressão arterial, não havendo, até o momento, terapias específicas para a sepse (GOTTS; MATTHAY, 2016).

A SIN amplamente prescrita para hiperlipidemia visando reduzir o risco de complicações ateroscleróticas, também tem sido sugerida para outros casos clínicos, já que a mesma possui uma potente capacidade anti-inflamatória e antioxidante. Estudos clínicos demonstram que a SIN pode inibir respostas inflamatórias e melhorar a sobrevida de pacientes sépticos com síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (YANG et al., 2015).

Um estudo retrospectivo em humanos descobriu que a terapia prévia com estatinas estava relacionada a um menor risco de mortalidade por sepse em pacientes hospitalizados. Os usuários de estatinas apresentaram uma redução de 20% na mortalidade em comparação com os não usuários, tanto aos 30 quanto aos 90 dias após o diagnóstico de sepse (LIANG et al., 2022). Além disso, o pré-tratamento com SIN demonstrou aumentar a sobrevivência em modelos experimentais de sepse em animais por meio da preservação da função cardiovascular e redução da resposta pró-inflamatória (YASUDA et al., 2006; MOREL et al., 2017; CATALÃO et al., 2022). Portanto, o uso crônico de estatinas parece ter ação anti-inflamatória no contexto da sepse, promovendo imunomodulação e sobrevivência (BRAGA FILHO et al, 2018).

Os estudos que avaliam o uso de SIN na sepse geralmente utilizam o fármaco na forma convencional do medicamento, apesar de sua baixa solubilidade. No entanto, a utilização de sistemas de administração de fármacos, como a incorporação em NH, pode favorecer a cinética de liberação e absorção da SIN. A nanoencapsulação permite que o fármaco se difunda mais facilmente

através da membrana celular, facilitando o acesso ao receptor intracelular. Apesar disso, na sepse experimental, ainda não foi avaliada a implicação específica da utilização de sistemas de NH na liberação de SIN.

3.8 Importância da secagem de NH

Os processos para a preparação de nanopartículas e os estudos cinéticos sobre seu comportamento na circulação sistêmica são áreas de pesquisa altamente desenvolvidas. No entanto, é igualmente importante focar na manutenção da sua estabilidade ao longo do tempo (KAMIYA; NAKASHIMA, 2017).

A liofilização é o método mais utilizado para proteger as nanopartículas da agregação. Isso ocorre porque as nanopartículas suspensas têm uma tendência natural à floculação devido à instabilidade termodinâmica das condições de suspensão. Armazenar as nanopartículas em estado sólido geralmente é mais estável do que mantê-las em estado suspenso, tornando a solidificação das nanopartículas um método ideal de preservação termodinâmica (ALI; LAMPRECHT, 2017; KAMIYA; NAKASHIMA, 2017).

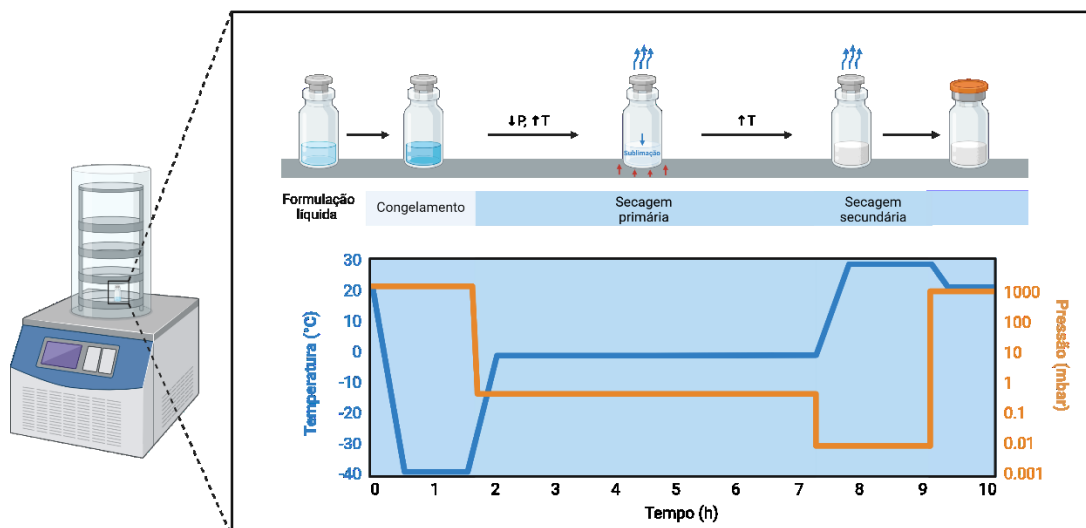
Os desafios que limitam o uso de nanopartículas em aplicações de liberação de fármacos na forma líquida podem ser divididos em problemas de instabilidade física, como a agregação ou fusão de partículas, e problemas químicos, incluindo contaminação microbiológica, hidrólise de materiais poliméricos que compõem as nanopartículas e vazamento de fármacos. Esses problemas são frequentemente observados quando uma suspensão aquosa de nanopartículas é armazenada por longos períodos. Portanto, há um grande interesse em aumentar o prazo de validade das nanopartículas (DE MENDOZA et al., 2009).

O processo de liofilização é comumente utilizado para melhorar a estabilidade físico-química de nanopartículas, removendo a água das dispersões aquosas para obter as nanopartículas na forma seca. Esse processo envolve várias etapas:

1. Congelamento: As nanopartículas suspensas em uma solução aquosa são congeladas a baixas temperaturas, geralmente abaixo do ponto de congelamento da solução. Isso forma um sólido congelado que preserva a estrutura das nanopartículas.
2. Sublimação (secagem primária): O congelamento é seguido pela sublimação, na qual o gelo presente nas nanopartículas é convertido diretamente em vapor, sem passar pelo estado líquido intermediário. Isso ocorre em uma câmara de vácuo sob pressão reduzida.
3. Desidratação (Secagem Secundária): À medida que o gelo sublima, ocorre a desidratação das nanopartículas, resultando na remoção da água da matriz. Isso leva à formação de um produto seco.
4. Condensação: O vapor de água sublimado é removido da câmara de vácuo e condensado em um condensador, onde é coletado como água líquida (ALI; LAMPRECHT, 2017; MOHAMMADY; MOHAMMADI; YOUSEFI, 2020).

O processo de liofilização descrito pode ser observado na figura 11.

Figura 11. Processo de liofilização



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

A etapa inicial de congelamento desempenha um papel crucial, pois é conhecida por gerar várias tensões que afetam significativamente a estabilidade das nanopartículas, especialmente em relação à agregação e formação de partículas macroscópicas. Além disso, o processo de liofilização pode influenciar o conteúdo de fármaco e a distribuição do tamanho das partículas. Portanto, é recomendável adicionar certos excipientes durante a liofilização para proteger as formulações contra possíveis alterações induzidas pelo processo de desidratação. Esses excipientes, como crioprotetores e/ou lioprotetores, são quimicamente inertes e ajudam a preservar as nanopartículas durante as fases de congelamento e secagem. Os crioprotetores mais comumente empregados incluem glicose, manitol, trealose, glicina e arginina. A seleção desses excipientes deve levar em consideração a natureza específica das nanopartículas e os componentes presentes na formulação (MOHAMMADY; MOHAMMADI; YOUSEFI, 2020; WANG et al., 2018, 2012).

Um estudo conduzido por Hafner e colaboradores (2011) estabeleceu um método de liofilização para NH de lecitina e quitosana carregadas com melatonina. Uma suspensão de NH carregadas de melatonina na concentração de 0,2% (m/v) pode ser liofilizada com sucesso na presença de trealose (2,5%, m/v). O produto liofilizado pôde ser armazenado em forma sólida por até 7 meses, mantendo as propriedades físico-químicas das nanopartículas, bem como o fármaco encapsulado (HAFNER et al., 2011). Estudos de secagem desempenham um papel fundamental para preservar a viabilidade das nanopartículas como sistemas eficazes de liberação de fármacos, garantindo sua estabilidade e funcionalidade ao longo do tempo (LIU et al., 2023).

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

O fármaco SIN foi adquirido da PharmaNostra (China). Já Q10, óleos lipofílicos de grau farmacêutico (Maisine CC® e LabrafacTM®), quitosana (MM= 152 KDa e GD=95%) e a lecitina de soja foram gentilmente doados pela Universidade de Parma (Itália). Os meios biorrelevantes FaSSIF e FaSSGF ® foram adquiridos da empresa Biorelevant (Surrey, RU). A água ultrapura foi obtida através de sistema MilliQ® (Millipore, Bedford, EUA).

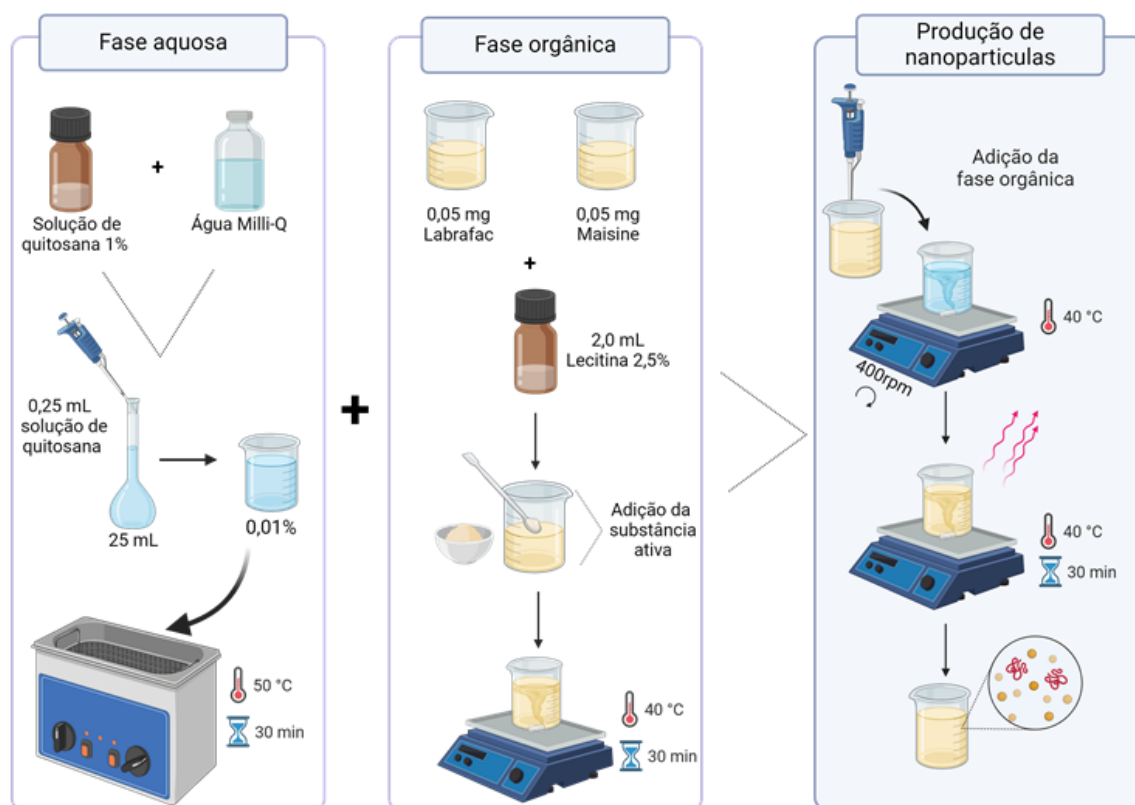
Todos os demais reagentes utilizados para os experimentos foram de grau analítico ou grau CLAE.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento de NH

As NH de lecitina/quitosana foram desenvolvidas pela técnica “*self-assembly*” através de interações eletrostática entre duas fases: A fase orgânica constituída de 200 mg de uma mistura de óleos lipofílicos de grau farmacêutico (Maisine CC® e LabrafacTM®) utilizados em combinação 1:1, dissolvidos em 2 mL da solução etanólica, 2,5% p/v de lecitina de soja e 0,025 g de fármaco. A fase aquosa é composta por uma solução de quitosana a 0,01% em 25 mL de água ultrapura que foi preparada utilizando ácido clorídrico 1%. As duas fases foram aquecidas, a fase aquosa à 50 °C e a fase orgânica à 40°C e, em seguida, a fase orgânica foi adicionada na aquosa com auxílio de uma pipeta, sendo mantidas sob agitação de 400 rpm conforme ilustrado pela figura 12. O sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos para permitir a evaporação do etanol.

Figura 12. Representação do processo de desenvolvimento das NH



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

4.2.2 Caracterização das NH

4.2.2.1 Eficiência de encapsulação

A concentração de cada substância (SIN e Q10) foi determinada por CLAE sendo que o método foi desenvolvido e validado previamente para os dois fármacos simultaneamente. A partir da concentração, a eficiência de encapsulação (%) foi determinada, sendo a diferença entre a concentração total de substância (conteúdo que foi aprisionado dentro da matriz polimérica) e a concentração de substância não encapsulada (conteúdo de composto ativo livre) (CLEMENTINO; SONVICO, 2018).

A concentração total das substâncias SIN e Q10 foi determinado na forma direta, onde ocorreu o preparo de amostra, ou seja, a amostra foi diluída e filtrada

em filtro 0,22µm e em seguida analisada por CLAE. Já a concentração das substâncias na sua forma livre foi investigada utilizando o método de separação de membrana com Ultra Amicon Filtros Centrífugos com uma membrana 30kDa Ultracel (Millipore, Irlanda). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos e os compostos não encapsulados permearam as unidades filtrantes, sendo o material filtrado analisado, através da metodologia validada, por CLAE, conforme descrito no apêndice A. A eficiência de encapsulação das nanopartículas foi expressa utilizando a equação 3.

$$EE(\%) = \frac{(Total\ encapsulado - Ativo\ livre)}{Total\ encapsulado} * 100 \quad (3)$$

4.2.2.2 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

Com a finalidade de investigar o tamanho médio e índice de polidispersão das NH utilizou-se o DLS. Estas medições foram realizadas em dois diferentes equipamentos. Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., UK) disponível no laboratório 201 do Departamento de Química que faz parte dos equipamentos multiusuários dos laboratórios, equipado com laser com comprimento de onda de 633 nm. O ângulo de dispersão foi estabelecido em 173°. As medições então foram realizadas a 25°C, adicionando 200 µL de amostra em 1,800 µL de água. A função de correlação auto-dependente do tempo foi adquirida com dez aquisições para cada execução. Cada dado é uma média de três das tais aquisições. As funções de correlação gravadas foram convertidas em distribuições de tamanho. Os dados obtidos foram analisados por meio da Dispersão Software Malvern (MALVERN, 2014).

Também foi utilizado o Goniômetro Multicorrelador (ALV - LSE 5004, Alemanha) com um laser de HeNe trabalhando no comprimento de onda de 632,8 nm, disponível no Laboratório de Polímeros e Surfactantes- POLISSOL. Onde avaliou-se o espalhamento na faixa de 30 ° - 150° com intervalo de 10° durante 30 segundos para cada ângulo. Utilizou-se cubetas de vidro cilíndricas

contendo 2 mL de amostra previamente diluída em água e filtrada em membranas como tamanho de poro de 0,45 µm (SANCHES et al., 2020).

A análise de DLS mede a dependência da intensidade do espalhamento de luz de uma amostra em movimento browniano com o tempo para gerar uma função de autocorrelação. Modelos matemáticos foram utilizados para calcular o coeficiente de difusão (D) e assim inferir sobre o tamanho das partículas a partir do decaimento da função de autocorrelação. O coeficiente de difusão é o coeficiente angular da reta, quando plotado a frequência de relaxação da função de correlação (Γ) em função do vetor de onda (q^2) do feixe de luz incidente do equipamento, de acordo com a equação 4:

$$\Gamma = q^2 D \quad (4)$$

O vetor de onda é definido de acordo com a equação 5, onde, λ é o comprimento de onda do feixe de luz incidente, θ é o ângulo de espalhamento e η o índice de refração do meio:

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (5)$$

Conhecendo o coeficiente de difusão, D, a partir da equação 4, foi possível calcular corretamente o raio hidrodinâmico das NH a partir da equação de Stokes-Einstein (equação 6), na qual k_B na equação é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra durante o ensaio e η a viscosidade do meio.

$$Rh = \frac{KbT}{6\pi\eta D} \quad (6)$$

Desta forma, D, R_h e o PDI foram determinados por meio de medidas de espalhamento de luz dinâmico em um Goniômetro Multicorrelador, e calculados com auxílio do software ALV-7004 V.3.0.

4.2.2.3 Potencial Zeta

A determinação da carga de superfície de amostras foi realizada utilizando um instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), operando com laser no comprimento de onda de 633 nm, utilizando células Zeta. A análise foi realizada em célula capilar plástica com 1mL de amostra, sendo

que as mesmas foram diluídas 10 vezes com água desmineralizada. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. Foi realizada a média das três medidas e por meio da aproximação de Helmholtz-Smoluchowski, equação 7, os valores de potencial Zeta (ζ) foram calculados. Na equação 7, μ refere-se à mobilidade eletroforética, E ao campo elétrico aplicado, η a viscosidade e ϵ a constante dielétrica do meio.

$$\zeta = \frac{4 \pi \mu \eta}{E \epsilon} \quad (7)$$

4.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de TEM foram obtidas em microscópio JEM-1011 (JEOL USA, Inc, Peabody, MA) com tensão de aceleração de 80 kV, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME. As amostras foram diluídas em água deionizada (1/2), colocadas sobre um *grade* de cobre revestido com filme polimérico (Formvar®) e contrastadas com acetato de uranila a 3 % (m/V). O *software* ImageJ foi utilizado para calcular o diâmetro das partículas.

4.2.3 Estudos de Estabilidade

As amostras foram avaliadas durante 28 dias, considerando as condições experimentais apresentadas na tabela 1 com base na RDC 318, de 2019. As NH foram analisadas nos tempos de 0, 14 e 28 dias onde foi avaliado eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e o potencial Zeta (ANVISA, 2019).

Tabela 1. Condições avaliadas durante o experimento de estabilidade

	Armazenamento	Temperatura (°C)
Condições	Frasco âmbar	5
		25
		40

4.2.4 Estudos de supersaturação

Os estudos de supersaturação foram determinados nos meios biorrelevantes FaSSIF e FaSSGF. Amostras de NH S, NH SQ e SS foram analisadas em triplicata, agitadas a 100 rpm, 37 °C, em Shaker NT 715 (NovaTécnica, disponível no LabCQ-UFSC), por 120 minutos. Foram utilizadas 3 mL de amostra para 25 mL de meio. Em tempos pré-determinados (5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos), alíquotas foram coletadas, filtradas em membrana 0,22 µm e quantificadas por metodologia de CLAE previamente descrita no apêndice A.

Valores de área sob a curva (AUC) dos perfis de supersaturação nos diferentes meios foram calculados usando o suplemento DD Solver® no *software* Microsoft Excel®.

4.2.5 Estudos *in-vivo*

4.2.5.1 Animais

Foram utilizados ratos (Wistar, machos, 90 dias, 250-300g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC nas seguintes condições: temperatura de 22 ± 2° C, ciclo claro/escuro automático de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em caixas (1500 cm²; 4-5 animais por caixa) com cama de maravalha (trocadas duas vezes por semana). Sete dias antes do início da experimentação, os animais foram transportados para o biotério de farmacologia cardiovascular, onde foram mantidos nas mesmas condições citadas. Após o transporte, todos os animais foram tratados com um anti-helmíntico de amplo espectro (Fembendazol; 20 mg/kg/dia por 5 dias; Gral Animal, Florianópolis, SC, Brasil) (VILLAR et al., 2007). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 3323200723), de acordo com as normas editadas pelo

Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A manutenção e os cuidados com os animais foram supervisionados por uma médica veterinária do Centro de Ciências Biológicas (CCB – UFSC).

4.2.5.2 Preparação da suspensão de conteúdo cecal

O protocolo foi adaptado de SHRUM e colaboradores(2014) e STARR e colaboradores (2014). O modelo a ser descrito foi padronizado em um estudo prévio do grupo de pesquisa do LabCaRe (CEUA nº 9785211221). O conteúdo cecal foi coletado diretamente do ceco de um ou mais animais doadores. O ceco de um rato doador foi suficiente para a aplicação em aproximadamente oito ratos. Pensando na redução de animais, foram utilizados ratos doadores provenientes de outros estudos experimentais deixados no biotério setorial da farmacologia para eutanásia. Para isso, o animal doador foi eutanasiado por sobredose anestésica. A indução de anestesia foi realizada com xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cetamina (90 mg/kg i.p.). Após a perda de reflexos, foi realizada a administração de 250 µL de cetamina intravenosa (aplicação via veia gengival). Para tanto, o rato foi posicionado em decúbito dorsal e o lábio inferior foi afastado, expondo a gengiva abaixo dos incisivos inferiores. Foi utilizado agulha de 0,45 mm (26 G), a qual foi inserida ao longo da linha entre o par de incisivos inferiores em um ângulo de 20 a 25 graus.

Imediatamente após a confirmação da eutanásia, o abdome do animal foi aberto e o ceco coletado em uma placa de Petri. O conteúdo cecal foi pesado e diluído em solução salina 0,9% a fim de formar uma suspensão de 200 mg/mL. A suspensão foi filtrada 3 vezes, primeiramente em uma malha de nylon de 70 mm para a remoção das partículas maiores e em seguida em filtro de mesh 60 e 100. O filtrado foi transferido para uma proveta para medição do volume e foi adicionado o mesmo volume de glicerol 10% para o congelamento das bactérias (dessa forma, a concentração final da solução fecal foi de aproximadamente 100 mg/mL e 5% de glicerol). Após homogeneização, a suspensão de conteúdo cecal foi alíquotada em eppendorfs de 5 mL e armazenadas em -80°C até o momento da aplicação. Para confirmar que a viabilidade das bactérias foi mantida após o congelamento, foi realizado o plaqueamento em ágar Mueller Hinton de 10 µL

da suspensão cecal em diluições seriadas com PBS estéril (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) à fresco e no momento da utilização. A placa foi incubada à 37°C por 24 horas e a quantidade de unidades formadoras de colônia foi contabilizada. Estudos prévios realizados pelo LabCaRe observaram que a viabilidade das bactérias é mantida por pelo menos 2 meses após congelamento com 5% de glicerol.

4.2.5.3 Indução de sepse por aplicação de suspensão de conteúdo cecal (CS, do inglês cecal slurry)

Os animais receberam uma dose do analgésico opioide buprenorfina (Beniv®; 0,03 mg/Kg, s.c.) antes do procedimento. Em seguida, cada rato recebeu a aplicação intraperitoneal da suspensão de conteúdo cecal à 37°C no volume de 10 µL por g de peso corporal (dose: 1 g/Kg). Os ratos Sham receberam o mesmo volume de uma solução de 5% de glicerol em salina via intraperitoneal (10 µL/g). A aplicação intraperitoneal foi realizada com agulha 20 X 0,55 mm, pois a adição de glicerol faz com que a solução fique mais densa, dificultando a utilização de um calibre menor. Entretanto, para evitar a perfuração de órgãos vitais, foi inserido apenas 2/3 da agulha. A aplicação foi realizada sem a utilização de anestesia.

Foi administrado reposição volêmica com solução salina 0,9% (30 mL/Kg; s.c.; 37°C) a fim de manter a hidratação dos animais e reproduzir a fase hiperdinâmica da sepse (RITTIRSCH et al., 2009). O rato foi posicionado em decúbito ventral e feito uma prega na pele na região dorsal. Foi utilizada uma agulha de 30 x 0,70 mm para a aplicação. Logo após a reposição volêmica os animais foram devolvidos para suas caixas, onde foram observados até o fim do protocolo de experimentos. Os animais submetidos à sepse receberam reforço analgésico (buprenorfina; 0,03 mg/Kg s.c.) a cada 8 horas até o momento da eutanásia (24 h).

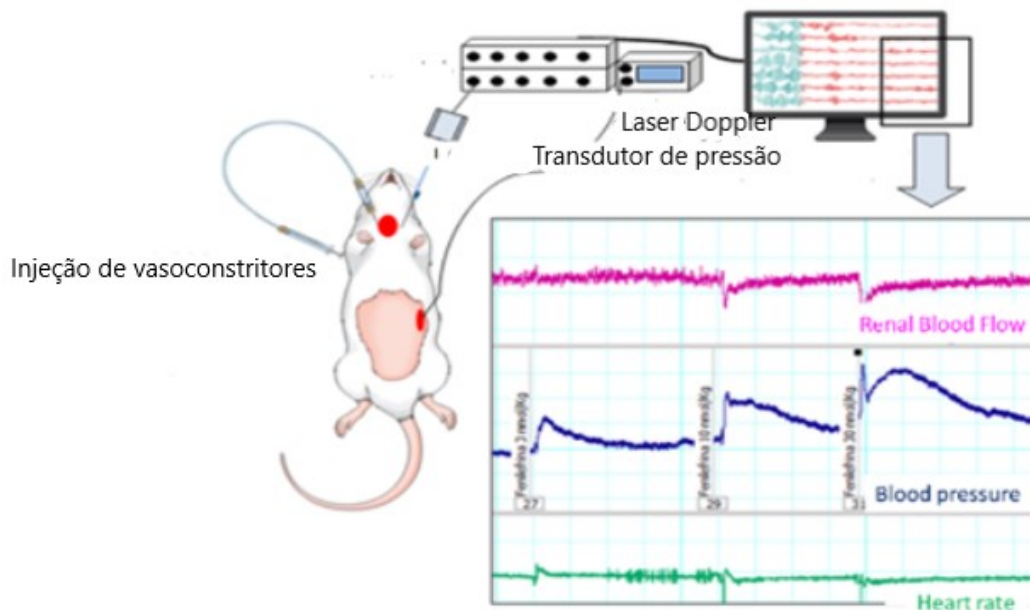
4.2.5.4 Avaliações hemodinâmicas

A avaliação hemodinâmica foi realizada 24 horas após a indução de sepse ou falsa indução (*sham*) no laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal por meio da avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal. Para isso, os animais foram submetidos a anestesia geral com xilazina (10 mg/kg, i.m.) e cetamina (90 mg/kg i.m.). Não foi utilizado analgesia preemptiva nesse experimento, pois os animais não retornaram da anestesia (procedimento terminal). Para isso, os animais receberam reforço com $\frac{1}{4}$ da dose anestésica em procedimentos que ultrapassaram 30 minutos. Além disso, os animais foram monitorados, pois qualquer sinal de despertar (movimento das vibrissas, alteração da frequência cardíaca), estes também receberam reforço.

Após anestesia, os animais foram posicionados em manta aquecida à 37°C. A técnica consistiu na inserção de uma cânula de polietileno PE-50 na artéria carótida esquerda. A cânula foi conectada a um transdutor de pressão acoplado ao sistema de aquisição de dados PowerLab® (ADInstruments), registrando os valores de pressão arterial média (mmHg), pressão arterial sistólica (mmHg), pressão arterial diastólica (mmHg) e frequência cardíaca (bpm). Além disso, foi realizada a canulação da veia jugular. Esse acesso venoso foi utilizado para a administração de uma dose de angiotensina II (30 pmol/kg).

Ao mesmo tempo, foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm abaixo da última costela acessando a cavidade intraperitoneal. Então, o rim esquerdo foi identificado e isolado com algodões e a sonda do aparelho Laser Doppler foi posicionada acima do rim. O fluxo sanguíneo renal (unidades de perfusão, UP) foi registrado no *software* LabChart junto com a pressão arterial (figura 13). Os valores basais dos parâmetros foram registrados durante um período de 10 minutos para estabilização e em seguida, foi administrada uma única dose de angiotensina II (30 pmol/kg). Após a normalização dos parâmetros, o experimento foi finalizado.

Figura 13. Representação esquemática do experimento de avaliação hemodinâmica



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

4.2.5.5 Coleta de sangue e eutanásia

Após a finalização da avaliação hemodinâmica (item 4.2.5.4), a cânula inserida na carótida foi desconectada do transdutor de pressão para a coleta de sangue. Foi coletado aproximadamente 4 mL de sangue por meio da canulação arterial. Em seguida, o animal recebeu uma sobredose de 90 mg/kg de cetamina pelo acesso venoso. Após o procedimento, a carcaça do animal foi armazenada no freezer e posteriormente levado em saco de lixo branco identificado para o freezer do descarte de resíduos da farmacologia, onde foi posteriormente recolhido e descartado por incineração.

4.2.5.6 Avaliações do perfil lipídico

Para a dosagem do perfil lipídico, foi coletado o sangue dos animais por um cateter na artéria carótida esquerda em ependorfs contendo heparina (5 UI/mL). O plasma foi separado por centrifugação (1.500 x g, 10 min, 4 °C),

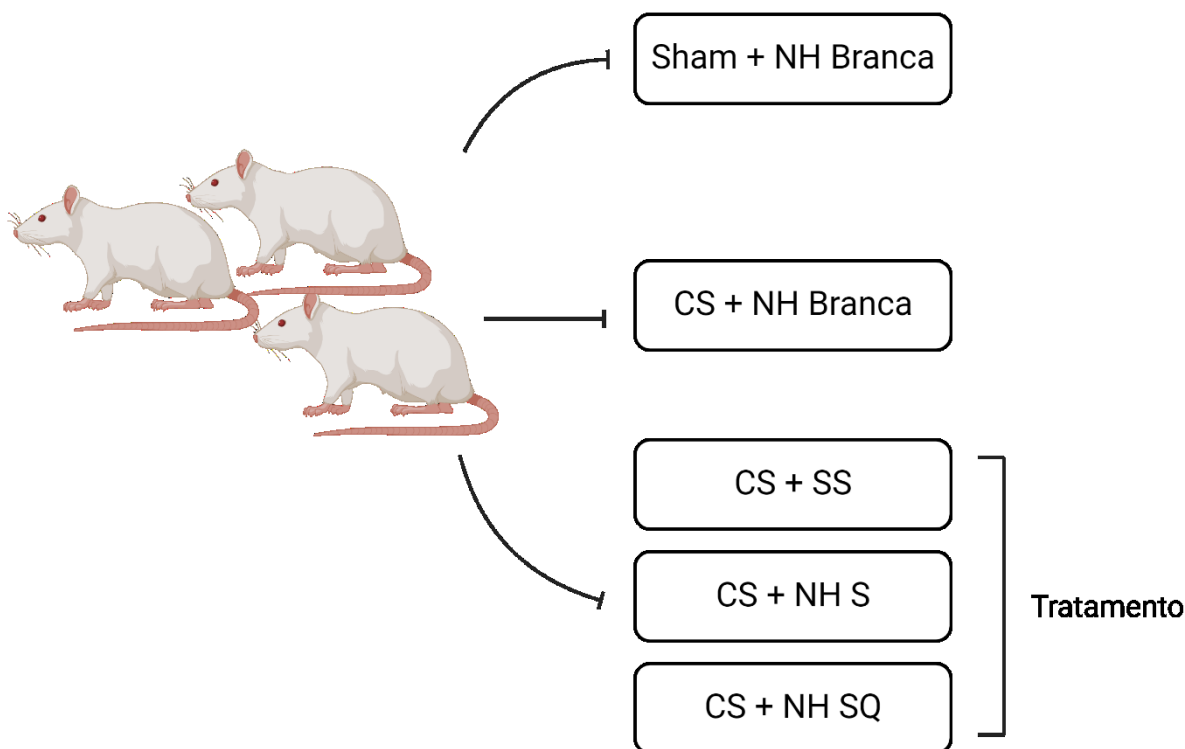
coletado e enviado ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC (projeto de pesquisa 3422/2023 GEP/HU/UFSC/EBSERH), onde as amostras passaram por dosagem em equipamento automatizado Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). Foram quantificados os níveis de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Todas as dosagens foram feitas a partir dos kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.5.7 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais conforme a intervenção (CS ou *Sham*) e o tratamento (figura 14): SS, NH S, NH SQ e NH Branca.

- (1) *Sham* + NH Branca (5 mg/kg, v.o.)
- (2) CS + NH Branca (5 mg/kg, v.o.)
- (3) CS + SS (5 mg/kg, v.o.)
- (4) CS + NH S (5 mg/kg, v.o.)
- (5) CS + NH SQ (5 mg/kg, v.o.)

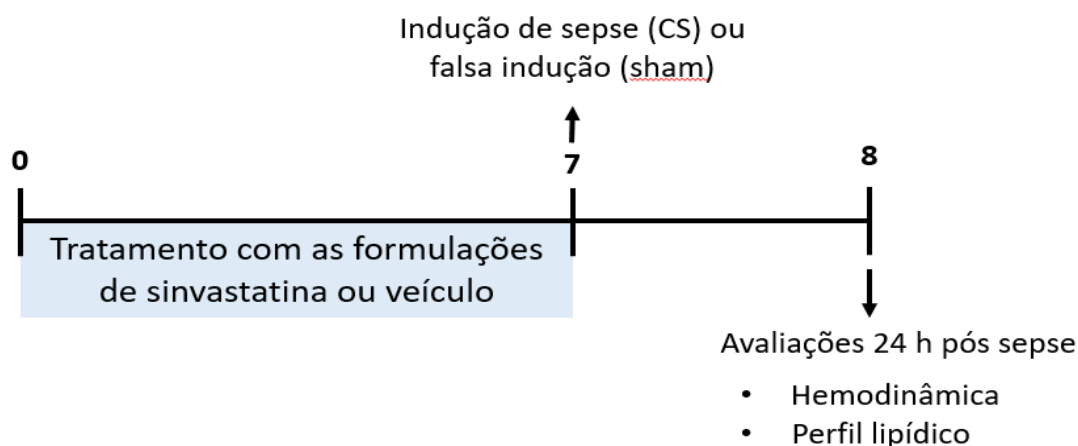
Figura 14. Grupos experimentais: intervenção e tratamento



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

A SIN pó foi suspensa em água. As nanopartículas foram produzidas conforme descrito no item 4.2.1. Todos os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, via oral (ingestão voluntária), 7 dias antes da indução de sepse ou falsa indução (*Sham*). Vinte e quatro horas após *CS/Sham*, foram realizadas as análises de fluxo sanguíneo renal basal, pressão arterial média basal, frequência cardíaca basal e coleta de amostras para dosagem do perfil lipídico. A figura 15 apresenta o delineamento experimental.

Figura 15. Delineamento experimental



Fonte: Elaborada pela autora. Criado a partir do BioRender, (2024).

4.2.6 Estudos de secagem das NH por liofilização

As NH foram liofilizadas utilizando um liofilizador E-C MicroModul (Thermo Fisher Scientific, EUA) da CentralCrom, disponível no laboratório de farmacognosia da UFSC. As amostras foram acondicionadas em tubos e congeladas com nitrogênio líquido. Em seguida, os tubos foram distribuídos em frascos, que foram conectados à câmara de vácuo principal do liofilizador por meio de válvulas. A bomba foi ligada e a secagem ocorreu a uma pressão de aproximadamente 0,2 mbar.

As amostras liofilizadas foram NH Branca, NH S, NH Q, NH SQ puras e as mesmas na presença de agentes crioprotetores, manitol e trealose 2,5% m/v conforme estudos realizados por Hafner e colaboradores (HAFNER et al., 2011).

4.2.6.1 Caracterização das NH liofilizadas

4.2.6.1.1 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas DSC foram obtidas, em calorímetro diferencial de varredura modelo Q20, marca TA Instruments, disponível na central de análises do

departamento de química da UFSC. Foi utilizado cadinho de alumínio hermeticamente fechado com aproximadamente 1,5 mg de amostra. A faixa de temperatura analisada foi entre 25 a 250 °C, sob atmosfera dinâmica de N₂ de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Os dados obtidos foram processados em software OriginPro 8.5.

4.2.6.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na faixa espectral de 600-4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ em equipamento PerkinElmer FT-IR/NIR (FrontierSpectrometer), disponível no LabCQ-UFSC. Os dados obtidos foram avaliados através do *software* OriginPro 8.5.

4.2.6.1.3 Difração de Raios-x de Pó (DRX)

As análises de difração de raios-X de pó foram realizadas em difratômetro de raios-X θ - θ D2 Phaser (Bruker) no Departamento de Química da UFSC. O equipamento operou com radiação de cobre K α ($\lambda=1.5418$ Å), corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV.

A detecção foi conduzida em detector de cintilação unidirecional LYNXEYE. As medidas foram obtidas a temperatura ambiente, através de varredura 2 θ na faixa de 5° a 40°, com intervalo angular de 0,089° a cada 0,5 s. Os dados obtidos foram analisados através do *software* OriginPro 8.5.

4.2.6.1.4 Estudos de estabilidade das NH liofilizadas

Os estudos de estabilidade das NH liofilizadas, avaliaram as características do material através das técnicas de caracterização do estado sólido; DSC, FTIR e DRX, no tempo zero e trinta dias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento das NH

O desenvolvimento inicial das NH foi realizado na Universidade de Parma (Itália), junto ao Departamento de Tecnologia de Fármacos e Alimentos sob a supervisão do Professor Dr. Fabio Sonvico. Nessa etapa, os parâmetros experimentais relativos à formulação como concentração de quitosana, lecitina e óleos foram avaliados. Ainda, questões relativas à temperatura e velocidade de agitação foram investigadas. Posteriormente na etapa realizada no Brasil foi avaliado a capacidade de incorporação das nanopartículas previamente desenvolvidas. Assim, foram avaliadas três NH diferentes concentrações de SIN e Q10, de forma isolada e em associação (0,2; 1,0; 2,0 mg.mL⁻¹) com relação ao volume final da formulação. As amostras foram avaliadas quanto a eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta como apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Dados de eficiência, tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das três formulações testadas

Parâmetros	NH S	NH Q	NH SQ
0,2 mg.mL⁻¹			
Eficiência de encapsulação (%)	68,3 ± 2,88	92,6 ± 3,05	SIN: 71,7 ± 1,59 Q10: 69,3 ± 0,47
Tamanho de partícula (nm)	227,7 ± 1,80	238,3 ± 2,34	250,4 ± 2,42
PDI	0,202 ± 0,01	0,200 ± 0,01	0,170 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	47,53 ± 0,21	43,4 ± 0,78	30,93 ± 1,33
1,0 mg.mL⁻¹			

Eficiência	81,93 ± 3,16	81,56 ± 1,43	SIN: 81,2 ± 3,65 Q10: 87,06 ± 1,82
Tamanho de partícula (nm)	214,03 ± 2,95	238,80 ± 1,70	254,63 ± 3,19
PDI	0,155 ± 0,005	0,215 ± 0,002	0,209 ± 0,005
Potencial zeta (mV)	33,23 ± 1,27	36,46 ± 0,81	31,33 ± 0,96

2,0 mg.mL⁻¹

Eficiência	56,33 ± 0,57	81,26 ± 1,50	SIN: 64,16 ± 0,29 Q10: 59,83 ± 0,28
Tamanho de partícula (nm)	594,16 ± 3,43	245,56 ± 3,78	635,86 ± 2,90
PDI	0,51 ± 0,024	0,22 ± 0,01	0,48 ± 0,001
Potencial zeta (mV)	33,53 ± 0,37	35,20 ± 0,69	26,76 ± 0,25

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Legenda: Amostras avaliadas: Nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ) em concentrações de 0,2; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹. Parâmetros avaliados: Eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta através do Zetasizer.

A escolha da NH a ser utilizada nos passos seguintes deste trabalho, foi baseada nos critérios de maior eficiência de encapsulação junto do melhor tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta. Com isso foram selecionadas as amostras NH S, NH Q e NH SQ de 1,0 mg.mL⁻¹, pois apresentaram eficiência de encapsulação de 81,93 ± 3,16; 81,56 ± 1,43 e 81,2 ± 3,65/ 87,06 ± 1,82 respectivamente e apresentaram melhor tamanho, PDI e potencial Zeta. Além disso, a concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ foi a formulação que apresentou melhor eficiência de encapsulação para SIN e Q10 concomitantemente. Esses resultados são consistentes com o objetivo, que é avaliar o efeito dessas duas substâncias quando combinadas na mesma formulação. O fato de a

concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ ter demonstrado a melhor eficiência de encapsulação sugere que essa concentração pode ser mais adequada para obter os efeitos desejados da formulação contendo SIN e Q10.

5.2 Caracterização das NH desenvolvidas

5.2.1 Eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta

As propriedades das NH são apresentadas na tabela 3. As NH apresentam tamanho de partícula de 206,2 a 254,63 nm, com baixo valor de PDI de 0,155 a 0,215 expressando distribuição estreita de tamanho. O tamanho de partícula das NH contendo as moléculas SIN e Q10 foram ligeiramente aumentados em comparação com a NH Branca (206,2 ± 2,46 nm) um fenômeno comumente observado após a incorporação de moléculas no núcleo lipídico (QURESHI et al., 2017; RIZVI et al., 2019).

O tamanho das partículas desempenha um papel crucial na absorção gastrointestinal de nanopartículas após administração oral. Nanopartículas menores que 300 nm são desejáveis para um transporte intestinal eficaz para o sistema linfático (DE MENDOZA et al., 2009; KIM et al., 2017; LIU; LENG; LIU, 2021).

Tabela 3. Valores de eficiência, tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das NH BRANCA, NH S, NH Q e NH SQ de 1mg.mL⁻¹

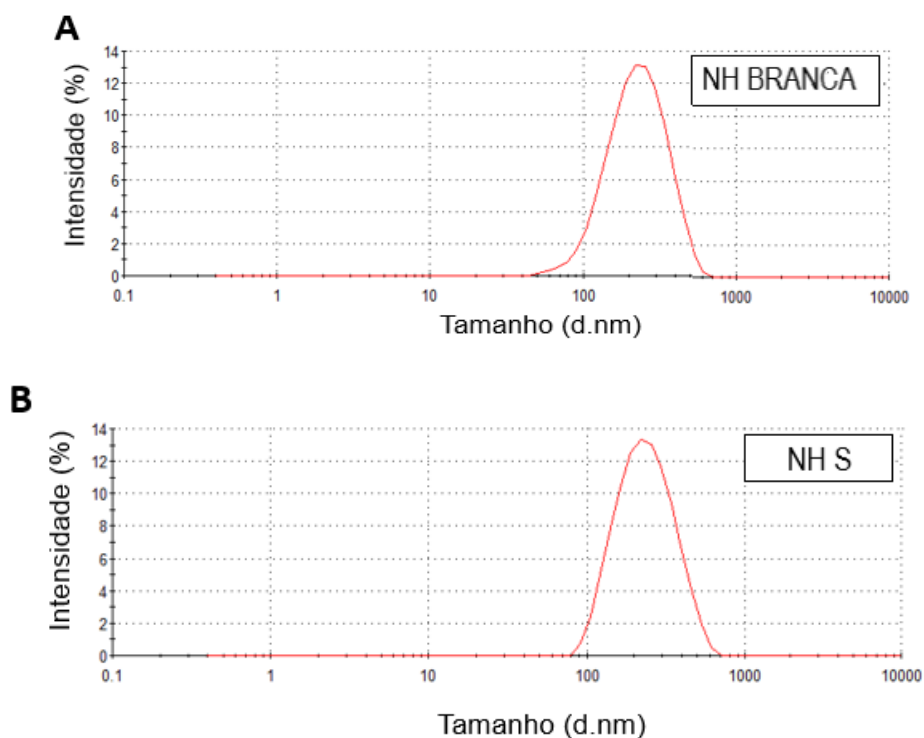
Parâmetros	NH BRANCA	NH S	NH Q	NH SQ
Eficiência (%)	-	81,93 ± 3,16	81,56 ± 1,43	81,2 ± 3,65/ 87,06 ± 1,82
Tamanho de partícula (nm)	206,2 ± 2,46	214,03 ± 2,95	238,8 ± 1,70	254,63 ± 3,19

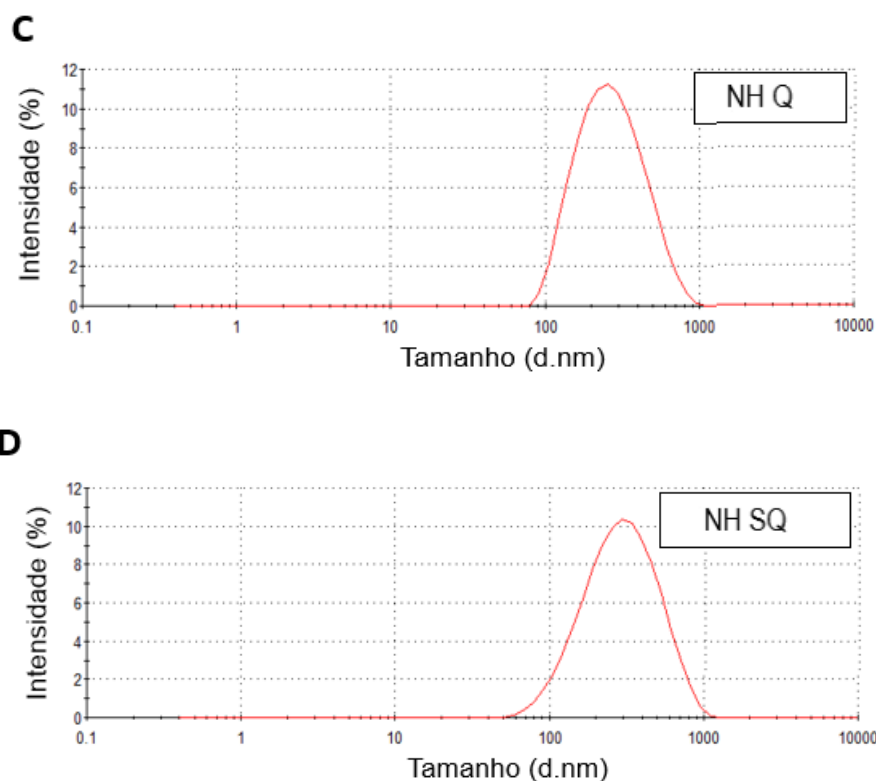
PDI	0,163 ± 0,030	0,155 ± 0,005	0,215 ± 0,002	0,209 ± 0,005
Potencial zeta (mV)	35,6 ± 0,99	33,23 ± 1,27	36,46 ± 0,81	31,33 ± 0,96

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Legenda: Amostras avaliadas: Nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ) todas na concentração de 1mg.mL⁻¹. Parâmetros avaliados: Eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta.

As NH analisadas são uniformes em tamanho, conforme evidenciado pelo baixo PDI (0,155 a 0,215) e unimodal como pode ser observado nas curvas de distribuição de tamanho (figura 16). PDI <0,3 é o valor geralmente aceito para indicar distribuição homogênea de nanopartículas (DUDHIPALA; VEERABRAHMA, 2016).

Figura 16. Curvas de distribuição de tamanho de partícula das (A) NH BRANCA, (B) NH S, (C) NH Q e (D) NH SQ obtidas através do Zetasizer





Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

O potencial Zeta é a medida da carga superficial líquida e é um parâmetro importante que influencia a estabilidade física de dispersões coloidais. Altos valores de potencial Zeta conferem estabilidade a dispersão coloidal evitando a agregação devido à repulsão eletrostática entre partículas com carga semelhante. As NH mostraram potencial Zeta de cerca de +31,33 a +36,46 mV carga superficial positiva, sugerindo que a quitosana, um polímero de carga superficial positiva, forma uma camada externa cobrindo a superfície das nanopartículas (CLEMENTINO; SONVICO, 2018). De acordo com a literatura valores de potencial Zeta de -20 a -30 mV ou superior (+20 a +30 mV ou superior) é considerado suficiente para garantir a estabilização eletrostática (DUDHIPALA; VEERABRAHMA, 2016).

A análise de tamanho e índice de polidispersão também foi avaliada pelo Goniometro Multicorrelator para verificação destes parâmetros em outros ângulos. Portanto a tabela 4 mostra os valores de R_h , D e PDI calculados usando

a análise de CONTIN no ângulo de 90° calculados com auxílio do software ALV-7004 V.3.0. Observa-se que a adição de SIN e Q10 provoca aumento no tamanho da partícula e diminuição do coeficiente de difusão em relação a amostra que não contém os ativos (NH branca). Todas as amostras apresentam baixos valores de PDI, indicando uma faixa estreita de distribuição de tamanho, especialmente observado na amostra que contém apenas SIN (AVADI et al., 2010).

Tabela 4. Valores de Rh, D, e PDI das NH BRANCA, NH S, NH Q e NH SQ

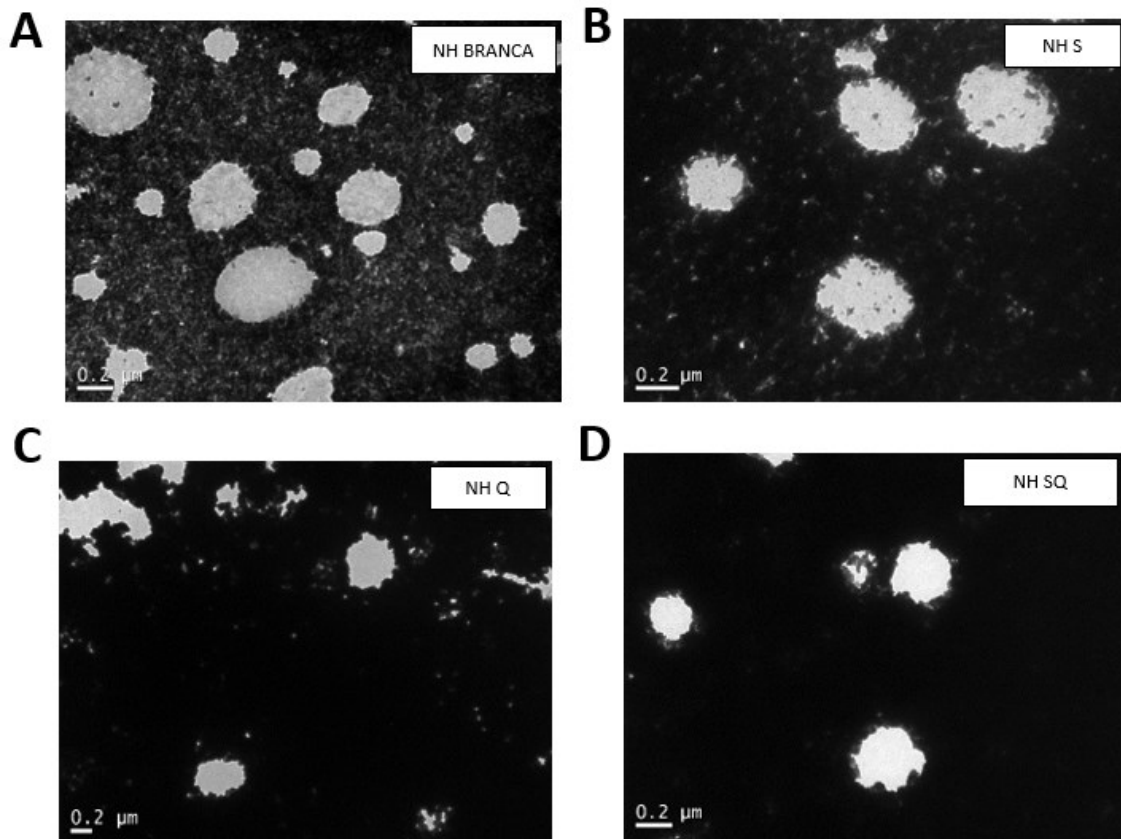
Amostra	R_h (nm)	D (10⁻¹²) (m² s⁻¹)	PDI
NH Branca	80,0	2,93	0,13
NH S	92,0	2,55	0,09
NH Q	90,0	2,60	0,10
NH SQ	90,0	2,60	0,11

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Legenda: Raio hidrodinâmico (Rh), coeficiente de difusão (D) e índice de polidispersão (PDI). Amostras avaliadas: Nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Micrografias de TEM das quatro nanopartículas analisadas (NH Branca, NH S, NH Q e NH QS) estão representadas na Figura 17. Nas imagens de TEM, as nanopartículas apresentam-se com forma esférica, além disso, não foram observadas outras morfologias, indicando a manutenção de sua estrutura após a secagem no *grade*, o que sugere uma boa estabilidade. O tamanho das partículas foi semelhante ao observado anteriormente pelo Rh.

Figura 17. Imagens de TEM das (A) NH BRANCA, (B) NH S, (C) NH Q e (D) NH SQ



Fonte: Imagens obtidas pela autora (2024). Legenda: Amostras avaliadas: Nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

5.3 Estudos de estabilidade

As suspensões de nanopartículas normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas nanométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano, mas a estabilidade está relacionada ao tipo de procedimento de formação de nanopartículas e pode ser explicada pela Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO). Essa teoria oferece uma abordagem teórica para entender a estabilidade de coloides, incluindo nanopartículas como as de lecitina e quitosana. A estabilidade é determinada

pela interação entre as partículas dispersas e o meio circundante, considerando duas forças principais: as forças de Van der Waals e as repulsões eletrostáticas (CASARELLA; TARANTINO; DI DONNA, 2024).

As repulsões eletrostáticas surgem devido às cargas elétricas presentes na superfície das nanopartículas. Em nanopartículas de lecitina e quitosana, a carga superficial é influenciada pelos grupos funcionais em suas estruturas, como grupos fosfato na lecitina, conferindo cargas negativas, e a protonação da quitosana em soluções ácidas, resultando em cargas positivas. Essas cargas geram repulsão entre partículas com a mesma carga (FEREIG et al., 2021).

Portanto a estabilidade coloidal das nanopartículas de lecitina e quitosana é explicada pela interação dessas forças, de acordo com a teoria DLVO. Se as forças de Van der Waals predominam sobre as repulsões eletrostáticas, as partículas tendem a se aproximar, levando à aglomeração ou coagulação. Isso ocorre em condições onde as cargas elétricas são neutralizadas, como em pHs próximos ao ponto isoelétrico das partículas. Por outro lado, se as repulsões eletrostáticas são dominantes, as partículas se dispersam e mantêm uma distância entre si, resultando em estabilidade coloidal. Isso pode acontecer em condições onde as partículas têm cargas elétricas opostas e são capazes de se repelir mutuamente (CASARELLA; TARANTINO; DI DONNA, 2024; FEREIG et al., 2021).

A avaliação da estabilidade das nanopartículas, principalmente sob diferentes condições de temperatura, é de fundamental importância. O tamanho de partícula, o potencial Zeta, a eficiência de encapsulação, e o PDI são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade (JOSE et al., 2018). Poucos estudos referentes à estabilidade de NH contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura.

Portanto neste estudo, o tamanho médio de partícula, PDI, potencial Zeta, eficiência de encapsulação foram os parâmetros selecionados como referência para avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas expostas a três distintas temperaturas (5, 25 e 40 °C) durante 28 dias de armazenamento (Tabela 5).

A eficiência de encapsulação é o principal parâmetro para avaliar a estabilidade de um composto encapsulado durante o seu armazenamento. No presente estudo durante os 28 dias, na temperatura de 5°C ocorreram pequenas variações no conteúdo de SIN e Q10 nas NH, mostrando que os materiais e o método utilizados são eficientes pois possibilita o armazenamento das nanopartículas em solução facilitando o manuseio e aplicação. Mas o mesmo não é observado para as outras duas temperaturas estudadas 25 e 40 °C, revelando assim a sensibilidade destas substâncias a este parâmetro. Vale ressaltar que as nanopartículas de SIN foram as que mais degradaram frente a temperaturas mais altas e este fato pode estar associado aos grupamentos funcionais da molécula de SIN, como por exemplo o grupo lactona presente na molécula que é bastante sensível a temperatura (SIMÕES et al., 2014).

Tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta são parâmetros primordiais na otimização de nanopartículas estáveis para aplicações nutricionais e médicas (CHADHA et al., 2012). No entanto, pode ser observado que com o passar dos dias houve uma pequena variação de tamanho e PDI, consequência da possível formação de aglomerados e segregação de fase. Um valor de potencial Zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da nanopartícula, pois grandes forças repulsivas conforme evidenciado pela Teoria de DLVO tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes, no entanto quanto ao potencial Zeta, os resultados obtidos indicaram partículas de carga positiva, condizentes com o polímero utilizado (DEL PRADO-AUDELO et al., 2020).

Portanto o estudo de estabilidade acelerado (adaptado) foi importante para identificar as possíveis limitações das NH contendo SIN e Q10, sendo que condições de armazenamento em temperaturas mais baixas variam menos em relação ao armazenamento em temperatura ambiente. Além disso, vale ressaltar que nos sistemas nanoparticulados estudados não são utilizadas nenhum aditivo a fim de conservar as suas propriedades. Para minimizar as limitações observadas, em função da estabilidade, o uso de técnicas de secagem como a liofilização poderia ser empregado no sistema nanoparticulado, a fim de aumentar a vida útil das nanopartículas e prevenir eventuais fenômenos de degradação (ALI; LAMPRECHT, 2017).

Tabela 5. Estudos de estabilidade das NH BRANCA, NH S, NH Q, NH QS

TEMPO (DIAS)	T (°C)	NH BRANCA			NH S				NH Q				NH SQ			
		TAMANHO (nm)	PZ (mV)	PDI	TAMANHO (nm)	PZ (mV)	PDI	EFICIÊNCIA (%)	TAMANHO (nm)	PZ (mV)	PDI	EFICIÊNCIA (%)	TAMANHO (nm)	PZ (mV)	PDI	EFICIÊNCIA (%)
0	-	219,76	38,23	0,173	221,96	31,43	0,173	100	238,80	36,46	0,215	100	249,86	31,33	0,209	100/100
14	5	227,53	45,96	0,179	231,43	32,23	0,179	82,99	248,13	43,20	0,197	96,60	254,99	31,83	0,226	67,47/98,85
	25	225,00	33,03	0,209	229,53	23,16	0,240	26,73	238,90	45,76	0,195	94,46	256,60	27,33	0,218	49,74/94,67
	40	231,70	21,66	0,200	229,53	23,50	0,214	-	259,70	43,33	0,202	82,28	250,93	22,06	0,220	12,46/67,59
28	5	234,93	46,56	0,176	235,46	27,80	0,194	66,70	253,13	51,56	0,203	93,13	260,40	28,20	0,209	61,43/98,35
	25	230,00	24,01	0,183	243,50	24,36	0,164	25,07	249,50	40,83	0,214	86,87	262,06	26,16	0,213	37,87/92,92
	40	-	-	-	256,40	9,11	0,158	-	265,30	35,26	0,205	74,99	252,86	28,70	0,210	5,83/66,05

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Legenda: Amostras avaliadas: Nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

Parâmetros avaliados: Tamanho de partícula (tamanho), potencial Zeta (PZ), índice de polidispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE).(-) amostra que não foi possível realizar análise.n=1

5.4 Estudos de supersaturação

A administração oral é amplamente preferida devido à sua conveniência, baixa invasividade e menor impacto hepático em comparação com outras vias de administração de fármacos. No entanto, a biodisponibilidade dos fármacos administrados por via oral pode ser comprometida devido à instabilidade no trato gastrointestinal e à baixa permeabilidade através das membranas biológicas. Estratégias que induzem supersaturação surgem como uma promissora abordagem para superar essas limitações (MURTHY et al., 2020; PARK; HA; KIM, 2020).

Nesse contexto, investigou-se o perfil de supersaturação de duas formulações nanoencapsuladas. A AUC foi avaliada como uma medida da extensão da supersaturação alcançada pelas substâncias nos respectivos meios. O estudo comparou as formulações NH S, NH SQ e a SS em diferentes meios biorrelevantes, conforme ilustrado na Figura 18. Observou-se que todas as formulações de NH apresentaram taxas de dissoluções rápidas, alcançando a supersaturação máxima (solubilidade) em 30 minutos, independentemente do meio utilizado.

Especificamente, a formulação NH S apresentou uma AUC significativamente maior do que a SS, com um aumento de aproximadamente 10,56 vezes na solubilidade no meio FaSSGF e 2,08 vezes no FaSSIF, utilizando a mesma dose. Para a formulação NH SQ, foi observada uma melhoria na solubilidade em meio FaSSGF, especialmente para a Q10. Este fato pode ser explicado em função do pKa da molécula, já que no estômago, em pH mais ácido, a Q10 se encontra predominantemente na forma protonada. Isso contribui para melhorar a solubilidade da Q10 em meios lipofílicos, como o FaSSGF, facilitando assim sua absorção e biodisponibilidade (HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020).

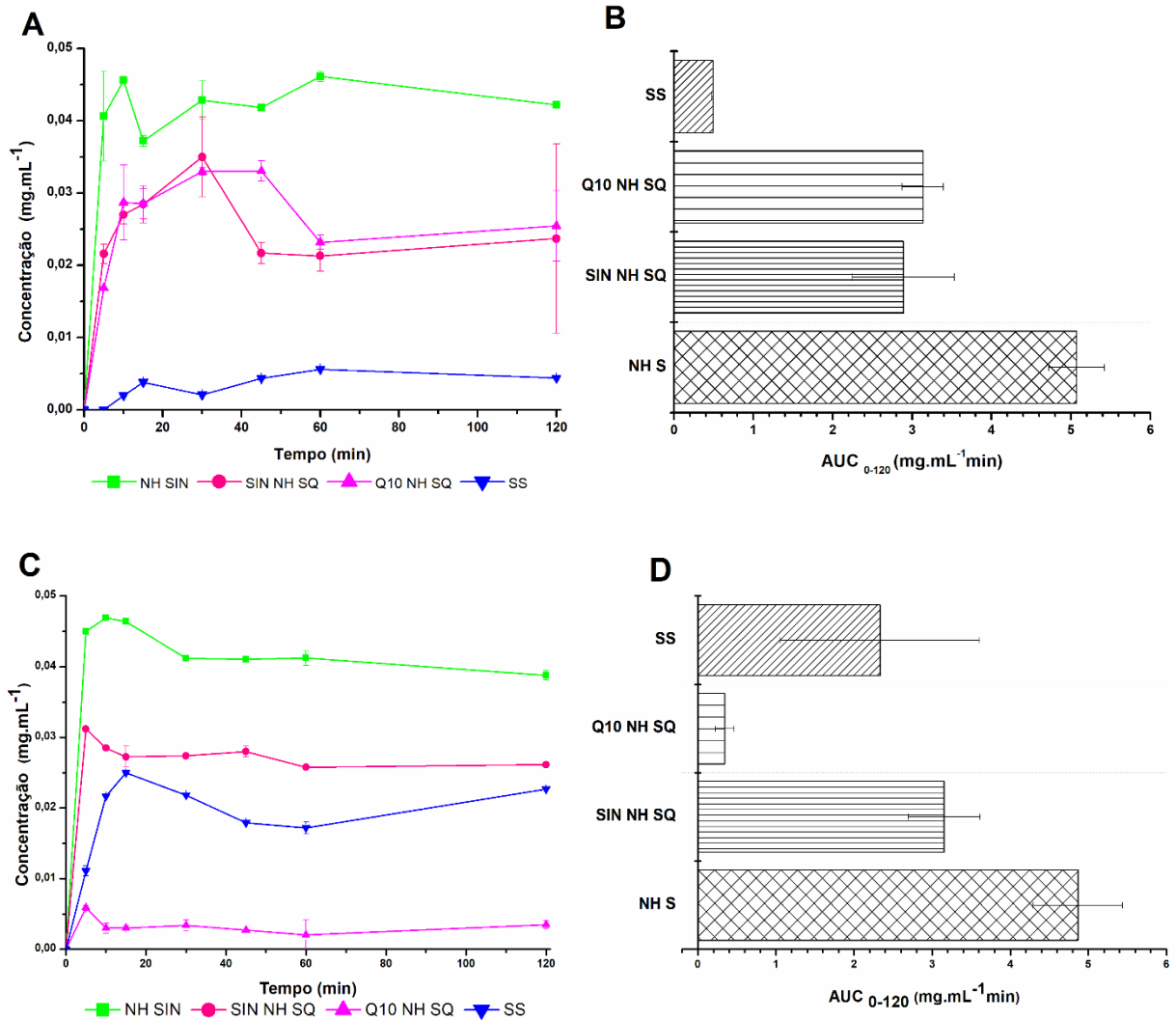
O meio FaSSGF simula as condições estomacais, representando o primeiro estágio da digestão e absorção no trato gastrointestinal (TGI) (AGAFONOV et al., 2024). Portanto, uma maior solubilidade da SIN e de Q10

nanoencapsulada neste meio pode indicar um início mais eficiente da absorção já no estômago.

É fundamental ressaltar que, mesmo com a mudança do meio biorrelevante do FaSSGF para o FaSSIF, ocasionando uma alteração de pH, as formulações de NH continuaram a apresentar supersaturação. Esse resultado é significativo, pois sistemas que promovem a supersaturação devem ser capazes de estabilizar de forma eficiente a solução supersaturada formada. As nanopartículas desempenham um papel crucial nesses sistemas, fornecendo um efeito protetor que pode ter prevenido a degradação da substância ativa. Esse aspecto é essencial para manter a estabilidade do fármaco durante o trânsito pelo trato gastrointestinal, assegurando, assim, sua eficácia terapêutica (PARK; HA; KIM, 2020).

Formulações supersaturáveis desempenham um papel muito importante na absorção de medicamentos insolúveis ou pouco solúveis em água, uma vez que estimulam sua solubilização. A associação da quitosana com lecitina por meio da autoassociação é especialmente interessante. Os fosfolipídios com carga negativa e a quitosana com carga positiva formam nanoestruturas rígidas e estáveis. Essas nanopartículas demonstraram excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de uma adesividade mucosa eficaz e citotoxicidade mínima. A combinação dessas propriedades, como a mucoadesividade da quitosana, a estabilidade das nanopartículas de lecitina e quitosana, com o aumento da concentração no trato gastrointestinal por meio da supersaturação, pode melhorar então significativamente a absorção do fármaco. A nanoencapsulação permite que o fármaco seja entregue de forma mais estável e concentrada, aumentando sua biodisponibilidade e, portanto, sua eficácia terapêutica. Isso ocorre porque a nanoestruturação dos materiais encapsulantes cria uma barreira protetora ao redor do fármaco, protegendo-o da degradação no trato gastrointestinal e permitindo uma melhor absorção (LI et al., 2017; MURTHY et al., 2020; PARK; HA; KIM, 2020).

Figura 18. Estudos de supersaturação das NH S, NH SQ e SS e suas respectivas AUC nos meios biorrelevantes (A-B) FaSSGF e (C-D) FaSSIF



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Notas: Concentração de sinvastatina nas nanopartículas de sinvastatina (NH S), concentração de sinvastatina nas nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (SIN NH SQ), concentração de coenzima Q10 nas nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (Q10 NH SQ), suspensão de sinvastatina (S SIN). Os resultados representam a média \pm DP, n=3

5.5 Estudos *in vivo*

5.5.1 Avaliações hemodinâmicas

A SIN é um fármaco hipolipemiante que inibe a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase para controlar o colesterol elevado ou

hipercolesterolemia. Estudos anteriores mostraram que SIN pode desempenhar um papel na atenuação da sepse (YU et al., 2017).

Na figura 19, os dados mostram que os animais avaliados exibiram hipotensão, ou seja, uma pressão arterial mais baixa do que o normal, e uma frequência cardíaca mais elevada do que o esperado. Esses são sintomas típicos observados em pacientes com sepse, uma vez que a sepse é caracterizada por uma resposta inflamatória desregulada do organismo a uma infecção. A hipotensão ocorre devido à dilatação dos vasos sanguíneos e vazamento de fluido dos vasos para os tecidos, enquanto a frequência cardíaca elevada pode ser uma resposta compensatória do corpo para tentar manter um fluxo sanguíneo adequado (CATALÃO et al., 2022; WATTANAPAIBOON; BANDITLERDRUK; VATTANAVANIT, 2020).

Além disso, observou-se que o uso de SIN não apresentou efeito protetor sobre a pressão arterial ou a frequência cardíaca nesse modelo experimental. Isso sugere que, apesar da SIN possivelmente desempenhar um papel na atenuação da sepse, ela pode não ter um impacto significativo na regulação da pressão arterial ou da frequência cardíaca nessas condições específicas de estudo. Esses resultados ressaltam a complexidade da resposta fisiológica à sepse e a necessidade de investigações adicionais para compreender completamente os efeitos da SIN nesse contexto clínico.

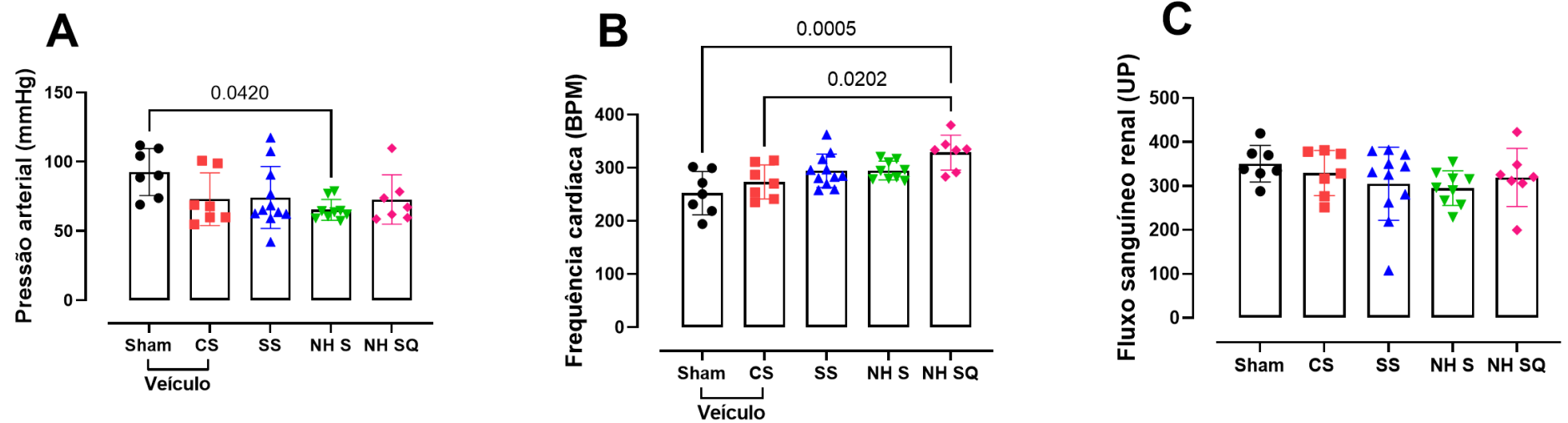
A hipotensão persistente e a resposta inadequada aos agentes vasoconstritores são características típicas da sepse. Na sepse, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar causam uma diminuição eficaz na pressão arterial, apesar da tentativa do corpo de aumentar a pressão arterial através da vasoconstrição. Isso resulta em uma condição conhecida como hipotensão refratária, na qual os pacientes não respondem adequadamente aos medicamentos vasoconstritores tradicionalmente usados para elevar a pressão arterial, como a angiotensina (LEISMAN et al., 2022).

A hipotensão refratária é um sinal de disfunção cardiovascular grave na sepse. Portanto, como mostrado na Figura 20, é possível observar que o modelo induzido resultou em disfunção vascular. A hipotensão refratária aos agentes vasoconstritores, conforme demonstrado na figura, indica uma resposta

cardiovascular anormal após a indução. Isso confirma a presença de disfunção vascular no modelo estudado. Pode-se verificar que o tratamento com a suspensão de sinvastatina melhorou o fluxo sanguíneo renal, porém não teve efeito significativo sobre a pressão arterial.

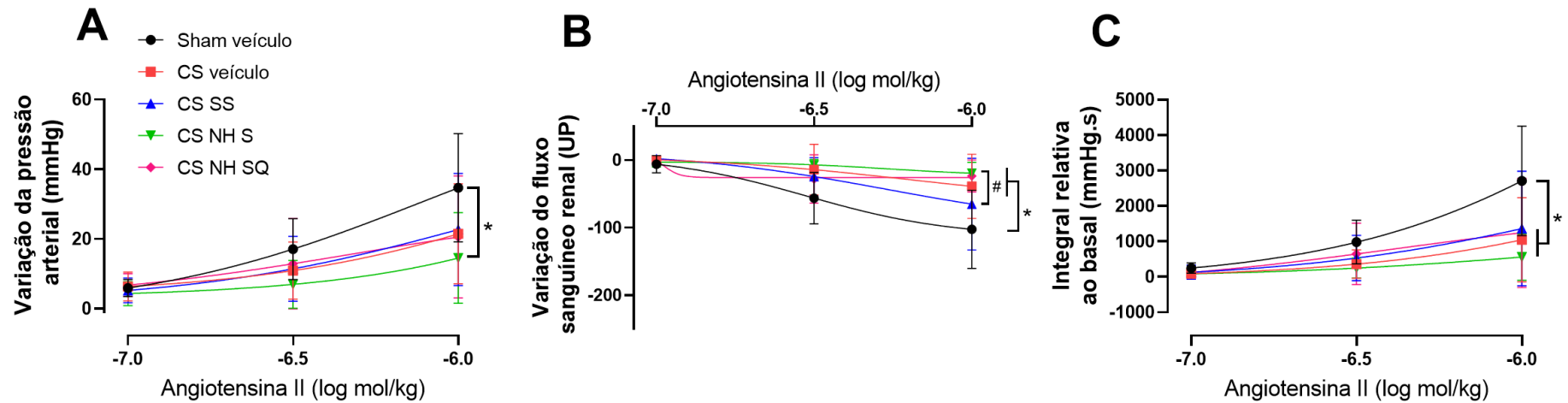
A integral relativa ao basal mostra a variação da pressão arterial ao longo do tempo. Os animais sépticos demonstraram um prejuízo em sustentar os efeitos vasoconstritores da angiotensina II. Porém, o tratamento com SIN não reverteu esse dano no modelo estudado.

Figura 19. Efeito do tratamento com SIN nos valores basais da pressão arterial, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal



Fonte: Figura elaborada pela autora (2024). Notas: Os animais foram submetidos à sepse utilizando o modelo de aplicação de suspensão de conteúdo cecal (CS, do inglês *cecal slurry*) ou *sham*. Vinte e quatro horas após a indução da sepse foram registrados os seguintes parâmetros: (A) pressão arterial média (B) frequência cardíaca e (C) fluxo sanguíneo renal. Os resultados representam a média \pm DP, $n=7-11$ animais. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Sidak. As diferenças entre grupos estão representadas pelos valores de P na figura.

Figura 20. Efeito do tratamento com SIN na resposta a angiotensina II na pressão arterial e no fluxo sanguíneo renal em ratos sépticos



Fonte: Figura elaborada pela autora (2024). Notas: Os animais foram submetidos à sepse utilizando o modelo de aplicação de suspensão de conteúdo cecal (CS, do inglês *cecal slurry*) ou sham. Vinte e quatro horas após a indução da sepse, os animais foram anestesiados e preparados para avaliação da reatividade vascular *in vivo* com doses crescentes não cumulativas de angiotensina II. Os resultados representam a média \pm DP, $n=7-11$ animais. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância bidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Sidak. * $p < 0,05$, CS comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$, entre os grupos CS.

5.5.2 Avaliações do perfil lipídico

Estudos revelam que a sepse está associada à redução dos níveis de colesterol no organismo. Durante a sepse, os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL tendem a diminuir. Essa redução pode ocorrer já no momento do diagnóstico da sepse e muitas vezes se acentua ao longo da progressão da doença. As causas exatas dessa redução de colesterol na sepse não são completamente compreendidas, mas vários fatores podem estar envolvidos. Isso pode incluir diminuição da síntese hepática de colesterol, transporte prejudicado de colesterol, aumento do metabolismo do colesterol e depleção através da eliminação de toxinas. Além disso, citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a resposta inflamatória associada à sepse podem influenciar negativamente a síntese hepática de apolipoproteínas, que são proteínas que se ligam ao colesterol para formar lipoproteínas (FRAUNBERGER et al., 1999; HOFMAENNER et al., 2022).

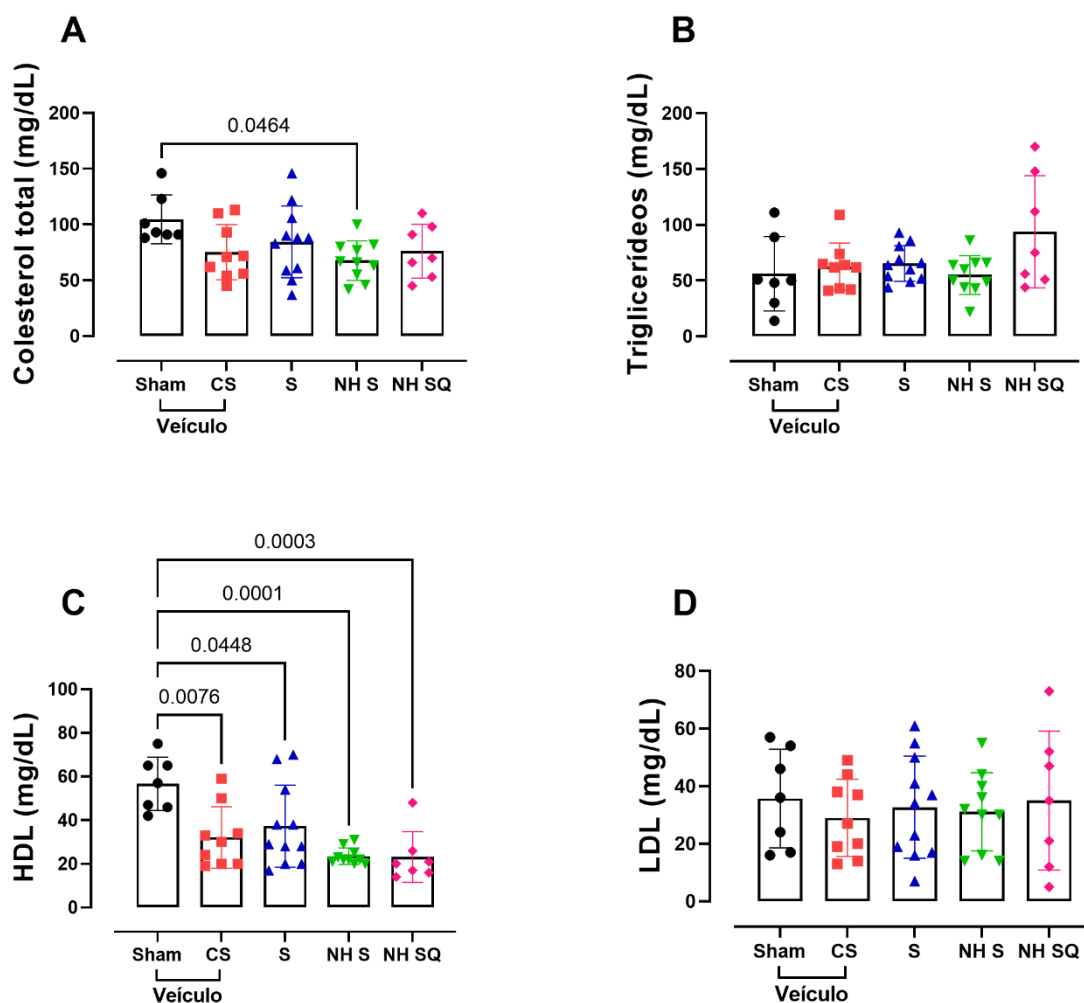
Essa redução no colesterol durante a sepse pode ter implicações significativas para a fisiopatologia da doença e para os desfechos clínicos dos pacientes. No entanto, é importante ressaltar que a diminuição do colesterol durante a sepse não é necessariamente benéfica e pode estar associada a piores resultados clínicos, como aumento da mortalidade. Portanto, compreender os mecanismos subjacentes à redução do colesterol na sepse e seu impacto nos desfechos dos pacientes é uma área de interesse ativa na pesquisa médica (HOFMAENNER et al., 2022).

É interessante observar na figura 21 que os resultados de LDL e triglicerídeos são muito próximos entre os grupos estudados, sugerindo uma similaridade nessas variáveis e indicando que a sepse e/ou o uso de sinvastatina podem não ter um efeito significativo sobre esses parâmetros lipídicos. No entanto, os resultados de colesterol total e HDL mostram diferenças em relação ao grupo controle (*sham*), indicando uma possível influência da sepse e/ou do tratamento com sinvastatina sobre esses aspectos do perfil lipídico.

Como mencionado anteriormente, os mecanismos subjacentes à redução do colesterol na sepse e o impacto do uso de sinvastatina ainda não estão completamente esclarecidos. Portanto, não se pode afirmar se a diminuição do

colesterol observada é devido à sepse, ao uso de sinvastatina ou a uma combinação de ambos. Mais estudos são necessários para entender melhor essa relação e determinar os efeitos específicos da sepse e da sinvastatina sobre o perfil lipídico.

Figura 21. Efeito do tratamento com SIN no perfil lipídico em ratos sépticos



Fonte: Figura elaborada pela autora (2024). Notas: Vinte e quatro horas após a indução da sepse, foi obtido sangue para avaliação de (A) colesterol total, (B) triglicerídeos (C) HDL e (D) LDL. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste posthoc de Sidak. Os resultados representam a média \pm DP, $n = 7-11$ animais. As diferenças entre grupos estão representadas pelos valores de P na figura.

5.6 Estudos de secagem por liofilização e caracterizações do estado sólido

O estudo teve como objetivo desidratar NH carregadas com SIN e Q10 por meio da liofilização, visando prolongar sua estabilidade química e física em comparação com a suspensão. Além disso, buscou-se avaliar as características físico-químicas das nanopartículas liofilizadas.

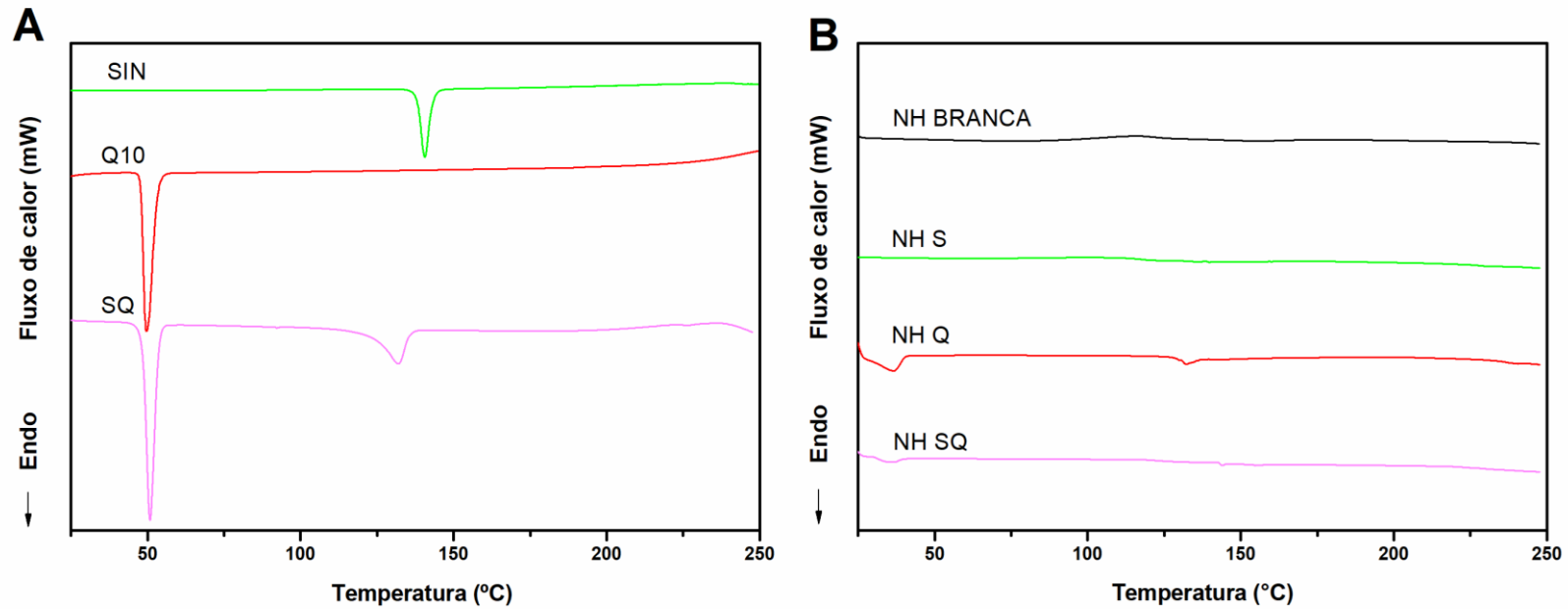
Dessa forma, pode observar que todas as NH avaliadas apresentaram natureza amorfa após o processo de liofilização. Na análise de DSC foi verificado que as NH liofilizadas não exibiram picos endotérmicos correspondentes às temperaturas de fusão dos fármacos em questão (figura 21 B) sendo que eventos endotérmicos podem ser observados quando as respectivas substâncias se encontram na forma cristalina (figura 21 A). A SIN na sua forma em pó apresentou evento endotérmico em aproximadamente 140,54 °C, a Q10 em 48,34 °C e a amostra correspondente a mistura física (proporção de 1:1 p/p) os dois eventos endotérmicos referente a SIN e Q10 foram observados separadamente evidenciando que não houve interação.

A ausência de eventos endotérmicos na figura 21 B indica que as amostras são amorfas, e esses dados são complementados e confirmados pela análise de DRX. A técnica de DRX é, de fato, amplamente reconhecida como uma técnica padrão ouro para a análise do estado sólido de materiais. O DRX permite a investigação da estrutura cristalina dos materiais, identificando picos característicos que correspondem a diferentes planos cristalinos. Quando uma amostra é amorfa, ou seja, não possui uma estrutura cristalina ordenada, o DRX não mostra padrões de difração distintos, corroborando a caracterização da amostra como amorfa. Essa complementaridade entre os dados de análise térmica e DRX fortalece a confiabilidade das conclusões sobre a estrutura das amostras (SOUZA; SAEZ; MANSUR, 2023).

Dessa forma é possível observar na figura 22 B que o difratograma obtido para as NH liofilizadas demonstrou ausência de reflexões agudas, e formação de halo característico de materiais amorfos, indicando a perda da forma cristalina das substâncias após incorporação no núcleo lipídico das nanopartículas e confirmando a amorfização da mesma. Sendo assim, ao comparar com a figura 22 A onde são vistos os difratogramas das substâncias na sua forma cristalina é

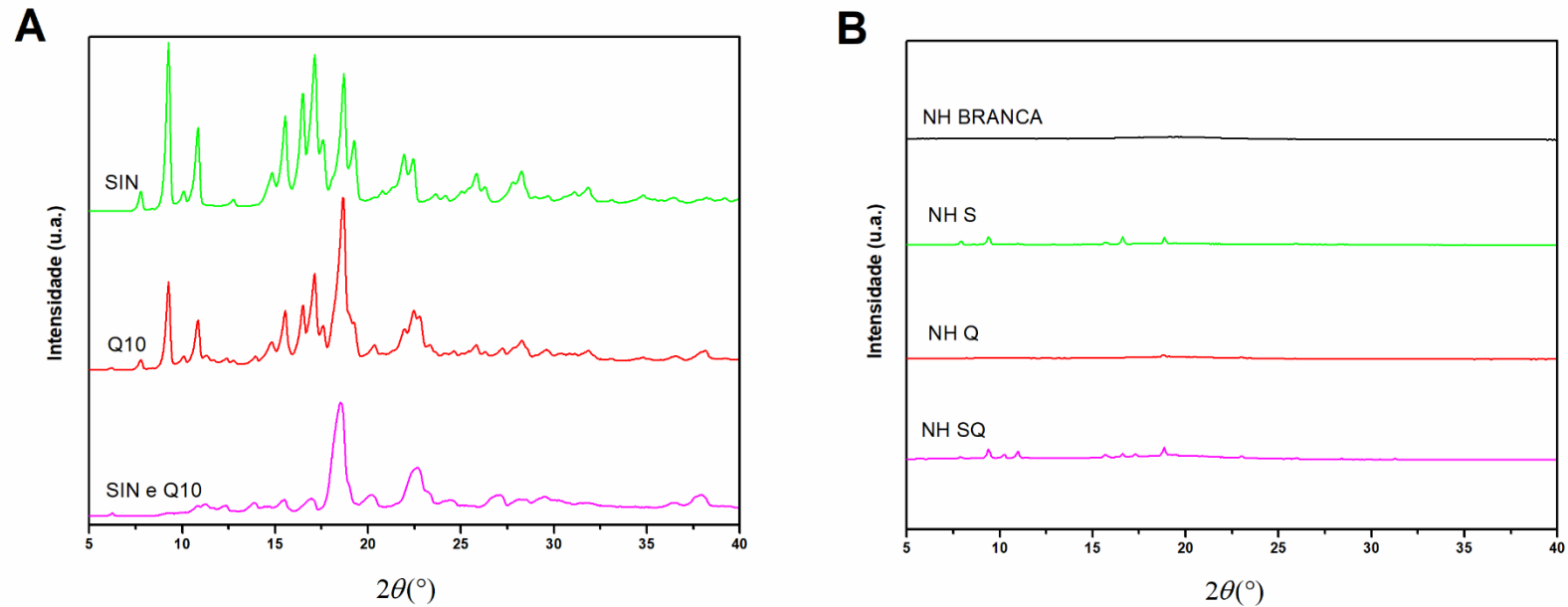
possível observar que o DRX da SIN apresentou picos de difração proeminentes em 9.2° , 10.9° , 17.2° , 17.7° , 18.7° e 22.3° , demonstrando sua existência na forma cristalina, sendo esses dados condizentes com a literatura (RIZVI et al., 2019; SOPYAN et al., 2017). O mesmo é visto para Q10 como picos agudos em 9.3° , 10.8° , 15.5° , 17.2° , 18.5° e 22.9° comprovando a cristalinidade. Já na mistura física de SIN e Q10 a visualização de picos com tal intensidade não é visualizado.

Figura 22. Curvas de DSC (A) substâncias puras e mistura física entre SIN e Q10, (B) NH liofilizadas



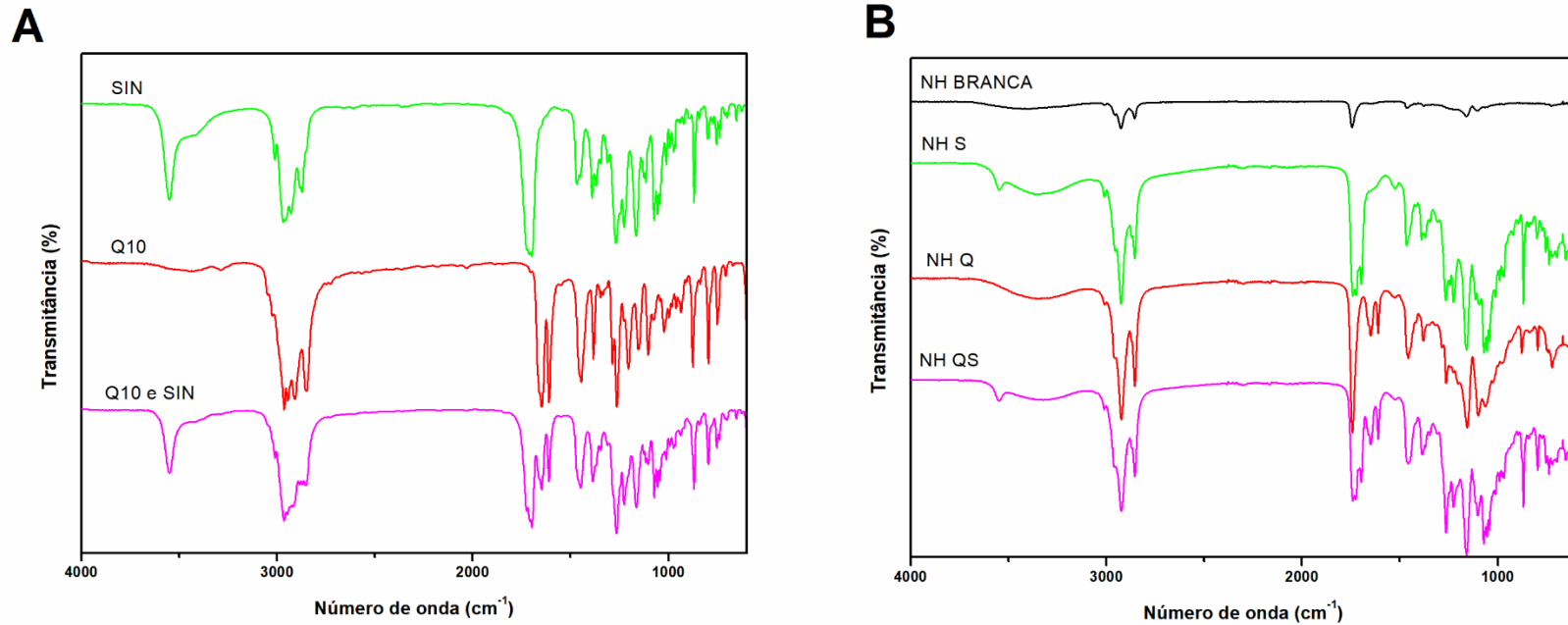
Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Sinvastatina na forma de pó (SIN), coenzima Q10 na forma de pó (Q10), mistura física de SIN e Q10 na proporção 1:1 (SQ), nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

Figura 22. Difratomogramas (A) substâncias puras e mistura física entre SIN e Q10, (B) NH liofilizadas



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Sinvastatina na forma de pó (SIN), coenzima Q10 na forma de pó (Q10), mistura física de SIN e Q10 na proporção 1:1 (SQ), nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

Figura 23. Espectros de FTIR (A) substâncias puras e mistura física entre SIN e Q10, (B) NH liofilizadas



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Sinvastatina na forma de pó (SIN), coenzima Q10 na forma de pó (Q10), mistura física de SIN e Q10 na proporção 1:1 (SQ), nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ).

A técnica de FTIR também foi empregada para auxiliar na detecção de possíveis interações e incompatibilidades, sendo reconhecida por sua simplicidade e utilidade nesse contexto. A observação do desaparecimento de bandas de absorção ou sua redução de intensidade, combinada com o surgimento de novas bandas no espectro, pode indicar a presença de interações entre os componentes da amostra. Essas mudanças sugerem a formação de novos produtos ou complexos resultantes das interações entre os componentes (ABDEL HAKIEM; MOHAMED; ALI, 2021).

De acordo com a literatura, a SIN apresenta espectro característico de infravermelho com bandas em 3548 cm^{-1} correspondentes ao estiramento vibracional -O-H , 2955 cm^{-1} e 2877 cm^{-1} (estiramento vibracional -C-H) e 1699 cm^{-1} (estiramento vibracional do grupo -C-O e -C=O) (ABDEL HAKIEM; MOHAMED; ALI, 2021). Sendo que o mesmo é visualizado na figura 23 A. Quando os espectros de FTIR da Q10 são examinados, bandas localizadas em $1646\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ são as bandas referentes a carbonílicos de cetona da Q10. As bandas entre $2944\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$ são bandas de estiramento C-H. Quando observado o espectro de FTIR da mistura física é possível verificar que as principais bandas foram mantidas com relação as duas substâncias em questão (SOUZA; SAEZ; MANSUR, 2023).

Na figura 23 B verifica-se os espectros referentes as amostras de NH secas sem o uso de agentes crioprotetores, as interações entre fármacos e excipientes presentes nas formulações foram examinadas por FTIR. O perfil de FTIR do sistema nanoparticulado carregado com SIN, Q10 e SIN e Q10, quando comparado com os espectros de FTIR da NH branca (excipiente), é possível verificar que apenas as bandas referentes aos fármacos são adicionadas. Os espectros FTIR de NH não mostraram quaisquer picos adicionais. Este fato é devido a nenhuma ocorrência de reação química durante o processo de formação das NH formando novos grupos funcionais. Os fármacos são presos na matriz lipídica onde há apenas reação física (SUYUTI; HENDRADI; PURWANTI, 2023).

5.6.1 Estudos de estabilidade das NH na presença de crioprotetores.

A liofilização é uma abordagem bem estabelecida para aumentar a estabilidade química e física de sistemas coloidais por longos períodos de tempo. Devido às tensões neste processo, agentes crioprotetores são utilizados com a função de prevenir a agregação de nanopartículas, melhorar a redispersibilidade do produto seco, além de auxiliar na estabilidade e aumentar o rendimento. Portanto foram utilizados manitol e trealose como agentes crioprotetores na concentração de 2,5% m/v como estudado por Hafner e colaboradores (HAFNER et al., 2011). Foram realizadas análises por DSC e FTIR nas NH na presença dos crioprotetores, tanto no início quanto ao final de um período de 30 dias. A figura 24 B exibe as curvas de DSC das NH no tempo inicial, onde apenas eventos endotérmicos em torno de 166 °C, relacionados ao manitol conforme constatado na literatura, foram observados, sem evidência de outros eventos. Isso indica que as NH permaneceram em estado amorfo também na presença dos crioprotetores e que os mesmos executaram a sua função de proteger contra as tensões causadas pela liofilização (DE CHASTEIGNER et al., 1996).

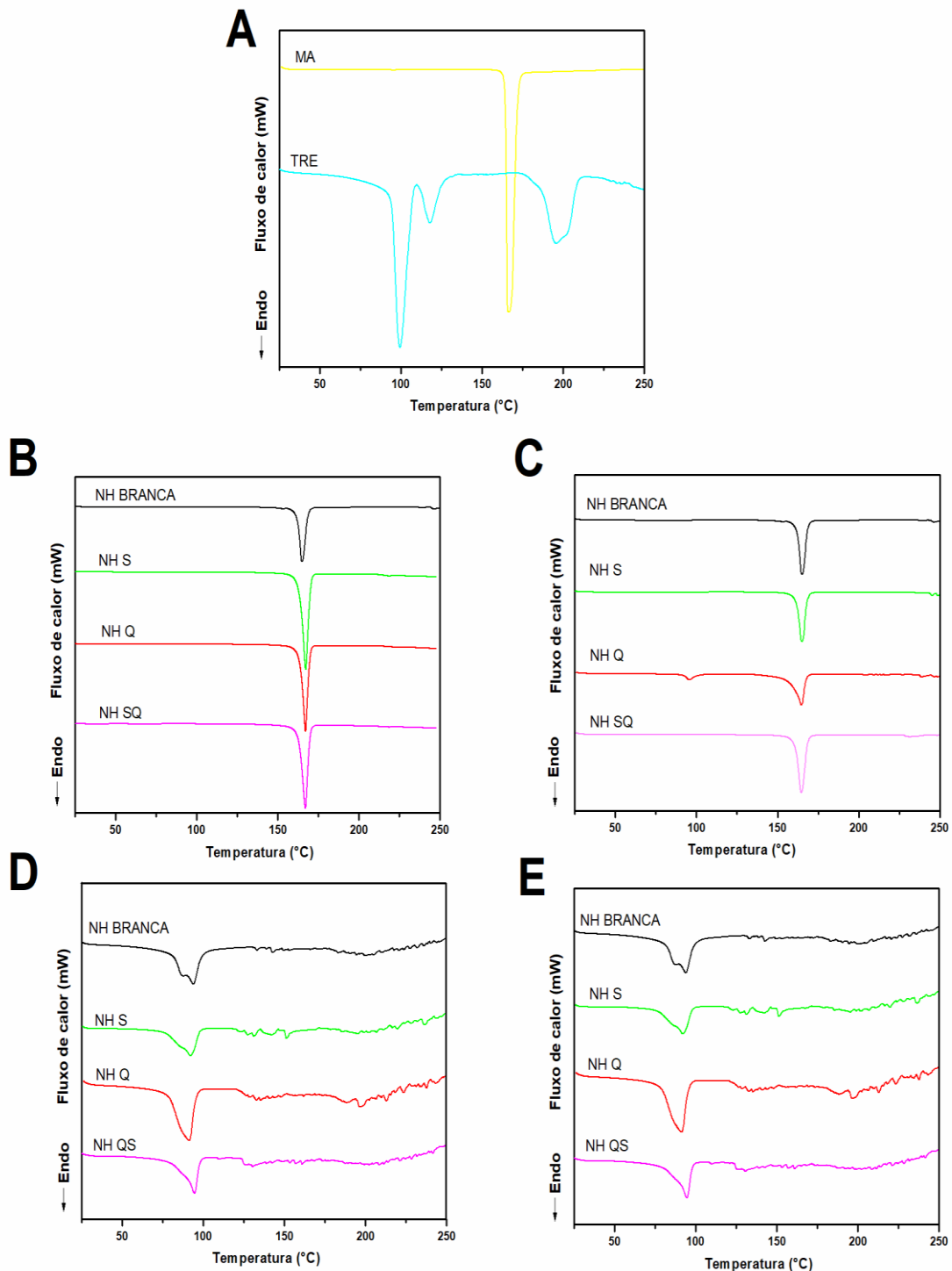
Ao final do período de 30 dias, foi observada recristalização na amostra de NH Q, indicada por um pequeno pico em torno de 40°C, correspondente à temperatura de fusão da Q10. No entanto, esse fenômeno não foi observado em outras amostras. Essa observação destaca a sensibilidade da Q10 a uma variedade de fatores ambientais e de processamento. A instabilidade térmica, a susceptibilidade à oxidação e à luz ultravioleta são características que tornam essa substância propensa à degradação. Além disso, a cristalinidade da Q10 apresenta desafios adicionais. Devido à sua estrutura molecular e às forças intermoleculares envolvidas, a Q10 pode cristalizar facilmente dependendo das condições de armazenamento (HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020).

A estabilidade das nanopartículas na presença de trealose foi submetida a avaliação, com os resultados registrados nas figuras 24 C-D. Contudo, os resultados não são evidenciados com clareza devido à proximidade dos eventos endotérmicos associados à trealose com a temperatura de fusão das substâncias em análise. Em face dessa interferência, o manitol emerge como o agente crioprotetor mais indicado, considerando suas propriedades físico-

químicas que minimizam os efeitos indesejáveis da cristalização e preservam a integridade estrutural das nanopartículas durante processos criogênicos.

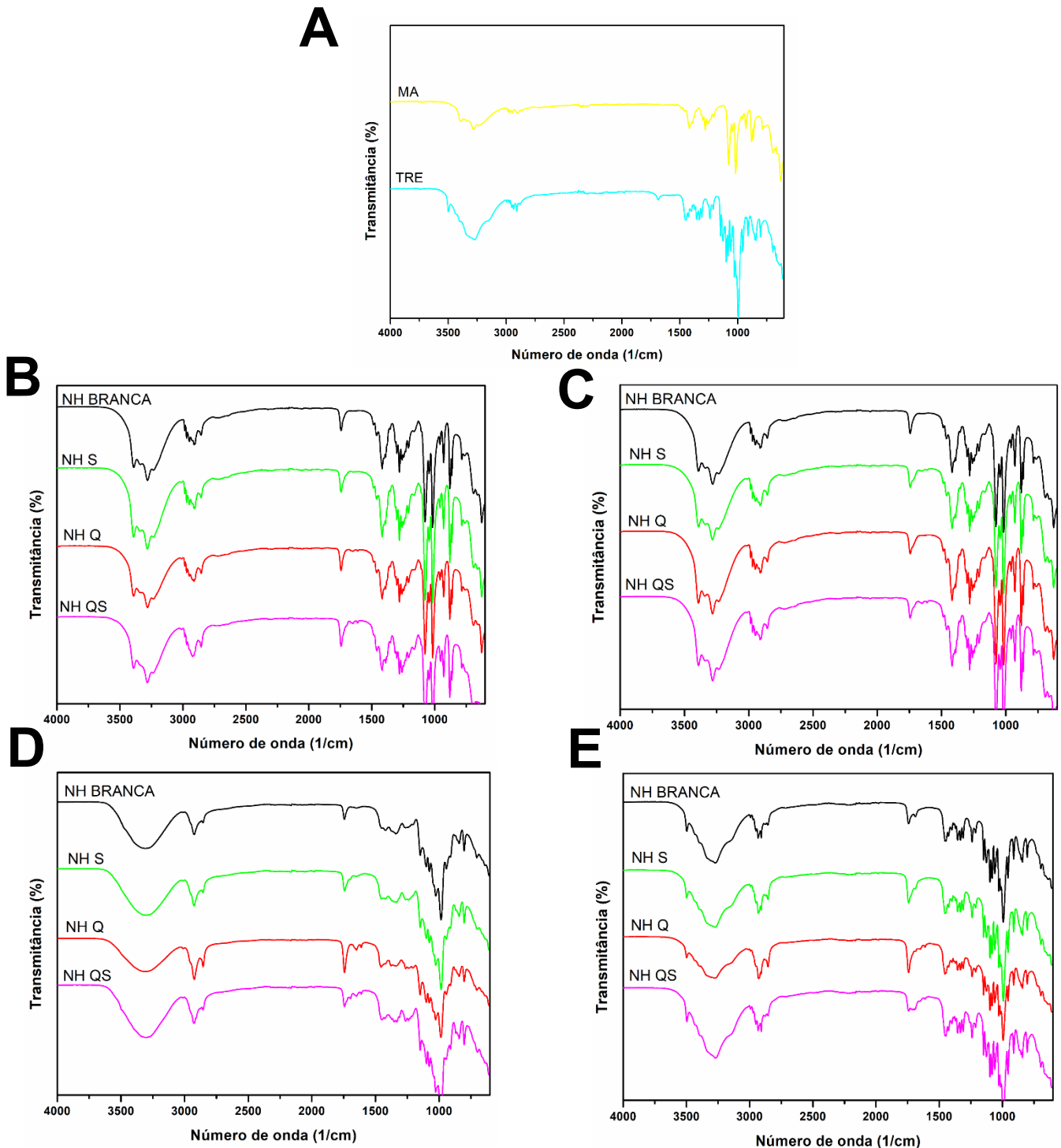
Além do monitoramento por meio das análises de DSC, também foi realizado um acompanhamento por FTIR durante o armazenamento das amostras de NH. Durante esse período, não foi observado o surgimento de novas bandas além daquelas que já são características das formulações. Essa observação sugere que não houve alterações na composição química das amostras ao longo do período de armazenamento, reforçando a estabilidade das nanopartículas durante esse processo.

Figura 24. Curvas de DSC: (A) Manitol-MA e trealose-TRE (B) NH com manitol no t_0 (C) NH com manitol no t_{30} ; (D) NH com trealose no t_0 (E) NH com trealose no t_{30}



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Manitol (MA), trealose (TRE), nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ). Figura B-D tempo zero e C-E tempo 30 dias.

Figura 25. Espectros de FTIR: (A) Manitol-MA e trealose-TRE (B) NH com manitol no t_0 (C) NH com manitol no t_{30} ; (D) NH com trealose no t_0 (E) NH com trealose no t_{30} .



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Manitol (MA), trealose (TRE), nanopartículas sem fármaco (NH Branca), nanopartículas de sinvastatina (NH S), nanopartículas de coenzima Q10 (NH Q), nanopartículas de sinvastatina e coenzima Q10 (NH SQ). Figura B-D tempo zero e C-E tempo 30 dias.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados, pode-se observar que o método de desenvolvimento de nanopartículas por *self-assembly* foi eficaz na produção de nanopartículas incorporadas com SIN e Q10. A concentração ideal para ambas as moléculas utilizadas foi de 1 mg.mL⁻¹, pois esta formulação demonstrou a melhor eficiência de encapsulação, uma faixa de distribuição de tamanho estreita e características de partículas estáveis. As amostras NH S, NH Q e NH SQ de 1,0 mg.mL⁻¹, apresentaram eficiência de encapsulação de 81,93 ± 3,16; 81,56 ± 1,43 e 81,20 ± 3,65/ 87,06 ± 1,82 respectivamente e melhor tamanho, PDI e potencial Zeta. Adicionalmente, a concentração de 1,0 mg/mL⁻¹ se destacou como a formulação que alcançou a melhor eficiência de encapsulação para ambas as substâncias, SIN e Q10, simultaneamente.

A importância do tamanho das partículas é destacada, especialmente para a absorção gastrointestinal após a administração oral, sendo preferíveis partículas com tamanho inferior a 300 nm para um transporte eficaz para o sistema linfático (DE MENDOZA et al., 2009; KIM et al., 2017; LIU; LENG; LIU, 2021). As nanopartículas analisadas mostraram-se uniformes em tamanho, conforme evidenciado pelo baixo PDI (variando de 0,155 a 0,215) e uma distribuição unimodal. Além disso, apresentaram um potencial Zeta na faixa de +31,33 a +36,46 mV, indicando uma carga superficial positiva. Isso sugere que a quitosana, um polímero positivamente carregado, forma uma camada externa cobrindo a superfície das nanopartículas (CLEMENTINO; SONVICO, 2018).

As imagens de TEM mostraram que as NH apresentam uma forma esférica. Além disso, os testes de estabilidade evidenciaram que as nanopartículas permaneceram estáveis durante o armazenamento a 5°C por 28 dias.

Durante os estudos de supersaturação, observou-se que todas as formulações avaliadas exibiram taxas rápidas de dissolução, alcançando a máxima supersaturação em apenas 30 minutos, independentemente do meio empregado. Especificamente, a formulação NH S apresentou uma AUC significativamente maior do que a SS, com um aumento de aproximadamente 10,56 vezes na solubilidade no meio FASSGF e 2,08 vezes no FASSIF,

utilizando a mesma concentração. É notável que, mesmo com a mudança do meio biorrelevante do FaSSGF para o FaSSIF, as formulações de NH mantiveram a supersaturação. Esse resultado é bastante interessante, pois uma maior solubilidade dos fármacos nanoencapsulados neste meio pode indicar um início mais eficiente da absorção já no estômago, que é o primeiro estágio do trato gastrointestinal, o que poderia ter implicações significativas para a biodisponibilidade e eficácia da substância.

Nos estudos *in vivo*, os dados revelaram que os animais avaliados apresentaram hipotensão e uma frequência cardíaca mais elevada. Esses são sintomas típicos observados em pacientes com sepse, o que confirma a eficácia do modelo de indução. No entanto, as formulações nanoencapsuladas contendo SIN e SIN+Q10 não demonstraram efeito protetor no modelo de estudo utilizado. Além disso, não foram capazes de reverter os danos causados, uma vez que não responderam ao vasoconstritor angiotensina II. A incerteza persiste em relação ao perfil lipídico dos ratos sépticos, uma vez que não está claro se a redução do colesterol total e do HDL é atribuível à presença da sepse, ao uso da sinvastatina ou a uma combinação de ambos os fatores. Sendo sugerível novas abordagens, tais como: diferentes modelos experimentais, dosagens e tempo de tratamento.

Como sugestão de aplicação tecnológica das NH obtidas foi realizado estudos de secagem e estabilidade usando agentes crioprotetores. Sendo assim foi observado pelas análises de caracterização do estado sólido, que as formulações após a liofilização apresentaram características amorfas e que o uso de crioprotetores podem auxiliar na estabilidade e prevenir processos de recristalização.

Assim, as NH produzidas representam sistemas promissores para melhorar a solubilidade aquosa da SIN e Q10, pois têm o potencial de gerar supersaturação, condição que auxilia na solubilidade. Porém, os estudos *in vivo* utilizando NH contendo SIN e Q10 na avaliação de sepse do modelo estudado devem ser continuados para investigar a relevância dos resultados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a estabilidade das NH na forma líquida ao longo de um período de 6 meses em diferentes condições de armazenamento;
- Realizar análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NH liofilizadas para avaliar sua morfologia;
- Prosseguir com o estudo *in vivo* para igualar o n amostral, avaliar a eficiência da dose e do modelo experimental;
- Realizar avaliação dos marcadores bioquímicos, tais como ureia, creatinina, lactato e lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT);
- Investigar, por meio do estudo *in vivo*, o mecanismo de ação da sinvastatina na sepse experimental e examinar o comportamento do perfil lipídico de ratos *Wistar* sépticos;
- Avaliar as características do estado sólido das NH sem a presença de agentes crioprotetores ao longo de um período de 30 dias;
- Realizar um estudo de supersaturação utilizando NH na forma sólida.

REFERÊNCIAS

ABDEL HAKIEM, A. F.; MOHAMED, N. A.; ALI, H. R. H. FTIR spectroscopic study of two isostructural statins: Simvastatin and Lovastatin as authentic and in pharmaceuticals. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 261, p. 120045, nov. 2021.

ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems : Current Status and. **Molecules**, v. 26, p. 5905, 2021.

AGAFONOV, M. A. et al. Features of the solubilization of leflunomide with Pluronic F127 in biorelevant media FaSSGF and FaSSIF. **Journal of Molecular Liquids**, v. 393, p. 123675, jan. 2024.

AHMAD, A. et al. A Study on Pharmacokinetic Functionalities and Safety Margins of an Optimized Simvastatin Nanoformulation. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, 2023.

AL-HUSSANIY, H. A. et al. Nanoemulsions as medicinal components in insoluble medicines. **Pharmacia**, v. 70, n. 3, p. 537–547, 27 jul. 2023.

AL THAHER, Y.; PERNI, S.; PROKOPOVICH, P. Nano-carrier based drug delivery systems for sustained antimicrobial agent release from orthopaedic cementous material. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, n. April, p. 234–247, 2017.

ALI, M. E.; LAMPRECHT, A. Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 170–177, jan. 2017.

ALIMOHAMMADI, M. et al. Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammation, angiogenesis, and oxidative stress in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled- trials. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 579–593, 18 jun. 2021.

ALMEIDA, N. R. C. DE et al. Análise de tendência de mortalidade por sepse no Brasil e por regiões de 2010 a 2019. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 25, 22 abr. 2022.

AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, 1995.

ÁNGELES PEÑA, M. et al. Thermodynamic Analysis for the Solubility of Allopurinol in Aqueous and Non-aqueous Mixtures at Various Temperatures. **International Journal of Thermophysics**, v. 43, n. 9, p. 1–21, 2022.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019 - ANVISA. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, e. **Diário Oficial da União, Brasil**, v. 2019, 2019.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine:**

Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BARRETT, J. A. et al. Discovery solubility measurement and assessment of small molecules with drug development in mind. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 5, p. 1315–1325, 2022.

BEVERNAGE, J. et al. Excipient-Mediated Supersaturation Stabilization in Human Intestinal Fluids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 564–570, 4 abr. 2011.

BEVERNAGE, J. et al. Supersaturation in human gastric fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 184–189, maio 2012.

BHOLA, R. et al. Drug solubility and dissolution thermodynamic approach in various solvents at different temperatures: A review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 4374–4383, 2022.

BOGSRUD, M. P. et al. No effect of combined coenzyme Q10 and selenium supplementation on atorvastatin-induced myopathy. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 47, n. 2, p. 80–87, 1 abr. 2013.

BRAGA FILHO, J. A. F. et al. Prophylactic Treatment With Simvastatin Modulates the Immune Response and Increases Animal Survival Following Lethal Sepsis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 21 set. 2018.

BRASIL. Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**, v. 2017, p. 87, 2017.

BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2549–2572, ago. 2009.

CASARELLA, A.; TARANTINO, A.; DI DONNA, A. Revisiting DLVO theory to inform particle-scale modelling of clays. **Computers and Geotechnics**, v. 165, p. 105876, jan. 2024.

CATALÃO, C. H. R. et al. Pre-treatment and continuous administration of simvastatin during sepsis improve metabolic parameters and prevent CNS injuries in survivor rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 477, n. 11, p. 2657–2667, 23 nov. 2022.

CHADHA, R. et al. Exploring the potential of lecithin/chitosan nanoparticles in enhancement of antihypertensive efficacy of hydrochlorothiazide. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 8, p. 805–812, 9 dez. 2012.

CHAUHAN, D. et al. Comparing Simvastatin Monotherapy V/S Simvastatin-Ezetimibe Combination Therapy for the Treatment of Hyperlipidemia: A Meta-Analysis and Review. **Cureus**, v. 14, n. 11, 2022a.

CHAUHAN, D. et al. Comparing Simvastatin Monotherapy V/S Simvastatin-Ezetimibe Combination Therapy for the Treatment of Hyperlipidemia: A Meta-Analysis and Review. **Cureus**, 2 nov. 2022b.

CHRISTENSEN, C. L. et al. LIFESTAT – Living with statins: An interdisciplinary

project on the use of statins as a cholesterol-lowering treatment and for cardiovascular risk reduction. **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 44, n. 5, p. 534–539, 3 jul. 2016.

CHUNG, H. et al. Effects of Simvastatin on Pharmacokinetics and Anticoagulant Effects of Dabigatran in Healthy Subjects. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 364, 27 fev. 2023.

CLEMENTINO, A. et al. The nasal delivery of nanoencapsulated statins – an approach for brain delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 6575–6590, dez. 2016.

CLEMENTINO, A.; SONVICO, F. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 33–41, 2018.

CLIMENT, E.; BENAIGES, D.; PEDRO-BOTET, J. Hydrophilic or Lipophilic Statins? **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, n. May, p. 1–11, 2021.

CSOMÓ, K. et al. Effect of Pravastatin and Simvastatin on the Reduction of Cytochrome C. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1121, 10 jul. 2022.

DA SILVA, F. L. O. et al. Nanonization techniques to overcome poor water-solubility with drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p. 853–864, 2 jul. 2020.

DALI, P.; SHENDE, P. Self-Assembled Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles Using Combinational Drugs for Migraine Via Intranasal Route. **AAPS PharmSciTech**, v. 24, n. 1, 2023.

DAVE, V. et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 160, p. 130–142, maio 2019.

DE CHASTEIGNER, S. et al. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. **Drug Development Research**, v. 38, n. 2, p. 116–124, jun. 1996.

DE MENDOZA, A. E. H. et al. Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 323–343, 2009.

DEL PRADO-AUDELO, M. L. et al. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 101896, out. 2020.

DING, Y. et al. Solubility and Pharmacokinetic Profile Improvement of Griseofulvin through Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Complexation with HP- γ -Cyclodextrin. **Molecules**, v. 28, n. 21, p. 7360, 31 out. 2023.

DOHLMANN, T. L. et al. Coenzyme Q10 Supplementation in Statin Treated Patients: A Double-Blinded Randomized Placebo-Controlled Trial. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1698, 29 ago. 2022.

DUDHIPALA, N.; VEERABRAHMA, K. Candesartan cilexetil loaded solid lipid

nanoparticles for oral delivery: Characterization, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 395–404, 2016.

FARRAG, S. M. et al. Atorvastatin in nano-particulate formulation abates muscle and liver affliction when coalesced with coenzyme Q10 and/or vitamin E in hyperlipidemic rats. **Life Sciences**, v. 203, p. 129–140, jun. 2018.

FATTAHI, A. et al. Preparation and characterization of simvastatin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS) with trifluoromethane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 469–478, jan. 2016.

FEREIG, S. A. et al. Self-assembled tacrolimus-loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for in vivo management of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 608, p. 121114, out. 2021.

FERNANDES SILVA, L. et al. Metabolite Signature of Simvastatin Treatment Involves Multiple Metabolic Pathways. **Metabolites**, v. 12, n. 8, p. 753, 16 ago. 2022.

FRAUNBERGER, P. et al. Reduction of Circulating Cholesterol and Apolipoprotein Levels during Sepsis. **cclm**, v. 37, n. 3, p. 357–362, 1 mar. 1999.

GARIBYAN, A. A. et al. Experimental and Theoretical Investigation of Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Fingolimod. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 97, n. 3, p. 469–476, 26 mar. 2023.

GROSU, E. et al. Study of the Drug Diffusion Through Polymeric Membranes. **Revista de Chimie**, v. 69, n. 4, p. 783–789, 15 maio 2018.

HADINOTO, K.; SUNDARESAN, A.; CHEOW, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3 PART A, p. 427–443, 2013.

HAFNER, A. et al. Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 9, p. 1117–1123, 2011.

HAMELIN, B. A.; TURGEON, J. Hydrophilicity/Lipophilicity: Relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 26–37, 1998.

HARGREAVES, I.; HEATON, R. A.; MANTLE, D. Disorders of human coenzyme q10 metabolism: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 1–13, 2020.

HARISA, G. I.; ALOMRANI, A. H.; BADRAN, M. M. Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 62–71, 2017.

HOFMAENNER, D. A. et al. The Many Roles of Cholesterol in Sepsis: A Review. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 205, n. 4, p. 388–396, 15 fev. 2022.

IMAM, S. S. et al. Recent Advancement in Chitosan-Based Nanoparticles for Improved Oral Bioavailability and Bioactivity of Phytochemicals: Challenges and Perspectives. **Polymers**, v. 13, n. 22, p. 4036, 22 nov. 2021.

IMAM, S. S. et al. Harnessing Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles for Enhanced Oral Bioavailability of Thymoquinone: In Vitro and In Vivo Assessments. **Polymers**, v. 14, n. 18, p. 3705, 6 set. 2022.

IZAR, M. C. DE O. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 117, n. 4, p. 782–844, 2021.

JERMAIN, S. V.; BROUGH, C.; WILLIAMS, R. O. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery – An update. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 379–392, jan. 2018.

JOSE, C. et al. Polymeric lipid hybrid nanoparticles: Properties and therapeutic applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 35, n. 6, p. 555–588, 2018.

KADIAN, R.; NANDA, A. A Comprehensive Insight on Recent Advancements in Self-emulsifying Drug Delivery Systems. **Current Drug Delivery**, v. 20, n. 8, p. 1095–1114, out. 2023.

KAMBAR, N.; LEAL, C. Microfluidic synthesis of multilayered lipid–polymer hybrid nanoparticles for the formulation of low solubility drugs. **Soft Matter**, v. 19, n. 8, p. 1596–1605, 2023.

KAMIYA, S.; NAKASHIMA, K. Physicochemical interaction mechanism between nanoparticles and tetrasaccharides (stachyose) during freeze-drying. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 12, p. 2026–2031, 2 dez. 2017.

KIM, J. T. et al. Absorption study of genistein using solid lipid microparticles and nanoparticles: Control of oral bioavailability by particle sizes. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 452–459, 2017.

KORANI, S. et al. Application of nanotechnology to improve the therapeutic benefits of statins. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 2, p. 567–574, fev. 2019.

LANG, X. et al. Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 433–445, jul. 2020.

LEISMAN, D. E. et al. Angiotensin II enhances bacterial clearance via myeloid signaling in a murine sepsis model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 34, 23 ago. 2022.

LI, Q. et al. Self-Assembled Core-Shell-Type Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: Intracellular Trafficking and Relevance for Oral Absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3120–3130, out. 2017.

LIANG, B. et al. Statin Use and Mortality among Patients Hospitalized with Sepsis: A Retrospective Cohort Study within Southern California, 2008–2018. **Critical Care Research and Practice**, v. 2022, p. 1–7, 6 maio 2022.

- LIU, J.; LENG, P.; LIU, Y. Oral drug delivery with nanoparticles into the gastrointestinal mucosa. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86–96, 2021.
- LIU, X. et al. Improving solubility of poorly water-soluble drugs by protein-based strategy: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 634, n. February, p. 122704, 2023.
- LÖNNBERG, K. I. et al. Real-world pharmacogenetics of statin intolerance: effects of SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 variants. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 33, n. 7, p. 153–160, 2023.
- MAHBOOBIAN, M. M. et al. Simvastatin in ternary solid dispersion formulations: Improved In vitro dissolution and anti-hyperlipidemia efficiency. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, p. 103571, ago. 2022.
- MALAQUIAS, D. P. et al. Development and optimization by factorial design of polymeric nanoparticles for simvastatin delivery. **Polímeros**, v. 32, n. 2, 2022.
- MIAO, L. et al. Application of Solubility and Dissolution Profile Comparison for Prediction of Gastric pH-Mediated Drug-Drug Interactions. **AAPS Journal**, v. 24, n. 1, 2022.
- MIKASHINOVICH, Z. I.; BELOUSOVA, E. S.; SARKISYAN, O. G. Impairment of Energy-Dependent Processes in the Muscle Tissue as a Pathogenetic Mechanism of Statin-Induced Myopathy. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 162, n. 4, p. 433–435, 27 fev. 2017.
- MOHAMMADY, M.; MOHAMMADI, Y.; YOUSEFI, G. Freeze-Drying of Pharmaceutical and Nutraceutical Nanoparticles: The Effects of Formulation and Technique Parameters on Nanoparticles Characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 11, p. 3235–3247, nov. 2020.
- MURTHY, A. et al. Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improve the oral bioavailability and alter the pharmacokinetics of raloxifene. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 588, p. 119731, out. 2020.
- O'DRISCOLL, C. M.; GRIFFIN, B. T. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility—The potential impact of lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 617–624, mar. 2008.
- OESTERLE, A.; LAUFS, U.; LIAO, J. K. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 120, n. 1, p. 229–243, 2017.
- PADHYE, S. G.; NAGARSENKER, M. S. Simvastatin solid lipid nanoparticles for oral delivery: Formulation development and in vivo evaluation. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 5, p. 591–598, 2013.
- PARK, H.; HA, E.-S.; KIM, M.-S. Current Status of Supersaturable Self-Emulsifying Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 365, 16 abr. 2020.
- PRASAD, M. et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 1521–1537, 2018.

- QIU, Y. **Developing Solid Oral Dosage Forms**. [s.l.] Elsevier, 2009.
- QU, H. et al. Effects of Coenzyme Q10 on Statin-Induced Myopathy: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 19, 2 out. 2018.
- QURESHI, O. S. et al. Sustained release docetaxel-incorporated lipid nanoparticles with improved pharmacokinetics for oral and parenteral administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 3, p. 250–261, 3 abr. 2017.
- RAUCHOVÁ, H. Coenzyme Q10 Effects in Neurological Diseases. **Physiological Research**, v. 70, p. 683–714, 2021.
- REN, Y. et al. Selenized Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles for Oral Delivery of Tripterine with Ameliorative Oral Anti-Enteritis Activity and Bioavailability. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, 2023.
- RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 11 jan. 2009.
- RIZVI, S. Z. H. et al. Simvastatin-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced anti-hyperlipidemic activity in hyperlipidemia animal model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, n. January, p. 136–143, 2019.
- RIZZARDI, N. et al. Coenzyme Q10 Phytosome Formulation Improves CoQ10 Bioavailability and Mitochondrial Functionality in Cultured Cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 927, 7 jun. 2021.
- SANCHES, M. P. et al. Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 803–812, 2020.
- SARIISIK, E. et al. Interaction of the cholesterol reducing agent simvastatin with zwitterionic DPPC and charged DPPG phospholipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 4, p. 810–818, 2019.
- SATO, Y. et al. Enhancement of intestinal absorption of coenzyme Q10 using emulsions containing oleyl polyethylene acetic acids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 142, n. August 2019, p. 105144, 2020.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, fev. 2003.
- SHARMA, A. et al. Supersaturation-Based Drug Delivery Systems: Strategy for Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2969, 6 maio 2022.
- SHI, Q. et al. Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, n. March, p. 1–12, 2022.
- SIMÕES, R. G. et al. Thermal Stability of Simvastatin under Different Atmospheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 241–248, jan. 2014.
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and

- Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801, 23 fev. 2016.
- SKARLOVNIK, A. et al. Coenzyme Q10 supplementation decreases statin-related mild-to-moderate muscle symptoms: A randomized clinical study. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 2183–2188, 2014.
- SOPYAN, I. et al. Simvastatin-nicotinamide co-crystal: Design, preparation and preliminary characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 297–303, 2017.
- SOUZA, J. DE; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 515–527, 2007.
- SOUZA, I. D. L.; SAEZ, V.; MANSUR, C. R. E. Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 230, n. August, p. 113491, 2023.
- STROES, E. S. et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy—European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. **European Heart Journal**, v. 36, n. 17, p. 1012–1022, 1 maio 2015.
- SUYUTI, A.; HENDRADI, E.; PURWANTI, T. Physicochemical Characteristics, Entrapment Efficiency, and Stability of Nanostructured Lipid Carriers Loaded Coenzyme Q10 with Different Lipid Ratios. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 1134–1142, 2023.
- TAYLOR, B. A. et al. A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with confirmed Statin Myopathy. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 2, p. 329–335, fev. 2015.
- TAYLOR, L. S.; ZHANG, G. G. Z. Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 122–142, jun. 2016.
- THAKORE, S. D. et al. Biorelevant dissolution testing and physiologically based absorption modeling to predict in vivo performance of supersaturating drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 607, p. 120958, set. 2021.
- TODD, P. A.; GOA, K. L. Simvastatin. **Drugs**, v. 40, n. 4, p. 583–607, out. 1990.
- VECCHIONE, R. et al. Oil/water nano-emulsion loaded with cobalt ferrite oxide nanocubes for photo-acoustic and magnetic resonance dual imaging in cancer: in vitro and preclinical studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 275–286, 2017.
- VILLAR, D. et al. Biologic effects of fenbendazole in rats and mice: A review. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 8–15, 2007.
- WANG, L. et al. Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 3, p. 241–248, 3 abr. 2018.

WANG, Y. et al. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid–polymer hybrid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, n. 1–2, p. 98–106, mar. 2012.

WATTANAPAIBOON, K.; BANDITLERDRUK, S.; VATTANAVANIT, V. Presenting symptoms in sepsis: Is the mnemonic “sepsis” useful? **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 2199–2204, 2020.

WHITLON, D. S. Statins and hearing. **Hearing Research**, v. 425, p. 108453, 2022.

WON, Y. et al. Polymeric solid dispersion enhances the equilibrium solubility and oral bioavailability of tegoprazan. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 44, n. 10, p. 880–887, 27 out. 2023.

XI, Z. et al. Solubility improvement of curcumin by crystallization inhibition from polymeric surfactants in amorphous solid dispersions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 83, p. 104351, maio 2023.

XU, S.; DAI, W.-G. Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 36–43, ago. 2013.

YANG, C.-H. et al. Simvastatin attenuates sepsis-induced blood-brain barrier integrity loss. **Journal of Surgical Research**, v. 194, n. 2, p. 591–598, abr. 2015.

YANG, M. et al. Bioavailability Improvement Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs Based on the Supersaturation Mechanism: An Update. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 208, 16 jun. 2016.

YOUNG, J. M. et al. Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Simvastatin-Induced Myalgia. **The American Journal of Cardiology**, v. 100, n. 9, p. 1400–1403, nov. 2007.

YU, L. et al. Simvastatin prevents lipopolysaccharide-induced septic shock in rats. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 37, n. 2, p. 226–230, 11 abr. 2017.

ZAKKULA, A. et al. Preparation and optimization of nilotinib self-micro-emulsifying drug delivery systems to enhance oral bioavailability. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 3, p. 498–504, 3 mar. 2020.

ZEWAIL, M. B. et al. Development of famotidine-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for prolonged and efficient anti-gastric ulcer activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, n. March 2023, p. 105196, 2024.

ZHAI, G. et al. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1621, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Desenvolvimento e validação analítica para quantificação de SIN e Q10

1. Procedimento experimental

- **Método analítico e condições cromatográficas**

O desenvolvimento da metodologia por CLAE para quantificação da SIN e da Q10 teve como base o estudo realizado por CLEMENTINO e SONVICO (CLEMENTINO; SONVICO, 2018). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10A, degaseificador DGU-14A, detector de luz UV SPD-10A em 238 nm para detecção da SIN e 275 nm para detecção da Q10, e auto injetor SCL-10A, disponível no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC. As condições cromatográficas incluem a utilização de uma coluna de fase reversa Perkin Elmer Brownlee Analytical 5 μ m C8 (150 x 4,6 mm) mantida à temperatura de 45 °C. A fase móvel foi composta por metanol (Eluente A) e água acidificada pH 5,5 (H₃PO₄ 1M) (Eluente B). O gradiente aplicado a uma taxa de fluxo constante de 1,5 mL min⁻¹ é apresentado na tabela A1. Os dados obtidos foram avaliados através do software CLASS-VP® V 6.14.

Tabela A 1. Condições cromatográficas do método analítico

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Taxa de fluxo (mL/min)
0,01	70	30	1,5
3,50	80	20	1,5
5,00	95	5	1,5
6,00	100	0	1,5
15,00	95	5	1,5
16,00	80	20	1,5
18,00	70	30	1,5

20,00

Stop

-

-

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Legenda: Eluente A: Metanol e eluente B: Água acidificada pH 5,5.

O método foi revalidado seguindo os parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), especificidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, e robustez que são indicados na Resolução RE n° 166 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para avaliar a qualidade e confiabilidade dos métodos químico-analíticos (BRASIL, 2017).

- Linearidade e Limites de Detecção e Quantificação

A linearidade do método foi avaliada por análise de regressão linear através da construção de três curvas de calibração nas concentrações de 0,005; 0,02; 0,05; 0,10; 0,25 mg. mL⁻¹ preparadas a partir de uma solução padrão de 0,25 mg.mL⁻¹ de SIN e Q10. A solução padrão foi preparada por etapas devido ao fato da utilização de duas substâncias, portanto pesou-se 20 mg de SIN e transferiu-se para um balão de 20 mL, sendo que este foi completado com acetonitrila e água (proporção 65:35 v/v, pH 4,5). Para a solução de Q10 foi pesado 20,0 mg de Q10 que foi adicionada em balão volumétrico de 20 mL e dissolvida em etanol. Para o preparo da solução padrão final de SIN e Q10 foram misturadas as duas soluções que estão descritas acima e retirados 25 ml desta solução resultante, sendo transferida para um novo balão volumétrico de 50 ml onde foi aferido o menisco com o diluente (Etanol/ Acetonitrila/ H₂O- 55:30:15- pH 4,5).

Alíquotas da solução padrão final foram transferidas para balões volumétricos e diluídas com diluente nas respectivas concentrações da curva de calibração. Após, essas amostras foram transferidas para vials e analisadas por CLAE em triplicata nas condições cromatográficas já descritas para a obtenção da curva de calibração média.

Após análise dos resultados, o LD e LQ foram calculados a partir das equações da reta obtida da curva de calibração, através das equações 7 e 8.

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (8)$$

Onde, σ é o desvio padrão do intercepto das curvas com eixo Y e S é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

- Especificidade

A especificidade foi determinada através da eluição de NH branca que continham os excipientes da formulação (lecitina de soja, quitosana, óleos lipofílicos Maisine CC® e LabrafacTM®), o diluente e a NH SQ.

- Precisão

A precisão foi avaliada em relação a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi determinada através da quantificação de seis amostras de concentração 0,05 mg. mL⁻¹, em um mesmo dia, mas em períodos diferentes (tarde e noite). A precisão intermediária (interdia) foi realizada da mesma forma, porém em dois dias diferentes. Os resultados foram expressos através do DPR.

- Exatidão

A exatidão foi determinada através da quantificação do percentual de recuperação de SIN e Q10. A solução padrão foi preparada conforme descrito anteriormente. As amostras analisadas foram compostas pela NH branca, solução de SIN e Q10 e pelo diluente, além disso estas amostras foram preparadas em três concentrações de SIN e Q10 (0,005 mg. mL⁻¹ ponto inicial, 0,02 mg. mL⁻¹ ponto médio e 0,25 mg. mL⁻¹ ponto final da curva) e em triplicata. Os resultados foram apresentados em percentual de recuperação e DPR.

- Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método cromatográfico. Os parâmetros avaliados foram: temperatura da coluna em 43, 45 e 47°C, vazão da fase móvel de 1,3; 1,5; 1,7 mL.min⁻¹ e pH do eluente B (água acidificada) de 5,3; 5,5 e 5,7. Para cada condição foram realizadas análises na solução de trabalho (NH SQ 1 mg.mL⁻¹) em triplicata e os resultados expressos através do DPR.

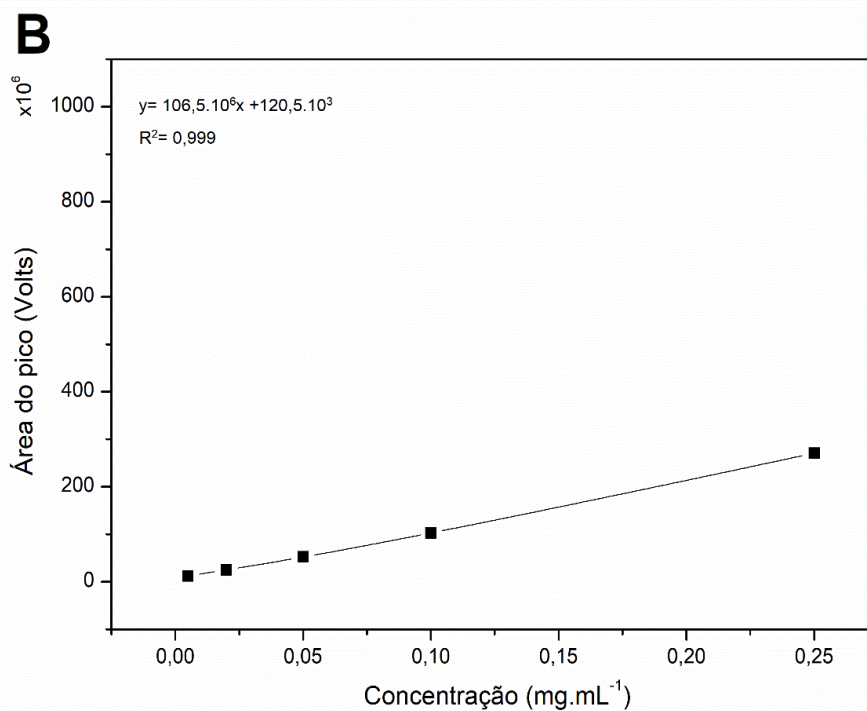
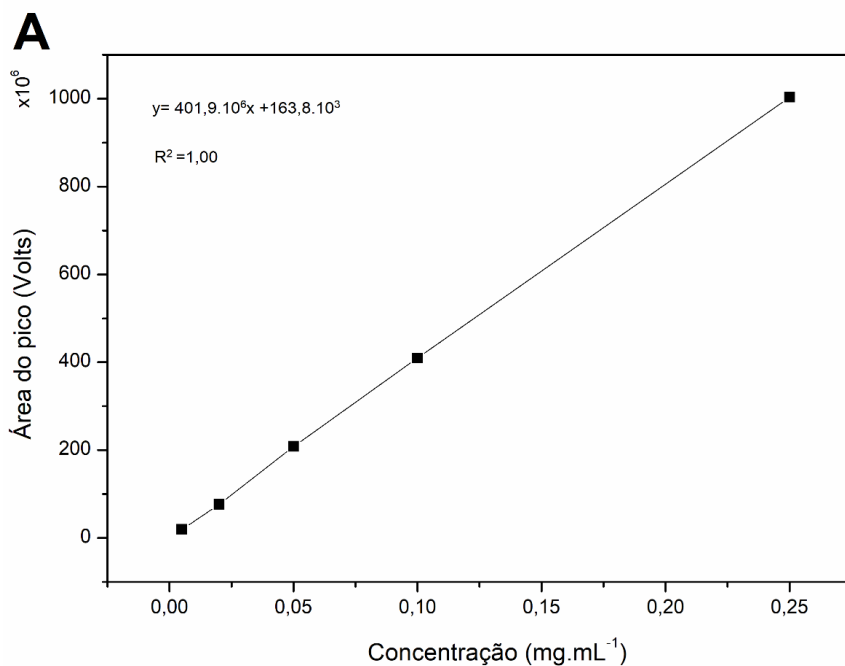
2. Resultados e Discussões

- Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para determinar a linearidade do método, realizou-se a construção de curvas analíticas, que expressam a relação entre diferentes concentrações do fármaco em solução e as áreas dos picos correspondentes. Devido ao fato de utilizarmos duas substâncias concomitantemente, foram obtidas duas curvas. A partir da obtenção da curva de calibração média, os coeficientes de determinação (R^2) foram determinados por regressão linear, sendo que o método quando linear, R^2 deve apresentar-se superior a 0,99 (BRASIL, 2017).

As curvas médias obtidas (Figura A1) apresentaram equação da reta igual a $y = 401,9 \cdot 10^6 x + 163,8 \cdot 10^3$ e $y = 106,5 \cdot 10^6 x + 120,5 \cdot 10^3$ para SIN e para Q10 respectivamente assim como $R^2 = 1,00$ e $0,99$. Além disso verificou-se linearidade na faixa de 0,005 a 0,25 mg. mL⁻¹ através da ANOVA (SIN- $F_{\text{calculado}} 10399,24 > F_{\text{crítico}} 3,47$; Q10- $F_{\text{calculado}} 402,65 > F_{\text{crítico}} 3,50$) além de os coeficientes de determinação serem maiores do que 0,99, o desvio de linearidade foi não relevante ($p > 0,05$).

Figura A 1. (A) Curva de calibração da SIN (B) curva de calibração da Q10



Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Legenda: Curvas de calibração de SIN e Q10 de 0,005 a 0,25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Média \pm DPR, $n=3$.

A partir das curvas analíticas, os limites de detecção e quantificação foram calculados. O limite de detecção representa a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente

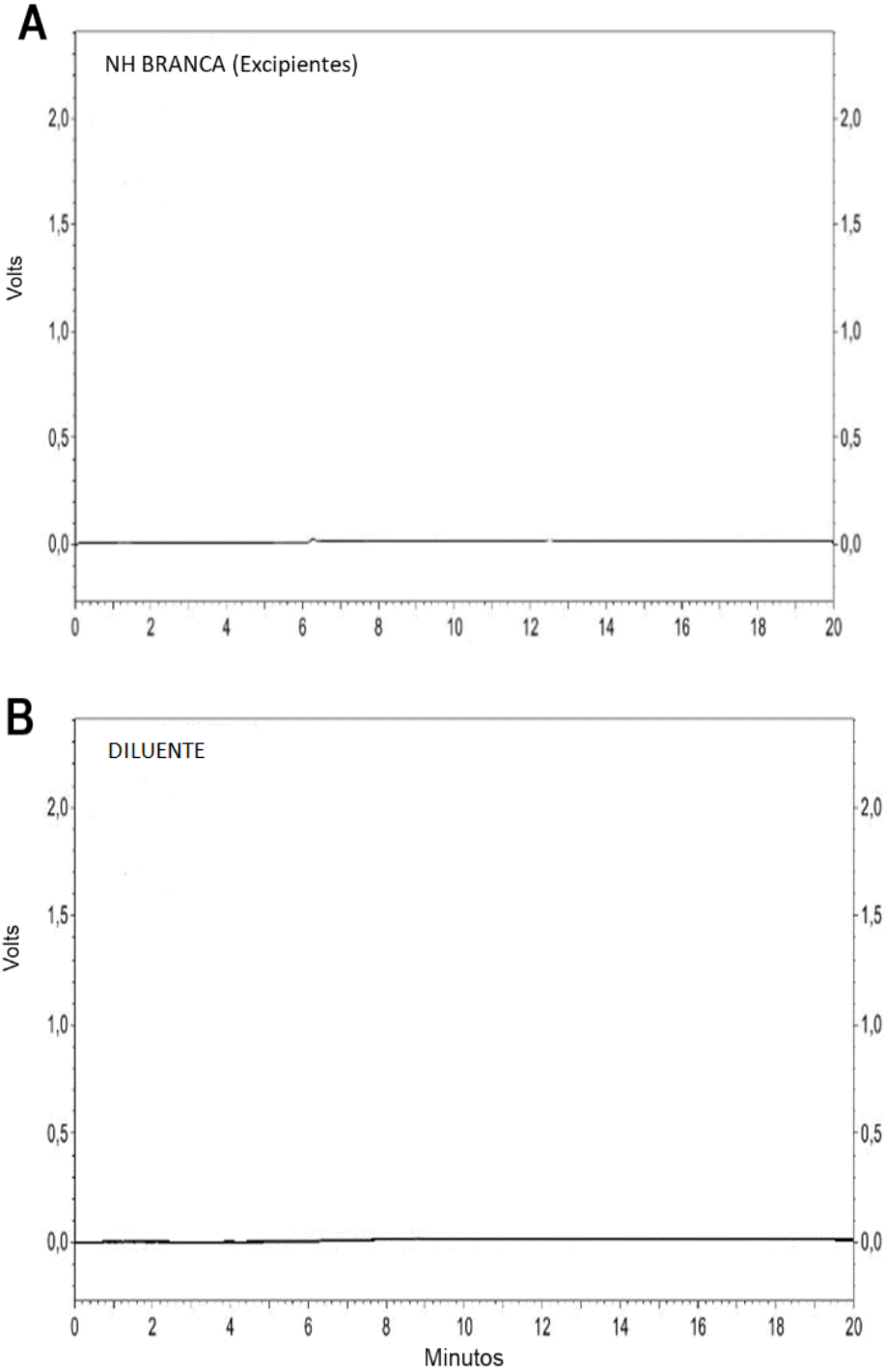
quantificada. O resultado obtido foi de 0,0014 e 0,0016 mg. mL⁻¹ para as curvas de SIN e Q10, respectivamente. Para o limite de quantificação, que determina a concentração mínima do analito necessária para que seja possível a quantificação com precisão e exatidão, o valor determinado foi de 0,0043 e 0,0049 mg. mL⁻¹, respectivamente. Dessa forma os resultados obtidos para LD e LQ estão de acordo a legislação vigente e dentro do esperado para detecção e quantificação correta dos analitos em questão (BRASIL, 2017).

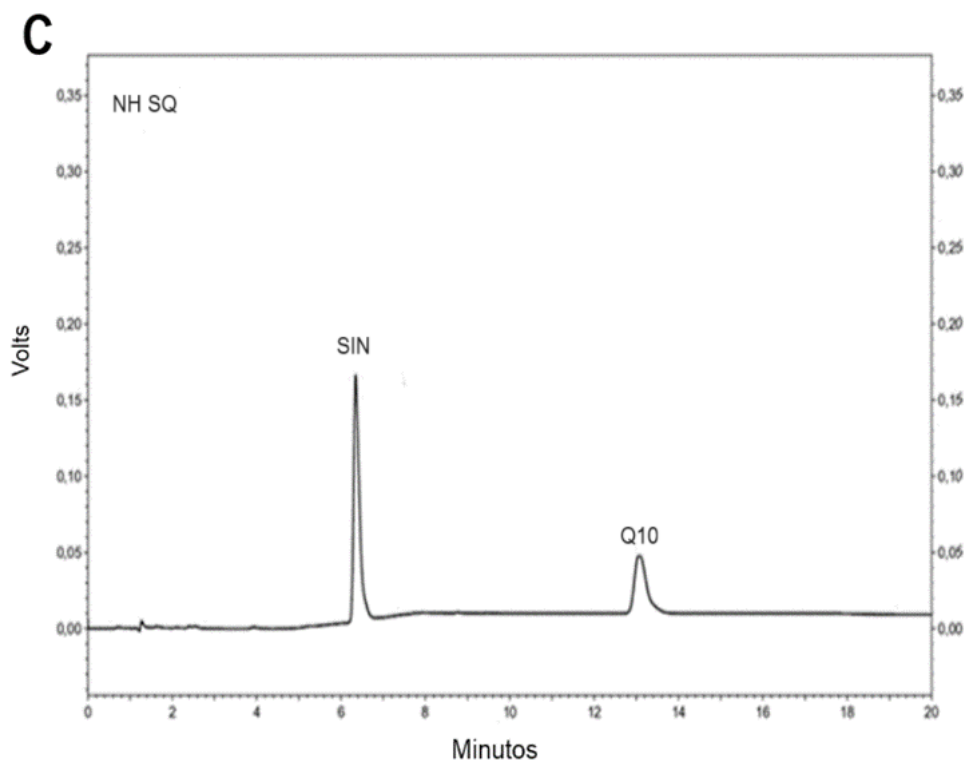
- Especificidade

A especificidade foi verificada através da eluição da NH branca que contém todos os excipientes da formulação, a eluição do diluente e a eluição da NH SQ. As três amostras citadas foram analisadas por CLAE para verificar possíveis interferentes.

A especificidade do método é a habilidade de quantificar o fármaco na presença de suas impurezas ou excipientes da formulação, o método deve assegurar que apenas o produto de interesse seja quantificado (BRASIL, 2017). A partir da figura A 2 é possível verificar que o método é específico para SIN e Q10 pois não se verificou nenhum pico referente aos excipientes (lecitina de soja, quitosana, óleos lipofílicos Maisine CC® e LabrafacTM®) e ao diluente no mesmo tempo de retenção que as substâncias analisadas.

Figura A 2. Cromatogramas (A) NH branca, (B) diluente e (C) NH SQ.





Fonte: Figura elaborada pelo autor (2024). Notas: Dados obtidos a partir do software CLASS-VP® V 6.14.

- Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia) de seis determinações de uma solução de SIN e Q10 a $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ponto médio da curva) sob as mesmas condições cromatográficas em um mesmo dia. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local (BRASIL, 2017).

A precisão intermediária (interdia) foi determinada também em sextuplicata de uma solução de SIN e Q10 a $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, mas em dois dias diferentes. A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos. Esta análise é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (BRASIL, 2017).

Os resultados obtidos destas análises estão descritos na tabela A 2 e A 3, e pode-se observar que os mesmos indicaram que o método foi preciso na quantificação da SIN e Q10, com DPR abaixo de 5 % e diferença não relevante entre os dois dias ($p > 0,05$) (BRASIL, 2017).

Tabela A 2. Análise de precisão do método cromatográfico para a SIN

Amostra	Repetibilidade	Precisão intermediária
	(Intradia) mg.mL ⁻¹	(Interdia)* mg.mL ⁻¹
SIN (n=6)	0,0503	0,0527
	0,0515	0,0542
	0,0518	0,0528
	0,0524	0,0535
	0,0528	0,0530
	0,0523	0,0538
DPR (%)	1,71	1,13

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Notas: Média \pm DPR, n=6 , * média de dois dias.

Tabela A 3. Análise de precisão do método cromatográfico para a Q10

Amostra	Repetibilidade	Precisão intermediária
	(Intradia) mg.mL ⁻¹	(Interdia)* mg.mL ⁻¹
Q10 (n=6)	0,0527	0,0510
	0,0554	0,0535
	0,0544	0,0509
	0,0545	0,0511
	0,0554	0,0521
	0,0551	0,0532
DPR (%)	2,22	1,85

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Notas: Média \pm DPR, n=6 , * média de dois dias.

- Exatidão

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, onde foram utilizadas NH branca e soluções de SIN e Q10 em concentrações conhecidas. O resultado foi expresso pelo percentual de recuperação conforme demonstrado na tabela A 4 e A 5.

Tabela A 4. Análise de exatidão do método cromatográfico para a SIN

NH BRANCA (mL)	Valor teórico de SIN (mg.mL ⁻¹)	Percentual de recuperação
		Média (%) \pm DPR (n=3)
0,05	0,005	99,36 \pm 0,05
0,05	0,05	104,02 \pm 0,05
0,05	0,25	104,79 \pm 0,03

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Notas: Média \pm DPR, n=3.

Tabela A 5. Análise de exatidão do método cromatográfico para a Q10

NH BRANCA (mL)	Valor teórico de Q10 (mg.mL ⁻¹)	Percentual de recuperação
		Média (%) \pm DPR (n=3)
0,05	0,005	96,53 \pm 0,22
0,05	0,05	99,84 \pm 0,04
0,05	0,25	99,35 \pm 0,31

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Notas: Média \pm DPR, n=3.

Os resultados apresentaram percentual de recuperação de $99,36 \pm 0,05$ a $104,79 \pm 0,03$ para SIN e de $96,53 \pm 0,22$ a $99,84 \pm 0,04$ para Q10 sendo considerado método exato para quantificação da SIN e Q10, conforme a RDC nº 166/2017 que preconiza que um método exato é aquele que apresenta concordância entre os resultados obtidos (BRASIL, 2017).

- Robustez

Um método é considerado robusto quando ele apresenta capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). Além disso, é considerado robusto quando a porcentagem média de recuperação está em torno de 100 ($\pm 5\%$) e o DPR abaixo de 2% (BRASIL, 2017; SHABIR, 2003).

A tabela A 6 apresenta os dados de percentual de recuperação e DPR, e é possível verificar que para o percentual de recuperação para SIN foi abaixo de 95% quando as condições experimentais relacionadas à vazão da fase móvel foram modificadas para $1,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e acima do valor de referência para a Q10 no fluxo de $1,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, este fato também foi verificado no estudo de validação realizado por Clementino e colaboradores (CLEMENTINO; SONVICO, 2018). Além disso, é possível observar que o método também não é considerado robusto para SIN em pH 5,3 e temperatura de $43 \text{ }^\circ\text{C}$. Dessa forma enfatiza-se que o método é robusto frente a determinados parâmetros, mas a outros como temperaturas mais baixas e pH, estes devem ser cuidadosamente controlados e monitorado para que o ensaio seja conduzido de forma robusta.

Tabela A 6. Análise de robustez do método cromatográfico para a SIN e Q10

Parâmetros		Percentual de recuperação	
		Média (%) \pm DPR (n=3)	
		SIN	Q10
pH	5,3	$95,04 \pm 1,65$	$99,14 \pm 0,99$

	5,7	98,84 ± 1,20	98,66 ± 0,86
Temperatura (°C)	43	95,38 ± 1,53	98,47 ± 0,37
	47	96,33 ± 1,90	100,28 ± 2,28
Fluxo (mL.min⁻¹)	1,3	81,79 ± 4,33	95,13 ± 5,67
	1,7	103,03 ± 2,37	113,37 ± 0,31

Fonte: Dados obtidos pela autora (2024). Notas: Média ± DPR, n=3.