

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Iara Rinco Silva

**VEICULAÇÃO DE DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA EM SISTEMA NANOMÉTRICO PARA MELHORIA DA  
BIODISPONIBILIDADE ORAL EM MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2024

Iara Rinco Silva

**VEICULAÇÃO DE DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA EM SISTEMA NANOMÉTRICO PARA MELHORIA DA  
BIODISPONIBILIDADE ORAL EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Isabela da Costa César

Coorientadoras: Profa. Elaine Amaral Leite e Profa. Renata Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte

2024

S586v Silva, Iara Rinco.  
Veiculação de derivado tiazolilhidrazona com atividade antifúngica em sistema nanométrico para melhoria da biodisponibilidade oral em modelo murino [recurso eletrônico] / Iara Rinco Silva. – 2024.  
1 recurso eletrônico (155 f. : il.) : pdf

Orientadora: Isabela da Costa César.  
Coorientadoras: Elaine Amaral Leite e Renata Barbosa de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Disponibilidade biológica – Teses. 2. Antifúngicos – Teses. 3. Nanopartículas – Teses. 4. Sistemas de liberação de medicamentos – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Leite, Elaine Amaral. III. Oliveira, Renata Barbosa de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

“VEICULAÇÃO DE DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM SISTEMA NANOMÉTRICO PARA MELHORIA DA BIODISPONIBILIDADE ORAL EM MODELO MURINO”

**IARA RINCO SILVA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Isabela da Costa Cesar - Orientadora (UFMG)

Profa. Renata Barbosa de Oliveira - Coorientadora (UFMG)

Profa. Elaine Amaral Leite - Coorientadora (UFMG)

Prof. Lucas Antonio Miranda Ferreira (UFMG)

Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (UFMG)

Prof. Gabriel Silva Marques Borges (UFVJM)

Dr. Leonardo de Souza Teixeira (ICF)

Belo Horizonte, 04 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 04/10/2024, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Coordenador(a)**, em 04/10/2024, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 04/10/2024, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antonio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 04/10/2024, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Silva Marques Borges, Usuário Externo**, em 04/10/2024, às 21:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Renata Barbosa de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 07/10/2024, às 23:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo de Souza Teixeira, Usuário Externo**, em 17/10/2024, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3560034** e o código CRC **CA98D3FE**.

---

“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas dê o primeiro passo.”

***Martin Luther King***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida e pelo direcionamento do caminho a ser seguido.

Ao meu marido Samuel e a meu filho André pela compreensão da correria do dia-a-dia, dos momentos de ausência e ainda mais por me darem apoio incondicional e por me fazerem acreditar que posso mais do que imagino.

Aos meus pais, Ocrídio e Marilurde, pelo exemplo de força e por nunca medirem esforços para me socorrerem quando precisei.

À professora Isabela, minha doce orientadora, por todo ensinamento, pelos aconselhamentos assertivos e pelo estímulo permanente, por toda compreensão e apoio ao longo do trabalho e pelos sorrisos cheios de carinho em todos os momentos.

Às professoras Elaine e Renata, minhas coorientadoras, pelos ensinamentos e pela parceria na execução deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios, LCQ, LQF CEDAFAR, LTF e de Micologia do ICB, pelo convívio, pelos conhecimentos compartilhados e por toda ajuda.

Aos professores Renes de Resende Machado, José Eduardo Gonçalves, Daniel de Assis Santos e Lucas Antônio Miranda Ferreira por estarem sempre dispostos a ajudar e colaborar.

A todos que contribuíram para este trabalho, dando apoio emocional ou mesmo compartilhando análises.

## RESUMO

O 2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol (RN104) destaca-se por sua relevante atividade contra fungos do gênero de *Cryptococcus* e por sua baixa toxicidade. No entanto, a elevada lipofilicidade ( $\log P = 5,84$ ) e a baixa solubilidade aquosa em pH fisiológico limitam sua biodisponibilidade oral. Para superar essas limitações, a nanotecnologia foi explorada com o desenvolvimento de sistemas autoemulsionantes (SEDDS, do inglês *Self Emulsifying Drug Delivery System*) e dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) para veiculação do RN104. Um método analítico por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado para a quantificação do RN104 nas formulações. A solubilidade do composto foi avaliada em diferentes excipientes para o desenvolvimento do SEDDS e do CLN. Dentre as formulações desenvolvidas, o SEDDS apresentou superioridade em termos de capacidade de carga do ativo (10 mg/mL), estabilidade (60 dias) e facilidade de preparo e escalonamento, em relação ao CLN (1,5 mg/mL; 45 dias). A otimização do SEDDS-RN104, utilizando um planejamento experimental composto central com metodologia de resposta (CCD-RSM), resultou em uma formulação com tamanho de partícula de  $118,4 \pm 0,7$  nm e eficiência de encapsulação de  $99,4 \pm 0,1\%$ . SEDDS-RN104 contendo palmitato de ascorbila (0,1% p/p) como antioxidante apresentou estabilidade à temperatura ambiente por 6 meses. Em um estudo farmacocinético realizado em camundongos, SEDDS-RN104 administrado *per os* levou a um aumento de 21 vezes na  $AUC_{0-t}$  do RN104 em comparação com o fármaco livre. *In vivo*, a formulação demonstrou maior eficácia em camundongos C57BL/6 (n=6 por grupo), com uma curva de sobrevivência superior em comparação a outros tratamentos. Isso pode ser atribuído ao perfil farmacocinético aprimorado, incluindo aumento do  $T_{1/2}$ , redução do *clearance* e elevação significativa do  $C_{max}$ . Esses resultados evidenciam que a incorporação do RN104 no SEDDS superou as limitações farmacocinéticas do composto, resultando em um ganho na eficácia terapêutica, sendo uma alternativa promissora ao tratamento de infecções fúngicas.

Palavras-chave: biodisponibilidade oral, antifúngico, nanopartículas, SEDDS, CLN.

## ABSTRACT

The 2-[2-(cyclohexylmethylene)hydrazinyl]-4-phenylthiazole (RN104) exhibits significant antifungal activity against *Cryptococcus* species and low toxicity. However, its high lipophilicity ( $\log P = 5.84$ ) and poor aqueous solubility at physiological pH limit its oral bioavailability. To address these limitations, nanotechnology was employed through the development of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) and nanostructured lipid carriers (NLC) for RN104 delivery. An HPLC-DAD analytical method was developed and validated for the quantification of RN104 in the formulations. Solubility studies in various excipients were conducted to design effective SEDDS and NLCs. Among the formulations, SEDDS demonstrated superior drug-loading capacity (10 mg/mL), stability (60 days), and ease of preparation and scale-up compared to NLC (1.5 mg/mL; 45 days). Optimization of the SEDDS-RN104 formulation using central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) resulted in a particle size of  $118.4 \pm 0.7$  nm and an encapsulation efficiency of  $99.4 \pm 0.1\%$ . The SEDDS-RN104 formulation containing ascorbyl palmitate (0.1% w/w) as antioxidant was stable at room temperature for 6 months. In a pharmacokinetic study performed in mice, SEDDS-RN104 administered per os lead to a 21-fold increase in  $AUC_{0-t}$  of RN104, compared to free drug. *In vivo*, SEDDS-RN104 showed enhanced antifungal efficacy in C57BL/6 mice ( $n = 6$ ), with a survival curve superior to other treatments. These findings may be related to the improved pharmacokinetic parameters, including increased  $T_{1/2}$ , reduced clearance, and significantly elevated  $C_{max}$ . These results demonstrate that the incorporation of RN104 into SEDDS overcomes its pharmacokinetic limitations, leading to a substantial enhancement in therapeutic efficacy, being a promising alternative to the treatment of fungal infections.

Keywords: oral bioavailability, antifungal, nanoparticles, SEDDS, NLC.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do RN104 (2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol) .....	26
Figura 2 - Resultados obtidos a partir da avaliação da toxicidade do RN104 em eritrócitos humanos .....	27
Figura 3 - Diagrama de solubilidade de RN104 incluso em 2-HP- $\beta$ -CD por meio da técnica de malaxagem .....	28
Figura 4 - Curvas de concentração plasmática (ng/mL) <i>versus</i> tempo (horas) para as três administrações de RN104 .....	29
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo que ocorre durante a adição de água no SEDDS .....	31
Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes caminhos de absorção & gotículas liberadas por SEDDS .....	34
Figura 7 - Diagrama de fase pseudoternário de SEDDS .....	37
Figura 8 - Fluxograma da metodologia usual de preparo de SEDDS .....	37
Figura 9 - Desenho esquemático dos tipos de CLN .....	39
Figura 10 - Mecanismos de absorção de fármacos pouco permeáveis incorporados a CLN .....	41
Figura 11 - Rota de síntese utilizada na obtenção do RN104 .....	50
Figura 12 - Representação esquemática da preparação de CLN .....	60
Figura 13 - Cromatograma obtido a partir de solução de RN104 a 100 $\mu$ g/mL, com fase móvel ACN: H <sub>2</sub> O (85: 15), fluxo de 1,0 mL/min, 20 $\mu$ L de injeção, com detecção de DAD a 240 nm .....	63
Figura 14 - Cromatograma obtido para RN104; a 5 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ L injetados utilizando uma coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, 95 Å) Agilent® a 40 °C e fase móvel composta ACN 0,5% HCl 0,1 M : H <sub>2</sub> O (90: 10) com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 240 nm. 63	63
Figura 15 - Cromatogramas obtidos a partir da análise de seletividade .....	64
Figura 16 - Curva analítica obtida por CLAE-DAD para RN104 na faixa de concentração de 5 a 130 $\mu$ g/mL .....	65
Figura 17 - Distribuição dos resíduos das curvas analíticas .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados sobre a variável resposta % do RN104 .....	70
Figura 19 - Solubilidade máxima do RN104 em diferentes constituintes do SEDDS ...	71
Figura 20 - Imagem representativa das formulações SEDDS-brancas .....	73
Figura 21 - Imagem representativa das formulações SEDDS-RN104 imediatamente após o preparo .....	75
Figura 22 - Imagem representativa das formulações SEDDS-RN104 após 60 dias de preparo .....	78
Figura 23 - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade CLN F1-RN104 ...	80
Figura 24 - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade CLN F2-RN104 ..	80
Figura 25 - Imagem representativa da formulação CLN F2-RN104 após 60 dias do preparo .....	82
Figura 26 - Solubilidade do RN104 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em diferentes meios aceptores .....	91
Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta e o contorno correspondente mostrando a influência da porcentagem de óleo e da proporção entre emulsificante e coemulsificante no tamanho das partículas (A e B) e carga de RN104 (C e D).....	93
Figura 28 - Reação de oxidação do palmitato de ascorbila.....	94
Figura 29 - Estabilidade do SEDDS-RN104 com diferentes concentrações de PA: E1 (0,00%), E2 (0,02%), E3 (0,04%), E4 (0,08%) e E5 (0,10%), ao longo de 6 meses. (A) Tamanho médio de partícula (nm); (B) Índice de Polidispersidade (PDI), (C) Potencial Zeta (mV) e (D) % RN104. Os dados foram expressos pela média ( $n = 3$ ) $\pm$ desvio padrão (DP).....	95
Figura 30 - Intervalos de confiança calculados após ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (A) Diferença entre médias dos grupos durante os 6 meses; (B) diferença entre as médias dos grupos no momento específico de 6 meses.....	96
Figura 31 - Intervalos de confiança calculados após ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (A) Diferença entre médias de grupos para % RN104; (B) diferença entre médias de grupos para PDI; (C) diferença entre médias dos grupos para ZP.....	97
Figura 32 - Imagem representativa das formulações E1 <i>versus</i> E5 após 45 dias do preparo quando já se nota diferenciação de coloração entre elas.....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 33 - Gráfico de solubilidade do RN104 ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes meios aceptores.....	99
Figura. 34 - Liberação acumulativa do RN104 (%) para formulação SEDDS e para o ativo livre.....	99
Figura 35 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada para visualização de cristais do RN104 após diluição em água (1:200). (A) RN104 livre (10 mg/mL); (B) PA livre (0,1% p/p); (C) SEDDS-RN104 (10 mg/mL), (D) SEDDS-branco.....	101
Figura 36 - Análise por microscopia eletrônica de SEDDS-RN104 disperso em água ultrapura (1:200).....	102
Figura 37 - Cromatogramas CLAE-EM/EM de plasma branco enriquecido com RN104 (7,5 ng/mL) (A) e PI na concentração de trabalho (100 ng/mL) (B).....	110
Figura 38 - Curvas analíticas obtidas para o composto RN104 em dias consecutivos.....	111
Figura 39 - Curvas de concentração plasmática <i>versus</i> tempo para SEDDS-RN104 e RN104 livre após administração <i>per os</i> em camundongos (média $\pm$ desvio padrão, n = 4).....	115
Figura 40 - Esquema da conversão de MTT em cristais de formazan pela enzima redutase mitocondrial.....	125
Figura 41 - Gráfico de viabilidade celular (%) em relação às diferentes concentrações testadas de SEDDS-RN104 e de RN104 livre.....	126
Figura 42 - Gráfico Box-plot para viabilidade celular (%) dos diferentes tratamentos avaliados.....	127
Figura 43 - Curvas de Kaplan-Meier para os tratamentos administrados pelas vias <i>per os</i> (A) e intraperitoneal (B) .....	128
Figura 44 - Média da variação no peso dos animais de cada grupo experimental tratado por via intraperitoneal (A) e <i>per os</i> (B).....	131
Figura 45 - Determinação de UFC/g no cérebro (A) e UFC/g no pulmão (B) após 10 dias de infecção intratraqueal com $1 \times 10^5$ células de <i>C. neoformans</i> H99 e tratamento diário.....	132
Figura 46 - Secções histopatológicas de pulmão dos grupos experimentais.....	134
Figura 47- Secções histopatológicas de cérebros dos grupos experimentais.....	135

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de classificação de formulações lipídicas a partir da composição e concentração dos excipientes .....	33
Tabela 2 - Produtos comerciais – SEDDS .....	38
Tabela 3 - Diferentes tipos de CLN .....	39
Tabela 4 - Estudos publicados em que CLN aumenta a biodisponibilidade oral do fármaco .....	44
Tabela 5 - Preparo das soluções da curva analítica de RN104 para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE-DAD .....	52
Tabela 6 - Soluções preparadas para a avaliação da exatidão do método analítico .....	53
Tabela 7 - Parâmetros avaliados no teste de robustez do método analítico .....	53
Tabela 8 - Matriz de planejamento do Teste de Youden .....	54
Tabela 9 - Primeira etapa de variações na concentração dos excipientes do SEDDS .....	55
Tabela 10 - Segunda etapa de variações na composição dos excipientes do SEDDS .....	56
Tabela 11 - Terceira etapa de variações na composição dos excipientes do SEDDS .....	57
Tabela 12 - Composição do SEDDS isotrópicos .....	58
Tabela 13 - Composição dos CLN .....	60
Tabela 14 - Resultados dos testes estatísticos para avaliação das premissas básicas para a linearidade .....	66
Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) para avaliação da significância da regressão e do desvio da linearidade .....	67
Tabela 16 - Resultados de precisão para o método analítico por CLAE-DAD .....	68
Tabela 17 - Resultados de exatidão para o método analítico por CLAE-DAD .....	69
Tabela 18 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após a dispersão (1:200) dos SEDDS brancos F1, F2 e F3 em água ultrapura .....	74
Tabela 19 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após a dispersão (1:200) dos SEDDS-RN104 F1, F2 e F3 em água ultrapura .....	75
Tabela 20 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após dispersão (1: 200) dos SEDDS-RN104 F1, F2 e F3 em diferentes meios simulados .....	76
Tabela 21 - Teor do RN104 no SEDDS-RN104 antes da dispersão .....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 22 - Parâmetros físico-químicos CLN brancos (1: 100) .....	78
Tabela 23 - Parâmetros físico-químicos CLN-RN104 (1: 100) .....	79
Tabela 24 - Parâmetros físico-químicos CLN-RN104 (1: 100) no estudo de estabilidade .....	81
Tabela 25 - Cronograma de atividades para conclusão do doutorado .....	88
Tabela 26 - Estabilidade de E1 SEDDS-RN104.....	94
Tabela 27 - % RN104 nas formulações ao longo de seis meses (média ± desvio; n=3).....	97
Tabela 28 - Robustez de diluição para SEDDS-RN104 (10 mg/mL) em diferentes meio (n = 3).....	100
Tabela 29 - Precisão intracorrída e intercorrída (CV,%) e exatidão (%) para RN104.....	110
Tabela 30 - FMN calculados a partir dos testes de efeito matriz.....	113
Tabela 31 - Taxas de recuperação (%) obtidas para RN104 e PI.....	113
Tabela 32 - Resultados obtidos na avaliação da estabilidade do RN104 em plasma de camundongo.....	114
Tabela 33 - Parâmetros farmacocinéticos após administração <i>per os</i> de SEDDS-RN104 e RN104 livre em camundongos.....	116
Tabela 34 - Tempos (d.p.i) de sobrevida dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	129

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\sigma$	Desvio padrão da resposta na curva analítica
°C	Graus Celsius
$\alpha$	Nível de significância
$\alpha$ -CD	Alfa-ciclodextrina
$\beta$ -CD	Beta-ciclodextrina
$\gamma$ -CD	Gama-ciclodextrina
2-HP- $\beta$ -CD	2-Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina
ACN	Acetonitrila
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação dos Químicos Analíticos Oficiais)
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ASC	Área sob a curva
BD	Biodisponibilidade
BHE	Barreira Hematoencefálica
CCD-RSM	<i>Central Composite Design approach-based Response Surface Methodology</i> (Composto Central com Metodologia de superfície de Resposta)
CD	Ciclodextrina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
CONCEA	Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico da Luz)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Continuação)

d.p.i	Dias após infecção
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria Diferencial Exploratória)
EE	Eficiência de Encapsulação
EHL	Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico
EM	Espectrometria de massas
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fase Aquosa
FM	Fase Móvel
FMN	Fator Matricial Normalizado
FO	Fase Oleosa
FT	Fontana-Masson
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPH	<i>High Pressure Homogenization</i> (Homogeneização de Alta Pressão)
HR	<i>Hazard ratio</i> (Razão da Taxa de Risco)
IP	Intraperitoneal
i.p	Intraperitoneal
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
LD	Limite de detecção
LFCS	<i>Lipid Formulation Classification System</i> (Classificação de Formulações Lipídicas)
LQ	Limite de Quantificação
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos-1)
MRM	<i>Multiple Reactions Monitoring</i> (Método de Monitoramento de Reações Múltiplas)
MSG	Meio Simulado Gástrico
MSI	Meio Simulado Intestinal

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Continuação)

MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
PA	Palmitato de ascorbila
PDI	<i>Polydispersity index</i> (Índice de Polidispersão)
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
PZ	Potencial Zeta
QLM	Quilomícrons
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN104	2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SEDDS	<i>Self Emulsifying Drug Delivery System</i> (Sistema autoemulsionável)
SMEDDS	<i>Self Microemulsifying Drug Delivery System</i>
SNEDDS	<i>Self Nanoemulsifying Drug Delivery System</i>
SQR	Substância Química de Referência
TCL	Triglicerídeo de Cadeia Longa
TCM	Triglicerídeo de Cadeia Média
TE	Teor de Encapsulação
Te	Tempo de emulsificação
TG	Termogravimetria
TGI	Trato Gastrointestinal
t <sub>max</sub>	Tempo da Concentração Plasmática Máxima
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral-Alfa)
Tr	Tempo de retenção
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida
UFC	Unidade Formadora de Colônia
$\chi^2$	Distribuição qui-quadrado do teste de <i>logrank</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
<b>2.1 A criptococose</b> .....	24
<b>2.2 Derivado tiazolilhidrazona RN104</b> .....	26
<b>2.3 Nanoformulações na melhoria da biodisponibilidade oral</b> .....	30
<b>2.3.1 SEDDS</b> .....	31
<b>2.3.2 CLN</b> .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	46
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	46
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	46
 <b>CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	48
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	48
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	48
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3.1 Materiais</b> .....	48
<b>3.1.1 Solventes e reagente</b> .....	48
<b>3.1.2 Equipamentos e acessórios</b> .....	49
<b>3.2 Métodos</b> .....	50
<b>3.2.1 Síntese do composto RN104</b> .....	50
<b>3.2.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de RN104 nas formulações</b> .....	51
<b>3.2.3 Solubilidade do RN104 em diferentes excipientes</b> .....	54

<i>3.2.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações</i> .....	55
<i>3.2.4.1 SEDDS</i> .....	55
<i>3.2.4.2 CLN</i> .....	59
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>4.1 Síntese do composto RN104</b> .....	62
<b>4.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de RN104 nas formulações</b> .....	62
<b>4.3 Solubilidade do RN104 em diferentes excipientes</b> .....	71
<b>4.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações</b> .....	71
<i>4.4.1 SEDDS</i> .....	71
<i>4.4.2 CLN</i> .....	78
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	83
<b>CAPÍTULO II - OTIMIZAÇÃO DE SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL CONTENDO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	85
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	85
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	85
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	86
<b>3.1 Materiais</b> .....	86
<i>3.1.1 Solventes e reagentes</i> .....	86
<i>3.1.2 Equipamentos e acessórios</i> .....	86
<b>3.2 Métodos</b> .....	87
<i>3.2.1 Diagramas de fase pseudoternários</i> .....	87
<i>3.2.2 Otimização do SEDDS utilizando CCD-RSM</i> .....	87
<i>3.2.3 Estudo de estabilidade SEDDS-RN104</i> .....	88

3.2.4 <i>Estudo de liberação in vitro do RN104</i> .....	89
3.2.5 <i>Avaliação do efeito da diluição no SEDDS-RN104</i> .....	89
3.2.6 <i>Microscopia de luz polarizada</i> .....	89
3.2.7 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> .....	90
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	90
4.1 <b>Diagramas de fase pseudoternários</b> .....	90
4.2 <b>Otimização do SEDDS utilizando CCD-RSM</b> .....	91
4.3 <b>Estudo de estabilidade SEDDS-RN104</b> .....	93
4.4 <b>Estudo de liberação in vitro do RN104</b> .....	98
4.5 <b>Avaliação do efeito da diluição no SEDDS-RN104</b> .....	100
4.6 <b>Microscopia de luz polarizada</b> .....	101
4.7 <b>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	101
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	102

**CAPÍTULO III AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO ORAL DO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104 INCORPORADO EM SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	104
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	104
2.1 <b>Objetivo geral</b> .....	104
2.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	104
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	104
3.1 <b>Materiais</b> .....	104
3.1.1 <i>Solventes e reagentes</i> .....	104
3.1.2 <i>Equipamentos e acessórios</i> .....	105
3.2 <b>Métodos</b> .....	105

<b>3.2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de RN104 em plasma de camundongos</b> .....	105
3.2.1.1 <i>Parâmetros CLAE-EM/EM</i> .....	105
3.2.1.2 <i>Preparo dos pontos da curva de calibração e controle de qualidade</i> .....	106
3.2.1.3 <i>Preparo da amostra</i> .....	106
3.2.1.4 <i>Validação do método</i> .....	106
<b>3.2.2 Estudo farmacocinético</b> .....	108
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	109
<b>4.1 Parâmetros CLAE-EM/EM</b> .....	109
<b>4.2 Preparo da amostra</b> .....	110
<b>4.3 Validação do método</b> .....	110
<b>4.4 Estudo farmacocinético</b> .....	114
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	118

**CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E DA CITOTOXICIDADE DO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104 INCORPORADO EM SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	120
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	120
2.1 <b>Objetivo geral</b> .....	120
2.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	120
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	120
<b>3.1 Materiais</b> .....	120
3.1.1 <i>Solventes e reagentes</i> .....	120
3.1.2 <i>Equipamentos e acessórios</i> .....	121
<b>3.2 Métodos</b> .....	121

<i>3.2.1 Estudo para avaliação da citotoxicidade da formulação autoemulsionável contendo RN104 em comparação ao ativo livre em modelo de células Caco-2</i> .....	121
<i>3.2.2 Estudo para avaliação da atividade antifúngica em modelo murino de infecção por C. neoformans</i> .....	122
<i>3.3.2.1 Curva de sobrevida</i> .....	122
<i>3.3.2.2 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e avaliação histológica pulmonar e cerebral</i> .....	123
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	124
<b>4.1 Estudo para avaliação da citotoxicidade da formulação autoemulsionável contendo RN104 em comparação ao ativo livre em modelo de células Caco-2</b> .....	124
<b>4.2 Estudos para avaliação da atividade antifúngica em modelo murino de infecção por C. neoformans</b> .....	127
<i>4.2.1 Curva de sobrevida</i> .....	127
<i>4.2.2 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e avaliação histológica pulmonar e cerebral</i> .....	132
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	136
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	137
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	138
<b>ANEXOS</b> .....	152

## 1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção importante em pacientes imunocomprometidos e também em imunocompetentes. Embora o fungo do gênero *Cryptococcus* seja reconhecido, principalmente, por sua capacidade de causar meningoencefalite, pode também infectar diferentes órgãos do corpo humano, sendo a infecção pulmonar a segunda manifestação mais comum da doença. Duas espécies de leveduras, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos desta doença, e apesar de compartilharem muitas semelhanças, diferem na distribuição geográfica, epidemiologia e manifestações clínicas (GUSHIKEN *et al.*, 2021; HENAO-MARTÍNEZ *et al.*, 2018).

O tratamento antifúngico depende da forma clínica da criptococose e do estado imunológico do paciente. O arsenal terapêutico disponível é limitado, além da alta taxa de atendimentos de recorrência devido ao aumento de cepas resistentes (SPADARI *et al.*, 2020). Assim, faz-se necessário o investimento em pesquisa para a descoberta de novos fármacos capazes de combater essa doença.

Nesse contexto, o derivado tiazolilhidrazona, 2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol (RN104), destaca-se pela relevante atividade contra os fungos do gênero *Cryptococcus* e baixa toxicidade (SÁ *et al.*, 2015; TONHOLO *et al.*, 2020). O RN104 é um composto altamente lipofílico ( $\log P = 5,84$ ) apresentando baixa solubilidade aquosa no pH fisiológico, o que impacta negativamente na sua biodisponibilidade (BD) oral (SILVA *et al.*, 2020).

No entanto, a nanotecnologia é uma estratégia de desenvolvimento de formulações bastante promissora, especialmente para compostos potentes cujo desenvolvimento pré-clínico falhou devido às suas propriedades biofarmacêuticas inadequadas (SHARMA *et al.*, 2016).

Dentre as nanoformulações capazes de melhorar a BD oral de fármacos estão os sistemas autoemulsionáveis (SEDDS - *self emulsifying drug delivery system*) (PATHAK & RAGHUVANSHI, 2015; MISHRA *et al.*, 2020; SALAWI, 2022).

SEDDS são misturas isotrópicas de fármaco, óleo e emulsificante, geralmente, com um ou mais co-solventes/ coemulsificantes hidrofílicos, que na presença de uma fase aquosa, formam, sob suave agitação, uma nanoemulsão óleo/água (SINGH *et al.*, 2009). Essa propriedade de autoemulsificação torna o fármaco disponível no estômago como

gotículas de óleo em nanoescala fornecendo assim, uma grande área superficial e melhorando sua dissolução no trato gastrointestinal (TGI) (KARWAL *et al.*, 2016).

Assim, o desenvolvimento dessas nanoformulações capazes de melhorar a BD do RN104, quando administrado por via oral, é de grande importância no processo de consolidação do composto como candidato a fármaco antifúngico, bem como a avaliação das características biofarmacêuticas da formulação, de sua farmacocinética e atividades *in vitro* e *in vivo*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A criptococose

As infecções fúngicas invasivas e graves vêm crescendo no mundo. Tal incidência pode estar relacionada ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos como os transplantados, oncológicos, em tratamento para artrite reumatoide severa ou pessoas que vivem com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (SULEYMAN & ALANGADEN, 2016). No ambiente hospitalar, embora as infecções bacterianas graves sejam mais frequentes, as infecções fúngicas tem maior mortalidade (GARBEE *et al.*, 2017).

A criptococose é uma infecção fúngica invasiva de importância global causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*. A prevalência do HIV em certas áreas do mundo, bem como a população em expansão de pacientes imunocomprometidos, são fatores que contribuem para a contínua carga global da doença (GUSHIKEN *et al.*, 2021).

A infecção por *C. neoformans* é a mais comum e tende a afetar principalmente hospedeiros imunocomprometidos (principalmente pessoas que vivem com o vírus HIV) causando meningoencefalite, enquanto as infecções por *C. gattii* afetam mais hospedeiros imunocompetentes, causando predominantemente uma infecção pulmonar. Geralmente, ela se inicia pela inalação de basidiósporos ambientais que se depositam nos alvéolos pulmonares (FIRACATIVE *et al.*, 2018; QU & LV, 2022; CHEN *et al.*, 2022).

Entre os imunocompetentes, os macrófagos alveolares induzem uma resposta de células T auxiliares tipo 1, resultando na formação de granuloma podendo ser combatida pelo sistema imunológico do hospedeiro ou ainda persistir de forma latente dentro de granulomas e macrófagos (GUSHIKEN *et al.*, 2021). Após a deposição dos criptococos nos alvéolos, ocorre a fagocitose pelos macrófagos e células dendríticas, mas diferentes fatores de virulência auxiliam na patogênese como: formação de cápsula polissacarídica, crescimento a 37 °C, produção de melanina, manitol e de enzimas hidrolíticas (MOMIN & WEBB, 2021; RATHORE *et al.*, 2022). *C. neoformans* produz melanina e manitol que protegem o fungo do estresse oxidativo e a urease neutraliza o meio ácido do fagossoma permitindo a exocitose não lítica. O fungo pode ainda escapar dos fagócitos induzindo a fusão das membranas fagossômicas com a membrana

plasmática em um processo chamado extrusão. A capacidade dos criptococos de sobreviver dentro de um fagossoma sem se destruir permite que usem os macrófagos para evadir o sistema imune do hospedeiro (ZARAGOZA, 2019; RATHORE *et al.*, 2022).

Sabe-se que esse fungo tem tropismo pelo cérebro e a identificação dos mecanismos que levam a isso tem sido uma prioridade na pesquisa criptocócica. Três diferentes modos de invasão e disseminação foram propostos, sendo um deles que o fungo poderia se ligar a porção luminal da barreira-hematoencefálica (BHE) e ser endocitado pelas células endoteliais. O segundo mecanismo envolve um dano nas junções de oclusão da BHE e passagem paracelular do fungo. O terceiro estaria relacionado à capacidade de *C. neoformans* de sobreviver em células fagocitárias, sendo não apenas uma forma de evasão ao sistema imune do hospedeiro, mas também uma forma de disseminação pelo organismo dentro de células fagocíticas infectadas, funcionando como um “cavalo de Tróia”. A migração do “cavalo de Tróia” é potencializada por alguns mediadores como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1), IFN- $\gamma$  (interferon-gama) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa) (TSENG *et al.*, 2015; SANTIAGO-TIRADO *et al.*, 2017; ZARAGOZA, 2019).

Embora existam poucos dados sobre a incidência e prevalência de criptococose na América Latina, estudos do Brasil e da Colômbia relataram uma incidência média anual de 2,4 a 4,5 casos de meningite criptocócica por milhão de habitantes, na população geral, e 3.000 a 3.300 casos por milhão de pessoas que vivem com HIV. Em relatórios da Argentina, Colômbia, Guatemala, México e Venezuela, a criptococose tem uma prevalência de 10 a 76% entre os casos de micose mais frequente e a mortalidade varia entre 30 a 60% dos casos. No Brasil, dados apontam uma taxa de mortalidade de 73%, porcentagem equiparada a da África-Subsaariana, região de maior incidência da doença. Juntos, esses dados mostram que a criptococose ainda é uma importante ameaça à saúde (LIMPER *et al.*, 2017; FIRACATIVE *et al.*, 2021). A meningite criptocócica é a causa de 15% de todas as mortes relacionadas ao HIV no mundo (WHO, 2022).

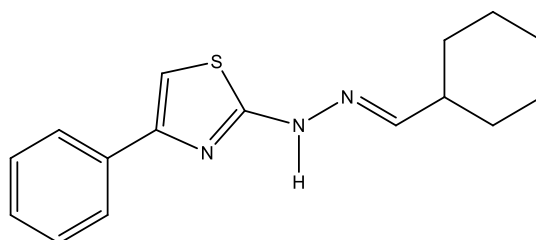
O tratamento da criptococose depende da sua forma clínica e do estado imunológico do paciente. O atual arsenal antifúngico disponível é limitado a três fármacos, usados isoladamente ou em combinação: anfotericina B, flucitosina (5-fluorocitosina ou 5-FC) e fluconazol. Além das limitações farmacoterapêuticas, as altas taxas de recorrência e o surgimento de cepas resistentes reforçam a necessidade do investimento em pesquisa para a descoberta de novos fármacos capazes de combater

essa doença (MOURAD & PERFECT *et al.*, 2018; SPADARI *et al.*, 2020; NGAN *et al.*, 2022).

## 2.2. Derivado tiazolilhidrazona RN104

Nosso grupo de pesquisa sintetizou uma série de compostos heterociclos da classe das tiazolilhidrazonas e dentre esses, 2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol (RN104) (Figura 1), se destacou por apresentar atividade antifúngica potente contra *C. neoformans* e *C. gattii* (CIM = 0,9  $\mu\text{M}$  contra ambos os fungos), sendo mais ativo do que fluconazol utilizado como controle positivo (CIM = 3,2  $\mu\text{M}$  para *C. neoformans* e CIM = 7,8  $\mu\text{M}$  para *C. gattii*) (SÁ *et al.*, 2015; SÁ, 2017). Uma patente intitulada “Compostos heterocíclicos tiazólico, composições farmacêuticas e uso”, relacionada à atividade antifúngica dessa classe, incluindo o RN104, foi depositada no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), com o número de protocolo BR 10 2013 033880-0.

Figura 1 - Estrutura química do RN104 (2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol)



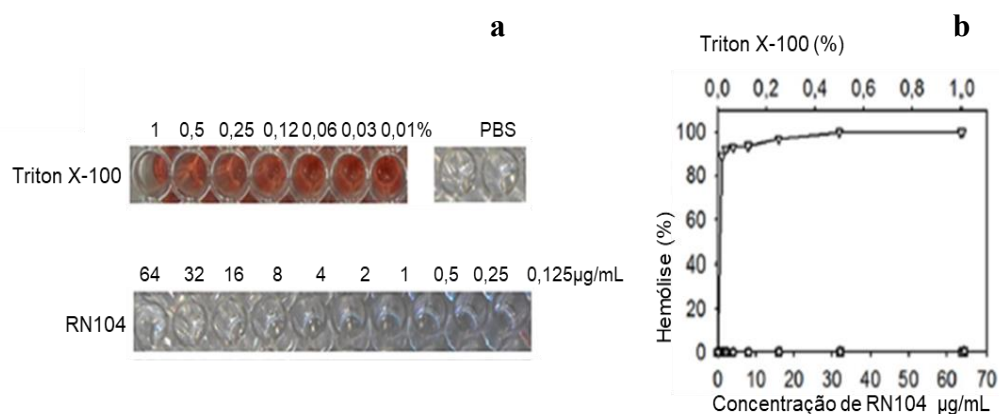
Fonte: Desenhada pelo autor adaptado de SÁ *et al.*, 2015.

A citotoxicidade do RN104 foi testada em modelo de células VERO, que são oriundas de rim de macaco-verde africano, e também em macrófagos peritoneais de ratos. Em ambos os testes, o RN104 não comprometeu a viabilidade celular nas concentrações empregadas (0,0128 a 100  $\mu\text{M}$ ). (SÁ *et al.*, 2015). Além disso, o RN104 não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos humanos conforme os resultados demonstrados na Figura 2 (SÁ *et al.*, 2017).

A avaliação da toxicidade pré-clínica desse composto demonstrou um baixo perfil citotóxico nas linhagens celulares testadas: pulmão humano (A549), coração de

rato (H9C2), fígado humano (HepG2), rim suíno (LLC-PK1) e cérebro de camundongo (NEURO-2).

Figura 2 - Resultados obtidos a partir da avaliação da toxicidade do RN104 em eritrócitos humanos. **a** - Foto mostrando os poços com hemólise total causada pelo tratamento com Triton X-100 (controle positivo) e ausência de hemólise após tratamento com RN104; **b** – Porcentagens de hemólise dos eritrócitos humanos tratados com RN104 e Triton X-100



Fonte: Adaptado de SÁ *et al.*, 2017.

Além disso, o composto se mostrou seguro em estudos de toxicidade aguda em camundongos, de acordo com as diretrizes do guia OECD-423 (TONHOLO *et al.*, 2020).

Para avaliar o potencial antifúngico do RN104, realizaram-se estudos *in vitro* e *in vivo* da capacidade de sua interferência em alguns fatores de virulência de cepas de *Cryptococcus* como a formação de biofilme e de cápsula (SÁ, 2017; DE LIMA *et al.*, 2018).

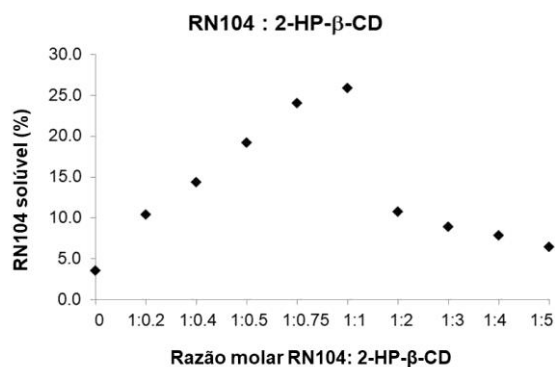
Quando o RN104 foi testado *in vitro*, após 48 h, observou-se um aumento no tamanho das cápsulas de *C. gattii*, porém nenhuma alteração ocorreu nas leveduras de *C. neoformans*. Além disso, a ação antifúngica em biofilmes demonstrou uma redução de sua massa da ordem de 45 a 52% para ambas as espécies (SÁ, 2017). Em um dos estudos *in vivo*, avaliou-se a sobrevivência em modelo de invertebrado de larva *Galleria mellonella* infectada com as espécies de *Cryptococcus*. Observou-se que o composto não apresentou toxicidade contra as larvas sadias e que promoveu um aumento na sobrevivência de larvas infectadas quando administrado nas doses de 5 e 10 mg/Kg (SÁ, 2017).

Estudos preliminares indicaram que o mecanismo de ação do RN104 pode estar relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos fungos (SÁ *et al.*, 2017). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidação mais detalhada do seu mecanismo ação.

Quando testado em modelo murino de criptococose causada por *C. gatti*, o tempo de sobrevivência foi de 37 dias para os animais tratados com o RN104, enquanto para os animais sem tratamento foi de 22 dias. Além disso, houve uma redução na carga fúngica pulmonar após o tratamento por 15 dias com esse composto e após análise histológica dos pulmões, observaram-se áreas com parênquima mais preservado em relação ao controle não tratado (NT). Nesse estudo, os animais foram tratados diariamente por via intraperitoneal (i.p.) durante 15 dias com doses de 10 e 50 mg/Kg/dia. O fluconazol foi utilizado como controle positivo e não houve diferença significativa entre ele e o RN104 nesses testes (SÁ *et al.*, 2018).

A alta lipofilia ( $\log P = 5,84$ ) e, conseqüentemente, baixa solubilidade aquosa do RN104 pode impactar na sua BD oral, uma vez que a dificuldade de dissolução pode estar relacionada a uma diminuição da absorção (PATRICK, 2009). Na tentativa de aumentar a solubilidade aquosa do composto, foi proposta a formação de um complexo de inclusão entre o RN104 e três diferentes ciclodextrinas:  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (2-HP- $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD). Utilizando-se a técnica de malaxagem, a inclusão em 2-HP- $\beta$ -CD na razão molar de 1:1 promoveu o maior incremento na solubilidade do RN104 (25,88%). O diagrama de solubilidade obtido a partir desse procedimento é mostrado na Figura 3 (SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2021).

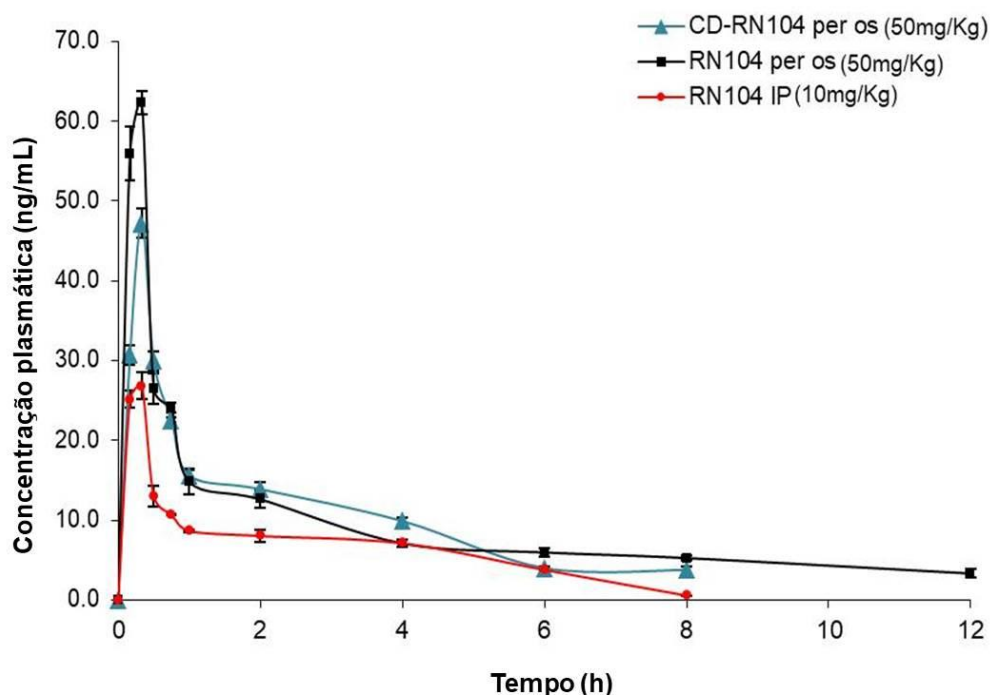
Figura 3 - Diagrama de solubilidade de RN104 incluído em 2-HP- $\beta$ -CD por meio da técnica de malaxagem



Fonte: Dados da pesquisa (SILVA, 2019).

A partir do melhor incremento de solubilidade, preparou-se um líofilo com equivalência igual a 68,2  $\mu\text{g}$  de RN104 para cada mg de líofilo. A formação do complexo de inclusão foi comprovada por meio de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG e DTG). Em seguida, avaliou-se, em camundongos Swiss fêmeas, a farmacocinética do RN104 livre (*per os* na dose de 50 mg/Kg e i.p. na dose de 10 mg/Kg) e complexado com CD (*per os* na dose de 50 mg/Kg), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (81/2018). As curvas de concentração plasmática *versus* tempo para cada administração estão representadas na Figura 4 (SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2021).

Figura 4 - Curvas de concentração plasmática (ng/mL) *versus* tempo (horas) para as três administrações de RN104



Fonte: Dados da pesquisa (SILVA, 2019).

Para todas as administrações, o  $t_{\max}$  foi 20 minutos, indicando uma rápida absorção. Ao comparar as concentrações plasmáticas máximas obtidas a partir das doses administradas *per os* (50 mg/Kg), o RN104 livre apresentou maior valor (62,35 ng/mL) quando comparado ao complexo RN104-CD (47,23 ng/mL). Além disso, RN104 livre administrado *per os* apresentou maior área sob a curva (ASC) (ASC = 108,02 ng.h/mL) do que o composto complexado (ASC = 86,80 ng.h/mL), portanto maior BD *per os*.

Dessa forma, o incremento na solubilidade aquosa obtido pela complexação com CD não impactou de forma significativa no aumento da BD do RN104. Já quando a administração foi feita por via i.p. (10 mg/Kg), a  $C_{max}$  foi de 26,83 ng/mL para uma dose cinco vezes menor comparada à administração *per os* (SILVA, 2019).

Ao avaliar a dose administrada a cada camundongo em relação à quantidade do composto que efetivamente alcançou a circulação sistêmica, evidenciada pelas concentrações plasmáticas obtidas, observou-se que uma pequena quantidade do composto foi capaz de atingir a circulação sanguínea do animal, indicando provavelmente uma baixa BD do RN104, principalmente pela via *per os* (SILVA, 2019).

Com base nos resultados obtidos, a complexação de RN104 com CD não se mostrou eficiente para um aumento da BD. Dessa forma, avaliação de alternativas, tal como a incorporação em um sistema nanoestruturado, torna-se de interesse.

### **2.3. Nanoformulações na melhoria da biodisponibilidade oral**

Substâncias pouco solúveis no meio aquoso podem apresentar baixa BD oral, além de padrões erráticos de absorção quando avaliadas no cenário clínico. Dado o número crescente de compostos ativos com problemas de solubilidade (cerca de 40% das novas moléculas), estratégias farmacotécnicas para contornar esse problema são um dos grandes desafios atualmente (LU & PARK, 2013; PATEL & PATEL, 2021).

A nanotecnologia é uma estratégia de desenvolvimento de formulações bastante promissora, especialmente para compostos potentes cujo desenvolvimento pré-clínico falhou devido a suas propriedades biofarmacêuticas inadequadas (SHARMA *et al.*, 2016).

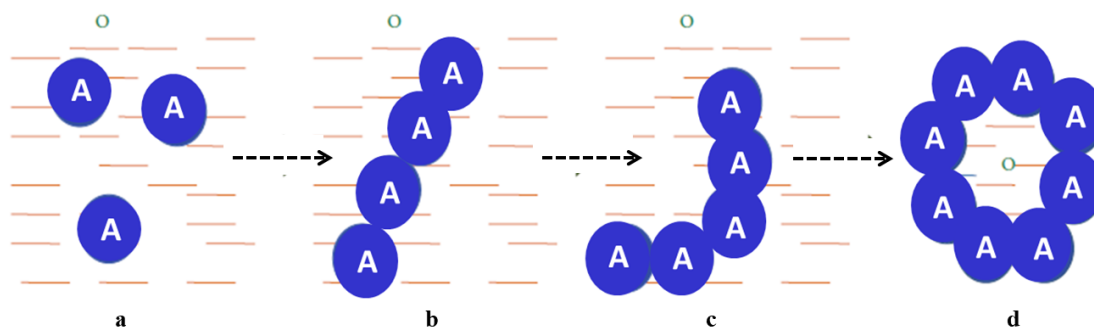
Quando administrados por via oral, a estabilidade dos nanosistemas e sua absorção por enterócitos ou células M dependem do tamanho de partícula, da sua composição e das características de superfície. Além disso, eles oferecem proteção do ativo à degradação no TGI, captação pelo sistema linfático e ainda o benefício da redução da dose administrada (PATHAK & RAGHUVANSHI, 2015; PLAZA-OLIVER *et al.*, 2021).

### 2.3.1. SEDDS

Os sistemas autoemulsionáveis baseados em lipídeos têm atraído grande interesse como uma nova alternativa de liberação de fármacos para melhorar a BD de compostos pouco solúveis em água das classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), além daqueles da classe III, que apresentam baixa permeabilidade. Os compostos das classes II e IV correspondem a mais de 40% das novas entidades químicas candidatas a fármaco. SEDDS também são capazes de promover proteção à degradação no TGI, bem como possibilitar redução na dose a ser administrada (KARWAL *et al.*, 2016; TRAN & PARK, 2021).

SEDDS são definidos como misturas isotrópicas de óleos, surfactante e cossolventes/cossurfactantes, que na presença de fase aquosa, formam uma emulsão óleo/água *in situ* no TGI após administração oral (Figura 5). Isso não ocorre com emulsões tradicionais, que precisam de alto cisalhamento para gerar uma dispersão (GUPTA *et al.*, 2013; PATHAK & RAGHUVANSHI, 2015; KARWAL *et al.*, 2016; SALAWI, 2022).

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo que ocorre durante a adição de água no SEDDS. **a** Estágio de gotas de água (A) em óleo contínuo; **b** cilindros de água em óleo; **c** estruturas lamelares; **d** gotículas de óleo em fase aquosa contínua



Fonte: Adaptado pelo autor de GUPTA *et al.*, 2013, Biorender®.

O mecanismo da autoemulsificação ainda não é totalmente compreendido. Porém, alguns autores sugerem que isso ocorre quando a entropia que favorece a emulsificação excede a energia necessária para aumentar a área superficial de dispersão. Além disso, a energia livre de formação de uma emulsão convencional é uma função direta da energia necessária para criar uma nova superfície entre as duas fases. A facilidade de emulsificação parece estar relacionada à penetração de água nos vários cristais líquidos (CL) formados na superfície da gota. Eventualmente, tudo o que está

próximo à interface será CL, cuja quantidade real dependerá da concentração de surfactante não iônico na mistura binária (GUPTA *et al.*, 2013; PATHAK & RAGHUVANSHI, 2015; UJHELYI *et al.*, 2018).

A terminologia empregada para os SEDDS ainda é confusa, uma vez que sistemas semelhantes algumas vezes são nomeados como SMEDDS (*Self-microemulsifying drug delivery system*) e outras SNEDDS (*Self-nanoemulsifying drug delivery system*) (MÜLLERTZ *et al.*, 2010). O equívoco remonta à primeira publicação referente a um sistema água/ óleo transparente formado espontaneamente relatado por Schulman e seus colaboradores em 1959 (SCHULMAN *et al.*, 1959). Os pesquisadores descreveram um sistema composto por micelas de tamanho aproximado de 200 Å, definido como “fase dispersa de micelas submicroscópicas”. O tamanho de partícula reportado baseou-se em evidências semiquantitativas, uma vez que, na época, não era possível realizar medições diretas devido às limitações instrumentais. A descrição do sistema água/óleo transparente como um “nível submicroscópico” originou o termo “microemulsão”, que passou a ser utilizado para descrever tais sistemas. Desde a publicação deste artigo, o termo “microemulsão” começou a se popularizar para descrever o sistema estável e transparente composto por dois líquidos naturalmente imiscíveis (óleo e água). A controvérsia surgiu devido à discrepância entre o tamanho real do glóbulo do sistema formado e a limitação do prefixo utilizado para descrevê-lo. No decorrer dos anos, o avanço de técnicas analíticas tornou possível medir o tamanho das partículas/glóbulos também na escala nanométrica. A tendência de usar o prefixo “nano” começou a ganhar força após a publicação do primeiro artigo com o termo “nanoemulsão” em 1996, já que tende a ser mais razoável para definir um sistema com glóbulos de tamanho inferior a 200 nm (CALVO *et al.*, 1996). O debate foi reacendido quando se observou que em certas condições experimentais e composição de formulação, as microemulsões apresentam características morfológicas semelhantes às nanoemulsões. Não há um tamanho de glóbulo aceitável que defina a nanoemulsão, mas o ponto que é bem aceito é que as microemulsões têm glóbulos menores que as nanoemulsões. Outra grande diferença reside no método de preparo da nanoemulsão em que energia deve ser fornecida enquanto uma microemulsão é formada espontaneamente. O termo SMEDDS justifica a associação com o termo microemulsão por atender a todos os critérios necessários para classificação dentro desse sistema. Por outro lado, o termo SNEDDS, amplamente utilizado em pesquisas, em sua maioria não emprega métodos intensivos de energia para a geração de partículas ultrafinas, mas sim

alta concentração de surfactantes, tornando-o inadequado deste ponto de vista (DHAVAL *et al.*, 2022).

As proporções dos excipientes para a formulação de sistemas lipídicos e suas classificações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistema de classificação de formulações lipídicas a partir da composição e concentração dos excipientes (Adaptado de POUTON, 2006).

Excipientes	Conteúdo da formulação (% p/p)				
	Tipo I	Tipo II	Tipo IIIA	Tipo IIIB	Tipo IV
Óleo	100	40-80	40-80	< 20	-
Surfactante EHL < 12	-	20-60	-	-	0-20
Surfactante EHL > 12	-	-	20-40	20-50	30-80
Cossolvente	-	-	0-40	20-50	0-50

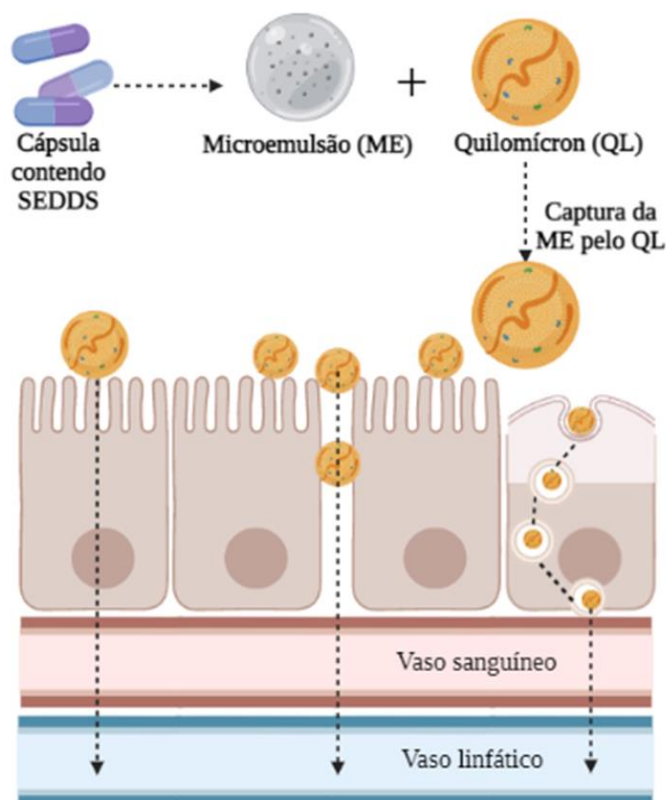
EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

As formulações do Tipo I são óleos que precisam ser digeridos e não são capazes de emulsionar. Já as do Tipo II são compostas por óleos e surfactantes lipofílicos e formam dispersões turvas que devido à falta de componentes solúveis em água tem perda mínima da capacidade de solubilização após a diluição. Os sistemas de Tipo III contêm proporções de surfactantes hidrofílicos e/ou cossolventes capazes de formar uma dispersão ultrafina em meio aquoso. O Tipo IIIA apresenta maior quantidade de óleo se comparada ao Tipo IIIB, enquanto o Tipo IIIB possui uma proporção maior de componentes solúveis em água. Por fim, o Tipo IV, sem óleo, representa a tendência recente de formulações que contêm surfactantes e cossolventes predominantemente hidrofílicos. A vantagem de misturar surfactantes com um cossolvente para obter uma formulação do Tipo IV é que o surfactante oferece uma capacidade solvente muito maior na diluição (como uma dispersão micelar) do que o cossolvente sozinho. O cossolvente é útil para facilitar a dispersão do surfactante, o que provavelmente reduz a irritação causada por altas concentrações locais de surfactante (POUTON, 2006; DEVRAJ, 2014).

O TGI é profundamente permeado pelo sistema linfático e vasos sanguíneos. No intestino a emulsão formada pode ser absorvida pelas células M das placas de Peyer. No

lúmen intestinal, os triglicerídeos que compõem o SEDDS são quebrados em diglicerídeos, monoglicerídeos e por fim em ácidos graxos livres que podem formar micelas mistas com os sais biliares adentrando os enterócitos. Uma vez dentro dos enterócitos, monoglicerídeos e ácidos graxos são recombinados formando novos triglicerídeos que se fundem ao colesterol, a apolipoproteína B-48 e a fosfolípides dando origem aos quilomícrons (QLM). Os QLM são transportados via sistema linfático mesentérico e entram na circulação sistêmica por meio da drenagem linfática no ducto torácico. Assim, QLM-fármaco pode ser submetido ao transporte linfático, ao invés da circulação portal, eliminando o efeito de primeira passagem. Outras possíveis vias de transporte incluem: paracelular, fusão e transcitose (Figura 6) (DATE, *et al.*, 2019; RANI *et al.*, 2019).

Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes caminhos de absorção das gotículas liberadas por SEDDS



Fonte: Adaptado pelo autor de RANI *et al.*, 2019; Biorender®.

Quando comparadas às emulsões tradicionais, que são formas dispersas metaestáveis sensíveis, SEDDS são fisicamente estáveis, fáceis de fabricar e adequados

à administração oral como dosagem unitária em forma de cápsula mole ou dura de gelatina devido a sua natureza anidra (GUPTA *et al.*, 2013).

Em SEDDS, o óleo é um ingrediente vital não apenas por solubilizar grande quantidade de fármacos lipofílicos ou facilitar a autoemulsificação, mas também por aumentar a fração do fármaco transportado via sistema linfático intestinal, aumentando assim sua absorção pelo TGI. Os óleos comestíveis naturais, compostos por triglicerídeos de cadeia média, muitas vezes não são os escolhidos devido à sua fraca capacidade de dissolver grandes quantidades de fármacos altamente lipofílicos (CHIME, KENECHUKWU & ATTAMA, 2014).

Os triglicerídeos de cadeia longa e média modificados, com diferentes graus de saturação ou hidrólise, têm sido amplamente utilizados. Esses derivados semissintéticos formam bons sistemas de emulsificação quando associados a surfactantes, aprovados para administração oral, que levam ao aumento da solubilidade do fármaco (KOHLI *et al.*, 2010; ČERPŇJAK *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2013).

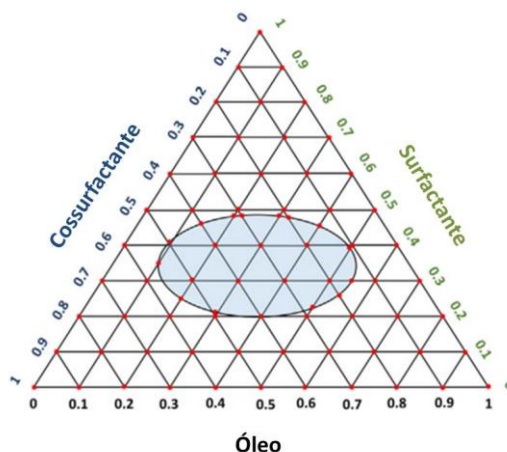
Para que a propriedade autoemulsionante seja alcançada, a formulação deve conter considerável quantidade de surfactante em adição ao óleo. Os surfactantes podem melhorar a afinidade entre lipídios e também à membrana intestinal, ou ainda, aumentar sua permeabilidade rompendo a organização estrutural da bicamada lipídica. Dessa forma, a maior parte do fármaco é absorvida pela via transcelular passiva. Os mais recomendados são os tensoativos não iônicos com um equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) relativamente alto e hidrofiliçidade, pois são mais seguros e oferecem maior estabilidade da formulação em uma ampla faixa de pH e força iônica. Porém, os emulsionantes de origem natural (lecitina, monoglicerídeos de cadeia média e monooleato de glicerila) são normalmente preferidos por serem considerados mais seguros que os sintéticos. Além disso, tensoativos não iônicos podem produzir alterações reversíveis na permeabilidade da mucosa intestinal facilitando ainda mais a absorção do fármaco. Utiliza-se ainda tensoativos volumosos como polissorbatos e triglicerídeos etoxilados por serem menos tóxicos. O uso de misturas de surfactantes para atingir o EHL necessário para a formulação tem apresentado uma capacidade superior de autoemulsificação se comparado ao uso de um único surfactante que cumpra o valor requerido. Há uma relação entre o aumento da concentração do tensoativos e menores tamanhos de gota, uma vez que a estabilização das gotículas de óleo é o resultado da localização de suas moléculas na interface óleo-água (ČERPŇJAK *et al.*, 2013; KARWAL *et al.*, 2016; RANI *et al.*, 2019).

Os cossurfactantes reduzem ainda mais a tensão interfacial, conferindo flexibilidade ao filme formado entre as duas fases e garantindo que diferentes curvaturas se formem de acordo com sua concentração na microemulsão. A maior concentração do surfactante (cerca de 30%) pode ser diminuída pela adição do cossurfactantes. Os álcoois de cadeia média (C3–C8) são os mais empregados como cossurfactantes. Já os cossolventes, também álcoois de cadeia média (C8-C12) ou derivados de etilenoglicol, glicerol e propilenoglicol, são usados para aumentar a capacidade de solubilização do fármaco incorporado e aumentar a dispersibilidade dos tensoativos hidrofílicos na fase oleosa, promovendo, assim, homogeneidade e estabilidade da formulação (RANI *et al.*, 2019).

Um importante critério de seleção dos excipientes da formulação é a capacidade de solubilizar o ativo de interesse para garantir sua capacidade de carga máxima (POUTON, 2000). A determinação das concentrações ótimas de cada excipiente é realizada por meio da construção de diagramas de fase ternários ou pseudoternários (UJHELYI *et al.*, 2018). O diagrama ternário é quando um único tensoativo é capaz de diminuir a tensão interfacial e obter estabilização termodinâmica da formulação. Já o pseudoternário é quando há a necessidade do uso de um cotensoativo para garantir a estabilidade e promover eficiente autoemulsificação, além de descrever em que condições experimentais da mistura dos excipientes é possível obter sistemas opticamente transparentes (RANI *et al.*, 2019; CONSIGLIERI & BATISTUZZO, 2021).

O diagrama de fases pseudoternário pode ser construído por realização de uma titulação aquosa ou promoção espontânea da emulsificação, considerando uma fase oleosa, surfactante e fase aquosa. Primeiramente, o surfactante escolhido deve ser dissolvido na fase oleosa em diferentes proporções (9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1). Cada proporção de surfactante e fase oleosa deve então ser titulada com a fase aquosa. A turbidez é referida como um ponto final da titulação. A composição percentual do componente em cada sistema ternário tem que ser determinada seguindo a plotagem de resultados em coordenadas triangulares conforme apresentado na Figura 7. Os pontos destacados pelo círculo azul referem-se à área autoemulsionante (RANI *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2021).

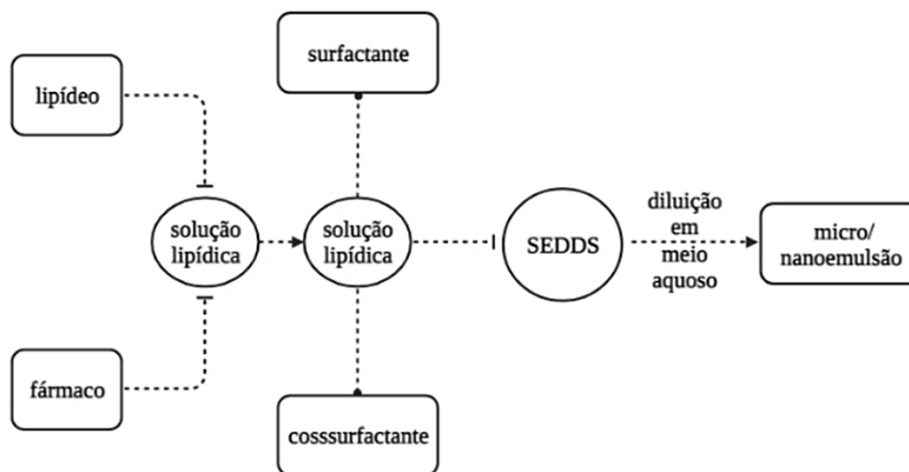
Figura 7 - Diagrama de fase pseudoternário de SEDDS



Fonte: Adaptado de GAO *et al.*, 2021.

A facilidade de fabricação e de escalonamento industrial é uma das vantagens que tornam SEDDS único quando comparado a outros sistemas de liberação de fármacos, pois exigem instalações de fabricação simples. Na Figura 8 está ilustrada uma metodologia usual no preparo de SEDDS (etapas de mistura dos componentes) e a formação de micro/nanoemulsões quando diluídas em meio aquoso (SINGH *et al.*, 2009).

Figura 8 - Fluxograma da metodologia usual de preparo de SEDDS



Fonte: Adaptado pelo autor de SINGH *et al.*, 2009 Biorender®.

Após o preparo da formulação, a caracterização físico-química é realizada utilizando-se diferentes técnicas e métodos. Dentre alguns, vale destacar: % de transmitância, tamanho dos glóbulos e índice de polidispersão (do inglês, *Polydispersity*

*index*, PDI) após diluição, robustez à diluição e variação de pH, determinação do tempo de emulsificação (Te), potencial Zeta (PZ), teor de encapsulação (TE) e morfologia (GUPTA *et al.*, 2013).

SEDDS é uma formulação comercialmente viável, especialmente quando consideramos ativos das classes II e IV. Alguns produtos farmacêuticos formulados e comercializados estão apresentados na Tabela 2 (BETAGERI, 2019; MISHRA *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Produtos comerciais que contem SEDDS (Adaptado de BETAGERI, 2019)

<b>Nome comercial / fármaco</b>	<b>Classe SCB</b>	<b>Laboratório Farmacêutico</b>
Sandimmune <sup>®</sup> (ciclosporina A/I)	IV	Novartis <sup>®</sup>
Neora <sup>®</sup> (ciclosporina)	IV	Novartis <sup>®</sup>
Gengraf <sup>®</sup> (ciclosporina A/III)	IV	AbbVie <sup>®</sup>
Norvir <sup>®</sup> (ritonavir)	II	AbbVie <sup>®</sup>
Fortovase <sup>®</sup> (saquinavir)	IV	Roche <sup>®</sup>
Agenerase <sup>®</sup> (amprenavir)	II	GlaxoSmithKline <sup>®</sup>
Depakene <sup>®</sup> (ácido valpróico)	II	AbbVie <sup>®</sup>
Rocaltrol <sup>®</sup> (calcitriol)	II	Roche <sup>®</sup>
Targretin <sup>®</sup> (bexaroteno)	II	Ligand Pharmaceuticals <sup>®</sup>
Vesanoid <sup>®</sup> (tretinoína)	II	Roche <sup>®</sup>
Accutane <sup>®</sup> (isotretinoína)	II	Roche <sup>®</sup>
Aptivus <sup>®</sup> (tipranavir)	II	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals <sup>®</sup>

### 2.3.2 CLN

Para superar as limitações de administração por via oral de alguns sistemas lipídicos, os pesquisadores, no início dos anos de 1990, trabalharam no desenvolvimento de um sistema lipídico sólido biocompatível e biodegradável, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Porém, as NLS apresentaram algumas limitações como a baixa capacidade de carga do fármaco e sua expulsão da matriz no decorrer do armazenamento da formulação, devido à sua composição ser restrita a lipídeos sólidos. Durante o armazenamento, as moléculas lipídicas, gradualmente, se arranjam em uma

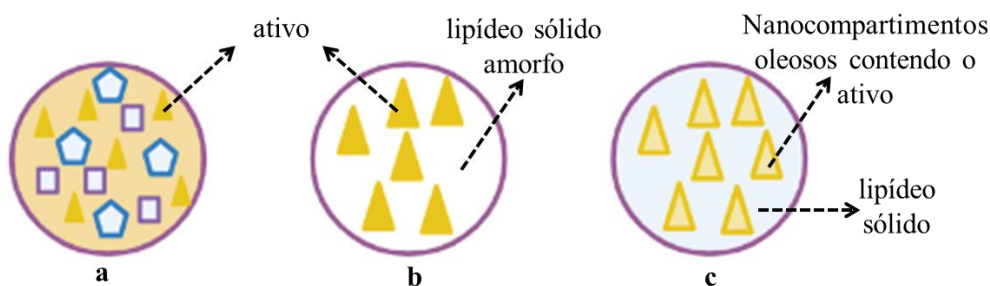
estrutura organizada mais estável, resultando na geração das formas cristalinas  $\beta$ i e  $\beta$  a partir das quais o fármaco aprisionado pode ser expulso dessa matriz (POONIA *et al.*, 2016; TALEGAONKAR & BHATTACHARYYA, 2019).

No início dos anos 2000, surgiram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), a partir de modificações das NLS para modular o estado físico e a capacidade de carga (DAS & CHAUDHURY, 2011). Os CLN são, então, produzidos a partir de misturas de lipídeos líquidos e sólidos, tensoativos e há três modelos de incorporação propostos. Esses diferentes modelos de incorporação dependem do tipo de lipídeo e da técnica utilizados na sua produção (Tabela 3, Figura 9) (GABA *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Diferentes tipos de CLN (Adaptado de GABA *et al.*, 2015)

Tipo de CLN	Nome	Características		
I	Cristal imperfeito	Matriz lipídica com numerosos espaços vazios para acomodar o ativo.	Mistura de lipídeos sólidos com quantidade suficiente de lipídeos líquidos.	Figura 9a
II	Amorfo	Minimiza a expulsão do ativo durante o armazenamento, atrasando o fenômeno da recristalização.	Mistura de lipídeos sólidos especiais que não recristalizam após o resfriamento com lipídeos líquidos.	Figura 9b
III	Múltiplo	Evita a expulsão do ativo evitando a cristalinidade.	Nanocompartimentos oleosos, que acomodam o ativo, são criados dentro da matriz lipídica sólida pelo processo de separação de fases.	Figura 9c

Figura 9 - Desenho esquemático dos tipos de CLN



Fonte: Adaptado pelo autor de GABA *et al.*, 2015; Biorender®.

Os lipídeos sólidos, principal fração da matriz deste nanossistema, mais comumente utilizados na composição dos CLN são: ácido palmítico, ácido esteárico, monoestearato de glicerila, behenato de glicerila (Compritol 888 ATO<sup>®</sup>) (TAMJIDI *et al.*, 2013). Atualmente, há um crescente aumento no uso de ceras naturais, como as de abelha e carnaúba, no desenvolvimento dessas nanopartículas (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010).

Já quanto aos lipídeos líquidos, os mais utilizados são os triglicerídeos de cadeia média (TCM) e a lecitina de soja. No processo de produção dos CLN, um tensoativo ou uma combinação deles deve ser acrescentado para garantir a estabilidade do sistema. Os mais utilizados são os não-iônicos como Poloxamer<sup>®</sup> 188 (um copolímero tribloco não iônico composto por unidades de óxido de etileno - óxido de propileno - óxido de etileno) e os polissorbatos (BELOQUI *et al.*, 2016).

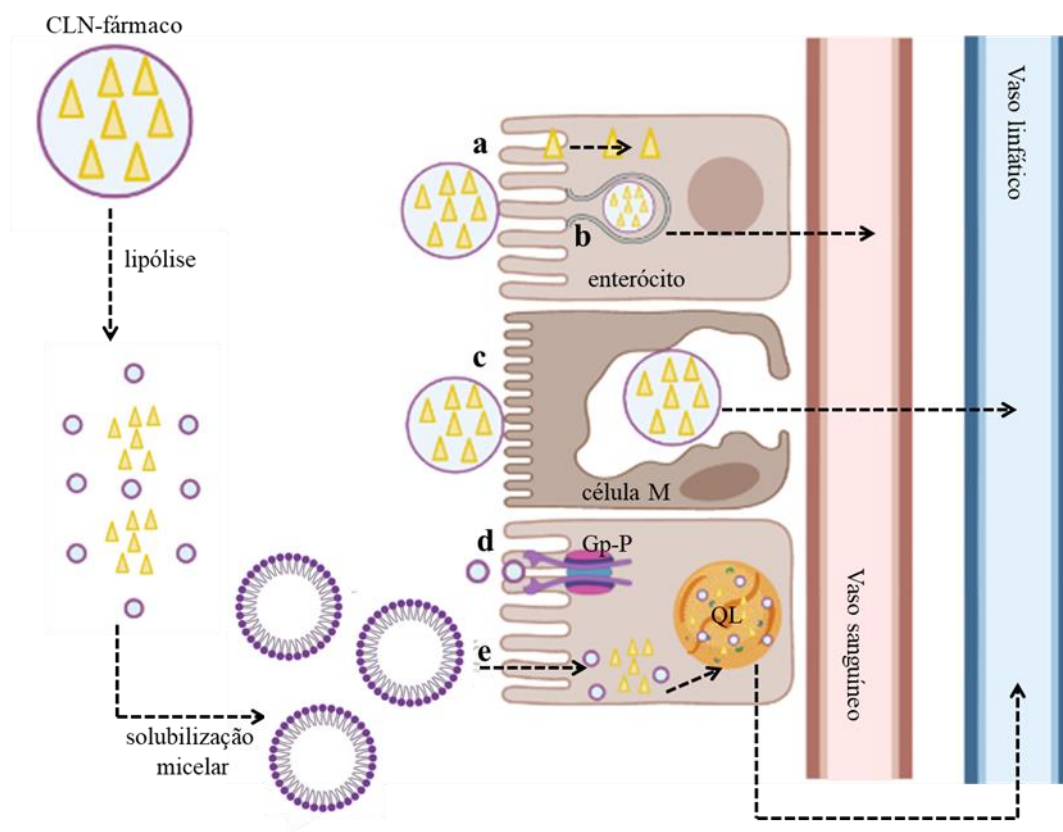
Muitos dos mecanismos propostos para a absorção oral dos fármacos incorporados à CLN são os mesmos para qualquer sistema lipídico, inclusive já descritos no item 2.3.1 e apresentados na Figura 6. Porém, alguns pesquisadores trabalham na identificação de mecanismos específicos do aumento da BD oral relacionada à CLN e dentre suas descobertas estão a internalização direta mediada por clatrina, caveolina e macropinocitose (Figura 10).

Todos esses mecanismos contornam o efluxo mediado pela glicoproteína-P (P-gp), conferindo ao fármaco incorporado uma maior BD oral quando comparado a outros sistemas lipídicos (CHEN *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2015; TALEGAONKAR & BHATTACHARYYA, 2019).

Diversos métodos são descritos para o preparo de CLN e dentre eles as técnicas de homogeneização de alta pressão (HPH, do inglês *High-pressure homogenization*) e as técnicas de microemulsão são as preferidas devido ao seu fácil escalonamento (GANESAN & NARAYANASAMY, 2017).

O método HPH utiliza um homogeneizador de alta pressão (100 a 2000 bar) para empurrar o líquido através de uma pequena abertura (da ordem de microns) causando um turbilhão de alta velocidade (acima de 1000 km/h). O cisalhamento resulta em forças de tensão e cavitação que quebram as partículas aceleradas em tamanhos ainda menores, atingindo a nanoescala. Esse método pode ser usado em temperatura elevada (quente) ou abaixo da temperatura ambiente (frio) (WISSING *et al.*, 2004; MEHNERT & MÄDER, 2012).

Figura 10 - Mecanismos de absorção de fármacos pouco permeáveis incorporados a CLN. **a** Entrega do fármaco na janela de absorção após bioadesão da partícula de CLN; **b** Endocitose mediada por clatrina/caveolina; **c** Captação através da placa de Peyer; **d** Inibição do efluxo mediado pela glicoproteína-P pelos excipientes da formulação; **e** Solubilização micelar seguida de difusão passiva nos enterócitos e formação de Quilomícron (QL)



Fonte: Adaptado pelo autor de TALEGAONKAR & BHATTACHARYYA, 2019; Biorender®.

No HPH a quente, a mistura lipídica é aquecida entre 5 e 10 °C acima do seu ponto de fusão. O fármaco é então disperso nos lipídeos previamente fundidos. A fase aquosa é preparada separadamente pela adição de surfactante em água e também é aquecida (mesma temperatura da fase oleosa). A fase aquosa é vertida sobre a fase oleosa e misturada pelo dispositivo de alto cisalhamento. Esta pré-emulsão quente é homogeneizada por um tempo para obter o tamanho de partícula desejado. A nanoemulsão obtida é resfriada à temperatura ambiente e a solidificação das gotículas lipídicas ocorre devido à recristalização do lipídeo sólido formando assim o CLN (DAS & CHAUDHURY, 2011; GANESAN & NARAYANASAMY, 2017; SINGH, 2019; HAIDER *et al.*, 2020). Em geral, temperaturas mais altas da fase oleosa resultam em menores tamanhos de partículas devido à diminuição da viscosidade da fase interna

(LANDER, *et al.*, 2000). No entanto, sabe-se que temperaturas mais altas podem aumentar a taxa de degradação mesmo de fármacos termoestáveis. Assim, a etapa de homogeneização pode ser repetida para garantir um tamanho de partícula menor (3 a 5 ciclos). Também é importante lembrar que a homogeneização em alta pressão aumenta a temperatura da amostra (GANESAN & NARAYANASAMY, 2017).

Já o HPH a frio foi desenvolvido para superar alguns problemas do método a quente (JAISWAL *et al.*, 2016). Entre eles, a degradação do fármaco devido à longa exposição à alta temperatura, distribuição do fármaco na fase aquosa durante a homogeneização e a complexidade da cristalização na etapa de formação da nanoemulsão (DAS & CHAUDHURY, 2011). Semelhante ao HPH quente, a mistura lipídica também é aquecida e o fármaco também é posteriormente incorporado a ela. Em seguida, a fase oleosa contendo o fármaco disperso é solidificada por resfriamento rápido em nitrogênio líquido, por exemplo. O sólido obtido é então triturado, geralmente em um moinho de bolas, em um pó fino. As micropartículas são posteriormente dispersas em uma solução aquosa fria de surfactante e submetidas ao homogeneizador de alto cisalhamento para obter o CLN (GANESAN & NARAYANASAMY, 2017; HAIDER *et al.*, 2020).

Neste método a frio envolvendo lipídeos sólidos, é necessário utilizar mais energia para obter partículas na escala nanométrica em comparação com a homogeneização a quente (MEHNERT & MÄDER *et al.*, 2012). Outro ponto importante é que, embora esse método tenha sido desenvolvido para evitar a degradação do fármaco induzida pela temperatura, não é possível eliminar sua exposição ao calor, pois é necessário dispersá-lo na mistura de lipídios fundidos. Requer ainda quantidades significativas de agentes tensoativos e um grande volume de água para diluição, o que pode ser considerado como os principais inconvenientes desta técnica (MU & HOLM, 2018; SINGH, 2019; SARANGI *et al.*, 2019).

Desde 1993, o método de microemulsão tem sido utilizado como etapa de produção de NLS (GASCO, 1993). A microemulsão é formada espontaneamente porque há uma alta concentração de surfactante ao analisar a relação surfactante/lipídeo. O mecanismo de formação de CLN é a cristalização dos lipídeos devido à rápida solidificação da microemulsão (SHIRURE *et al.*, 2019). Inicialmente, os lipídeos fundidos são misturados com uma solução aquosa aquecida contendo surfactante. Uma agitação suave é aplicada até que a microemulsão seja formada. Na segunda etapa, a microemulsão quente é dispersa em um alto volume de água fria (2 – 3°C) sob agitação

suave. Isso faz com que as gotículas de lipídeos solidifiquem. O CLN obtido por esta técnica é esférico e tem distribuição de tamanho uniforme. No entanto, existem algumas desvantagens como o estágio adicional de ultrafiltração (já que a dispersão final é diluída), alta concentração de surfactante e a elevada sensibilidade do método frente a alterações (SHIRURE *et al.*, 2019; SINGH, 2019; HAIDER *et al.*, 2020).

Outros métodos podem ser utilizados na produção de CLN e incluem ultrassonicação, evaporação de solvente, fluido supercrítico, mas apresentam como desvantagens o uso de solventes e a utilização de equipamentos muito específicos e de mais alto custo quando comparado a HPH e microemulsão (TALEGAONKAR & BHATTACHARYYA, 2019).

A caracterização do CLN é necessária para o seu controle de qualidade. No entanto, ela é um sério desafio devido ao tamanho coloidal das partículas e à complexidade e natureza dinâmica do sistema. Os parâmetros importantes avaliados incluem tamanho de partícula, potencial zeta, grau de cristalinidade e modificação de lipídeos (polimorfismo), coexistência de estruturas coloidais adicionais (micelas, lipossomas, agregados), estabilidade, % de encapsulação do fármaco, liberação *in vitro* do fármaco e morfologia da superfície (SHIRURE *et al.*, 2019; HAIDER *et al.*, 2020).

As formulações de CLN administradas por via oral são objeto de pesquisas em todo o mundo e há uma variedade em sua composição (Km, *et al.*, 2020). Na Tabela 4 estão relacionados alguns estudos em que CLN foi capaz de aumentar a BD oral de fármacos.

Tabela 4 - Estudos publicados em que CLN aumenta a biodisponibilidade oral do fármaco (Continua)

<b>Fármaco</b>	<b>Uso terapêutico</b>	<b>Composição CLN</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
Apixaban	Anticoagulante	Ácido Oléico Ácido esteárico Polissorbato 80 Lecitina	Aumento de 8 vezes na BD	ZAKY <i>et al.</i> , 2022
Fumarato de quetiapina	Antipsicótico e estabilizador de humor	Precirol® ATO5 Ácido Oléico Poloxamer 188 Phospolipon 90G	Aumento de 3,93 vezes na BD	AGARWAL <i>et al.</i> , 2021
Exemestano	Câncer de mama	Precirol® ATO5 Óleo de Linhaça Poloxamer 188 Polissorbato 80 Polissorbato 20	Aumento de 3,9 vezes na BD	SINGH <i>et al.</i> , 2019
Curcumina	Suplementação (anti-inflamatório)	Fosfatidilcolina Trioleato de glicerol	Aumento de 5 a 15 vezes na BD	TIAN, <i>et al.</i> , 2017
Rosuvastatina	Hipercolesterolemia	Monoestearato de glicerila Capmul MCM EP Poloxamer 188 Tween80	Aumento de 5,4 vezes na BD se comparado a suspensão	RIZWANULH <i>et al.</i> , 2017
Indometacina	Artrite reumatóide	Monoestearato de glicerila Ácido oléico Polissorbato 80 Quitosana HTCC <sup>1</sup>	Aumento na BD quando CLN revestido por quitosana e HTCC	CHOI <i>et al.</i> , 2016
Silimarina	Desordem hepática	Precirol® ATO5 Ácido oléico Polissorbato 80 Lipoid E 100®	Aumento da BD 2,5 vezes se comparado a Legalon® cápsula e 3,10 vezes comparado à suspensão	SHANGGUA N, <i>et al.</i> , 2014
Valsartana	Hipertensão arterial	Capmul MCMEP® Triestearina Polissorbato 80 Poloxamer	Aumento na BD se comparado à suspensão	PATEL&PATEL, 2013

Tabela 4 - Estudos publicados em que CLN aumenta a biodisponibilidade oral do fármaco (Final)

<b>Fármaco</b>	<b>Uso terapêutico</b>	<b>Composição CLN</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
Lovastatina	Hipercolesterolemia	Precirol <sup>®</sup> ATO 5 Esqualeno Poloxamer 188 Myveroll 1804K <sup>®</sup> Fosfatidilcolina	Aumento de 4 para 24% na BD	CHEN <i>et al.</i> , 2010
Vinpocetina	Isquemia cerebral vascular crônica	Compritol 888 Miglyol 812 Solutol HS-15 Lecitina Poloxamer 188	Aumento de 322% na BD se comparado à suspensão	ZHUANG <i>et al.</i> , 2010

<sup>1</sup> Um derivado de quitosana carregado positivamente (material de revestimento).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o perfil farmacocinético pré-clínico e a atividade antifúngica de um nanossistema contendo tiazolilhidrazona RN104.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico para o controle de qualidade das formulações;
- desenvolver nanossistema contendo RN104;
- caracterizar as formulações brancas e carregadas com RN104 por meio da avaliação do diâmetro das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ);
- realizar testes de estabilidade para os nanossistemas desenvolvidos;
- otimizar a composição e a metodologia de preparo do nanossistema mais promissor;
- realizar estudos de liberação *in vitro* da melhor formulação carregada com RN104;
- desenvolver e validar um método bioanalítico para a quantificação sérica do RN104 para aplicação em estudo farmacocinético pré-clínico;
- avaliar por meio de estudo farmacocinético em modelo murino se o melhor nanossistema desenvolvido melhora a biodisponibilidade oral do RN104 quando comparado ao RN104 livre;
- avaliar a atividade antifúngica e a toxicidade da formulação desenvolvida.

## **CAPÍTULO I**

### **DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104**

## **1 INTRODUÇÃO**

No **CAPÍTULO 1** descreve-se o desenvolvimento de CLN e de SEDDS para carrear o composto RN104. Esses dois nanossistemas são amplamente utilizados com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral de substâncias lipofílicas e de baixa solubilidade no TGI. Deve-se realizar a escolha criteriosa das matérias-primas e de suas proporções para que as formulações tenham tamanho de partícula e polidispersividade adequados. Para tal, realizaram-se testes de solubilidade do RN104 em diferentes excipientes a fim de definir a composição dos sistemas visando maximizar a capacidade de carrear o RN104.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade de CLN e SEDDS contendo RN104.

### **2.2 Objetivos específicos**

- sintetizar quantidade suficiente do RN104 para proceder os estudos;
- desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para quantificar o RN104 nas formulações;
- avaliar a solubilidade do RN104 em diferentes excipientes;
- desenvolver e caracterizar formulações de CLN e SEDDS brancas e carregadas com RN104;
- avaliar a estabilidade das formulações preparadas.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

#### *3.1.1 Solventes e reagentes*

- a) Água ultrapurificada em sistema Mili-Q Millipore® (Bedford, MA, EUA);

- b) reagentes de grau cromatográfico: acetonitrila (ACN) (Dinâmica<sup>®</sup> Indaiatuba, SP) e tetrahidrofurano (THF) (Merck<sup>®</sup>, LiChrosolv-Merck, Alemanha);
- c) reagentes de grau analítico: acetato de etila (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP); ácido acético (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), ácido clorídrico (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), álcool etílico (J.T.Baker<sup>®</sup>, Xalostoc, EM, México), álcool isopropílico (J.T.Baker<sup>®</sup>, Xalostoc, EM, México), 2-bromoacetofenona (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo), bicarbonato de sódio (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), ciclohexanocarboxialdeído (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo), hexano (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), tiossemicarbazida (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo); fosfato de potássio monobásico (J.T.Baker<sup>®</sup>, Xalostoc, EM, México); cloreto de sódio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo);
- d) excipientes utilizados nas formulações e testes de solubilidade: óleo de soja (marca comercial Liza<sup>®</sup>, Uberlândia, MG), Kollpihor RH 40<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo), Tween 20 (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), Tween 80 (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), Span 80 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo), TCM (Lipoid<sup>®</sup> GmbH, Ludwigshafen, Alemanha; marca comercial Pura Vida<sup>®</sup>, SP), Compritol<sup>®</sup> 888 ATO (Gattefossé<sup>®</sup>, Saint-Priest, França), ácido oleico (Croda<sup>®</sup> HealthCare), PEG 400 comum (Croda<sup>®</sup> HealthCare, Snaith, UK), PEG 400 ultrarefinado (Croda<sup>®</sup> HealthCare, Snaith, UK), Epikuron<sup>®</sup>, óleo de girassol (marca comercial Liza<sup>®</sup>, Uberlândia, MG), glicerol (Casa da Química Indústria e Comércio Ltda, São Paulo), óleo de sésamo (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Alemanha).

### 3.1.2 Equipamentos e acessórios

- a) Equipamentos: cromatógrafo Shimadzu, equipado com bomba quaternária LC-10ADvp, detector UV-VIS SPD-10A, detector DAD SPD-M10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseificador DGU - 14 A, forno de coluna CTO - 10 Avp e autoinjeter SIL-10ADvp (Kioto, Japão) com software Class-VP para processamento dos dados; espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum One Perkin Elmer, PERKIN ELMER; agitador tipo vórtex MS1, IKA; balança analítica com precisão de 0,01 mg BP 211 D, SARTORIUS; balança analítica, SHIMADZU; banho de ultrassom 1510R-MT, BRANSON; Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Staufen, Alemanha); sonda de titânio de alta potência (CPX 500, Cole Parmer, Vernon

Hills, Estados Unidos); orbital shaker 2D (Agimaxx), Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido); centrífuga MR 23i, JOUAN;

- b) acessórios: filtros 0,45 µm (Sorblin Technologies®, Santa Maria, Brasil); coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm), com tamanho de poro de 95 Å e tamanho de partícula 5 µm da marca Agilent®; membrana de ultrafiltração Amicon® 100K (Milipore, Billerica, Estados Unidos); balões de fundo redondo, balões volumétricos calibrados, provetas, vials, seringas, pipetas automáticas calibradas.

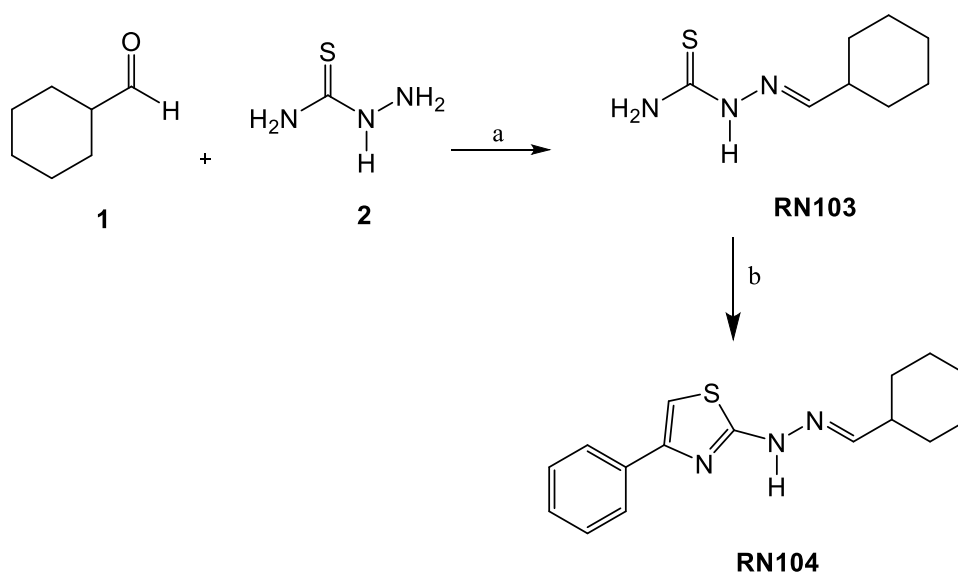
## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Síntese do composto RN104

A síntese do RN104 foi descrita anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Para a obtenção do intermediário tiosemicarbazona (RN103) e do produto final (RN104), seguiu-se a metodologia já publicada (SÁ *et al.*, 2015), conforme rota de síntese apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Rota de síntese utilizada na obtenção do RN104

- (a) Álcool etílico, ácido acético, 80°C, (1) ciclohexanocarboxialdeído, (2) tiosemicarbazida; (b) Álcool isopropílico, 50°-60°C; 2-bromoacetofenona.



Fonte: Adaptado de SÁ *et al.*, 2015.

O RN104 foi caracterizado pela análise dos espectros no infravermelho e ultravioleta e ponto de fusão e foi utilizado para o seguimento dos estudos desse trabalho.

### 3.2.2 *Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de RN104 nas formulações*

O método analítico foi desenvolvido e validado no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia, de forma que possibilitasse separar o pico referente ao RN104 daqueles referentes ao seu intermediário e materiais de partida de síntese, bem como de seus produtos de degradação e excipientes, permitindo que esse método fosse utilizado no controle de qualidade quantitativo e qualitativo do composto livre e nas formulações.

O método foi desenvolvido com base no validado anteriormente durante o mestrado (SILVA *et al*, 2022) em um sistema de CLAE Shimadzu<sup>®</sup> com detector de arranjo de diodos (DAD) a 240 nm, utilizando-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm), com tamanho de poro de 95 Å e tamanho de partícula 5 µm da marca Agilent<sup>®</sup> mantida a 40 °C. A fase móvel (FM) utilizada foi ACN acidificada com 0,5% de HCl 0,1 M e água na proporção de 90:10, em um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi 10 µL de uma solução do RN104 de concentração 100 µg/mL e o tempo de corrida de 5 min.

O preparo da solução estoque de RN104 foi realizado pesando-se exatamente cerca de 10 mg do composto e transferindo-se essa massa para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado utilizando-se ACN acidificada a 1% de HCl 0,1 M (diluente) e assim obteve-se uma solução de concentração 1 mg/mL. A solução estoque foi diluída para a construção da curva de calibração e avaliação da linearidade conforme volumes apresentados na Tabela 5. Os cálculos e avaliações estatísticas dos resultados da linearidade foram realizados com auxílio do *software* Microsoft Excel<sup>®</sup> 2013, baseando-se em planilhas desenvolvidas, e pelo programa estatístico Action Stat<sup>®</sup> versão 3.6.331.450 *build 7* como forma de confirmação dos cálculos (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007).

Para a realização da precisão (intercorrida e intracorrida) foram pesadas amostras independentes do composto RN104, uma vez que para essas avaliações utilizaram-se seis determinações a 100% da concentração de trabalho (100 µg/mL). Para

tal, pesou-se exatamente cerca de 2,5 mg de RN104 e transferiu-se essa massa para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com ACN 1% HCl 0,1 M (diluente). Na precisão intracorrída, as amostras foram preparadas por um mesmo analista e analisadas em uma mesma corrida analítica (n = 6). A precisão intercorrída difere do teste anterior por ter as amostras preparadas por analistas distintos em dois dias diferentes (n = 12). Cada uma das soluções preparadas foi injetada de forma aleatória em triplicata.

Tabela 5 - Preparo das soluções da curva analítica de RN104 para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE-DAD

Nível	Intervalo linear (%)	Volume da solução estoque (µL)	Concentração de RN104 (µg/mL)	Volume do diluente* q.s.p (mL)
1	5	50	5	10
2	30	300	30	10
3	55	550	55	10
4	80	800	80	10
5	105	525	105	5
6	130	650	130	5

\* O diluente utilizado no preparo das soluções foi a ACN com 1,0% HCl 0,1 M.

No ensaio de exatidão, preparou-se uma solução estoque de RN104 na concentração 1 mg/mL, conforme descrito no ensaio de linearidade. Os níveis de concentração avaliados foram 30, 80 e 130% da concentração de trabalho, conforme descrito na Tabela 6. A avaliação desse parâmetro foi feita por meio da porcentagem de recuperação, que foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (1)$$

A robustez do método foi avaliada utilizando-se o teste de Youden que consiste em um planejamento fatorial saturado de resolução III ( $2^{7-4}$ ), cujas relações geradoras são I=124, I=135, I=236 e I=1237. Os valores nominais do método foram considerados

como o nível alto (+1), enquanto nível baixo (-1) são as variações propostas, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 6 - Soluções preparadas para a avaliação da exatidão do método analítico

Nível de concentração	Intervalo linear (%)	Volume da solução estoque ( $\mu\text{L}$ )	Concentração RN104 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume diluente* q.s.p. (mL)
Baixo	30	300	20	10
Médio	80	800	120	10
Alto	130	650	240	5

\* O diluente utilizado no preparo das soluções foi a ACN 1% HCl 0,1M.

Tabela 7 - Parâmetros avaliados no teste de robustez do método analítico

Fator	Descrição	Nível baixo (-1)	Nível alto (+1)
1	Concentração de HCl na ACN da fase móvel	ACN 0,3% HCl 0,1 M	ACN 0,5% HCl 0,1 M
2	Composição da fase móvel (ACN 0,5% HCl 0,1N: H <sub>2</sub> O)	85:15	90:10
3	Coluna cromatográfica	Agilent Eclipse XDB	Agilent Zorbax
4	Temperatura do forno	30 °C	40 °C
5	Fluxo da fase móvel	0,9 mL/min	1,0 mL/min
6	Comprimento de onda monitorado (DAD)	230 nm	240 nm
7	Diluente das amostras	ACN pura	ACN 1% HCl 0,1 M

A matriz de planejamento é apresentada na Tabela 8, sendo cada experimento injetado em duplicata de maneira aleatorizada.

Os resultados das oito análises realizadas no ensaio de robustez foram utilizados para calcular o efeito de cada contraste ou fator (diferença entre a média dos resultados das quatro análises no nível alto e a média dos resultados das quatro análises no nível

baixo), bem como o desvio padrão entre os oito resultados. Todos os cálculos e gráficos foram feitos utilizando Statistica 14.0.0.15 TIBCO Software Inc.

Tabela 8 - Matriz de planejamento do Teste de Youden

<b>Experimento</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de RN104 foram estabelecidos a partir das equações que levam em consideração parâmetros da curva analítica. As equações preconizadas pela ANVISA (BRASIL, 2017) e utilizadas nos cálculos, são apresentadas a seguir:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \qquad LQ = \frac{10\sigma}{IC} \qquad (2)$$

Em que IC é a inclinação da curva de calibração;  $\sigma$  é o desvio padrão.

Para análise da seletividade, foram analisadas amostras do branco (diluyente - ACN 1% HCl 0,1 M), soluções dos materiais de partida de síntese (RN103 e 2-bromoacetofenona) e alguns excipientes (óleo de soja, TCM, Kolliphor RH 40, Tween 20 e Tween 80). A seletividade também foi avaliada pela determinação do índice de pureza do pico de RN104, obtidas com auxílio do detector DAD, no intervalo 200 a 400 nm.

### 3.2.3 Solubilidade do RN104 em diferentes excipientes

Pesou-se exatamente cerca de 20 mg de RN104 em frascos de penicilina e adicionou-se 1 mL de diferentes excipientes a serem testados. As misturas foram

agitadas a 150 rpm por 24 horas a 37 °C utilizando um agitador orbital shaker. Em seguida, transferiu-se 500 µL da mistura para eppendorf procedendo à centrifugação a 9400 g por 15 minutos. Filtrou-se o sobrenadante utilizando filtro 0,45 µm. Transferiu-se 20 µL do filtrado para outro eppendorf e adicionou-se 1480 µL de ACN 1% HCl 0,1 M. Homogeneizou-se em vortex por 1 minuto, seguido de filtração para vial utilizando filtro 0,45 µm. Os testes foram realizados em triplicata. A concentração de RN104 foi determinada por CLAE pelo método descrito em 4.2.1.

### 3.2.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações

#### 3.2.4.1 SEDDS

Os excipientes de maior capacidade de solubilização do RN104 (conforme item 4.2.2) foram base para o desenvolvimento do SEDDS. As variações de concentração, bem como os excipientes inicialmente testados na composição das formulações são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Primeira etapa de variações na concentração dos excipientes do SEDDS

Formulação	% Óleo de soja	% Kolliphor RH 40	% Tween 20	% PEG400	% Span 80
F1	55	45	0	0	0
F2	55	0	45	0	0
F3	55	22,5	22,5	0	0
F4	55	0	35	0	10
F5	55	35	0	0	10
F6	55	17,5	17,5	0	10
F7	55	40	0	5	0
F8	55	0	40	5	0
F9	55	20	20	5	0
F10	55	30	0	5	10
F11	55	0	30	5	10
F12	55	15	15	5	10

Kolliphor RH 40 = óleo de rícino hidrogenado polioxil 40; Tween 20 = polissorbato 20; PEG 400 = polietilenoglicol 400; Span 80 = monooleato de sorbitano.

Para o preparo dos SEDDS-branco, todos os componentes foram pesados em frasco de penicilina e deixados em agitação magnética (cerca de 100 rpm) por 30 minutos a  $70 \pm 5$  °C em banho-maria. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente e avaliadas quanto à separação de fase após 24 horas de preparo.

Como nenhuma das 12 formulações preparadas mantiveram-se isotrópicas após 24 horas do preparo, avaliou-se então outras composições e proporções (Tabela 10) contendo óleo de soja.

Tabela 10 - Segunda etapa de variações na composição dos excipientes do SEDDS

Formulação	% Óleo de soja	% TCM	% Kolliphor RH40	% Tween 80	% Tween 20	% PEG 400	% Transcutol HP	% Span 80
F13	30	10	25	0	25	20	0	0
F14	40	0	0	0	40	0	20	0
F15	10	10	0	0	45	35	0	0
F16	20	20	0	17,5	17,5	0	25	0
F17	40	0	35	17,5	17,5	25	0	0
F18	20	30	0	25	0	5	0	20
F19	55	0	0	15	0	15	0	15
F20	60	0	0	20	0	0	0	20
F21	55	0	0	30	15	0	0	0
F22	10	40	0	40	0	5	0	5

TCM = triglicerídeo de cadeia média; Kolliphor RH 40 = óleo de rícino hidrogenado polioxil 40;

Tween 80 = polissorbato 80; Tween 20 = polissorbato 20; PEG 400 = polietilenoglicol 400;

Transcutol HP = éter monoetílico de dietilenoglicol; Span 80 = monooleato de sorbitano.

Das novas 10 formulações preparadas, apenas F18 e F22 mantiveram-se estáveis após 24 horas do preparo. Porém, após 48 horas e 72 horas, observou-se separação de fases para ambas, respectivamente.

A partir dessas observações decidiu-se testar novas composições tendo como base o TCM, o segundo óleo de maior solubilização do RN104 (Tabela 11).

As formulações que não apresentaram separação de fases foram submetidas ao teste de tempo de emulsificação (Te). O Te foi avaliado visualmente e determinado

como o tempo necessário para que se perceba apenas uma fase após a dispersão do SEDDS (tempo máximo de 60 segundos). Para tal, dispersou-se a formulação com diluição de 200 vezes em água ultrapura e agitou-se a 37 °C a cerca de 100 rpm.

Tabela 11 - Terceira etapa de variações na composição dos excipientes do SEDDS

<b>Formulação</b>	<b>% TCM</b>	<b>% Kolliphor RH40</b>	<b>% Tween 80</b>	<b>% Tween 20</b>	<b>% PEG 400</b>	<b>% Span 80</b>
F23	40	0	17,5	17,5	25	0
F24	60	0	20	20	0	0
F25	50	22,5	22,5	0	5	0
F26	55	0	17,5	0	10	17,5
F27	50	0	0	40	10	0
F28	60	30	0	0	5	5
F29	60	15	0	25	0	0
F30	60	0	0	40	0	0
F31	55	25	15	5	0	0
F32	55	0	40	0	0	5

TCM = triglicerídeo de cadeia média; Kolliphor RH 40 = óleo de rícino hidrogenado polioxil 40; Tween 80 = polissorbatato 80; Tween 20 = polissorbatato 20; PEG 400 = polietilenoglicol 400; Span 80 = monooleato de sorbitano.

Apenas F32 manteve-se estável após 24 horas do preparo e apresentou Te satisfatório. Assim, realizou-se a partir dela, pequenas variações de concentração a fim de avaliar os impactos no tamanho de partícula, PDI e PZ após a dispersão em água ultrapura (Tabela 12).

Após a dispersão do SEDDS-branco em água ultrapura, o diâmetro médio e PDI das emulsões formadas foram determinados por espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando-se equipamento Zetasizer ZS90 a um ângulo fixo de 90° e à temperatura de 25° C. Para análise do PZ utilizou-se a técnica de DLS acoplada à mobilidade eletroforética. As medidas de PZ também foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer ZS90 à temperatura de 25°C.

Tabela 12 - Composição do SEDDS isotrópicos

<b>Formulação</b>	<b>% TCM</b>	<b>% Tween 80</b>	<b>% Span 80</b>	<b>% PEG 400</b>
F33	55	40	5	0
F34	54	40	5	1
F35	53	40	5	2
F36	50	40	5	5

TCM = triglicerídeo de cadeia média; Tween 80 = polissorbato 80;

Span 80 = monooleato de sorbitano; PEG 400 = polietilenoglicol 400.

As formulações selecionadas tiveram, então, o ativo RN104 incorporado. Exatamente cerca de 30 mg de RN104 foram adicionados a 3 g do SEDDS-branco correspondente (10 mg/mL), mantendo-se a formulação sob agitação magnética a 100 rpm a temperatura ambiente até completa solubilização. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente, em recipientes preenchidos com gás nitrogênio e ao abrigo da luz.

O teor do RN104 no SEDDS selecionado para a continuidade dos estudos foi determinado a partir da solubilização de 25 mg da formulação em 1 mL THF. A solução foi agitada em vortex por 1 minuto. Em seguida, 250 µL dessa solução foi adicionado à 1 mL de ACN 1% HCl 0,1 M e agitou-se novamente em vortex por 1 minuto. Filtrou-se, então, em filtro 0,45 µm, transferindo para vial e doseou-se RN104 por CLAE conforme método validado descrito no item 4.2.1. Para determinação da estabilidade do RN104 na formulação SEDDS, o doseamento do ativo foi realizado conforme descrito acima nos tempos de 0, 30, 45 e 60 dias.

Para a avaliação das emulsões formadas a partir da dispersão (1: 200) do SEDDS-RN104, diferentes meios foram utilizados: água ultrapura, meio simulado gástrico (MSG) e meio simulado intestinal pH 6,8 (MSI). O MSG e o MSI com e sem enzimas foram preparados como descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Farmacopeia, 2019).

Os frascos contendo os meios foram mantidos a 37 °C sob agitação a 150 rpm utilizando um agitador orbital shaker. Os tempos para as avaliações após a dispersão foram distintos, sendo 10 minutos em água ultrapura, 2 horas em MSG e 6 horas em MSI a fim de mimetizar o que ocorre no TGI (MARQUES BORGES *et al.*, 2020). As

emulsões formadas após a dispersão dos SEDDS em diferentes meios foram avaliadas quanto a: diâmetro médio, TE, Te, PDI e PZ.

A determinação do teor de RN104 nas emulsões formadas foi realizada por CLAE conforme método validado. A emulsão formada após a dispersão foi filtrada em filtro 0,45 µm e o filtrado foi diluído (1,5x) em THF: ACN 1 % HCl 0,1 M (1:5). O TE (%) foi calculado pela fórmula apresentada a seguir (3):

$$TE (\%) = \frac{RN104 \text{ filtrado}}{RN104 \text{ total}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

*RN104 filtrado* = fração de RN104 não precipitado após a dispersão do SEDDS;  
*RN104 total* = concentração teórica de RN104 nas emulsões formadas considerando a massa incorporada e as diluições realizadas para os diferentes meios.

#### 3.2.4.2 CLN

Os CLN foram preparados por homogeneização a quente utilizando-se agitador Ultra Turrax T-25 e homogeneizados em ultrassom com sonda de titânio de alta potência (21% de amplitude).

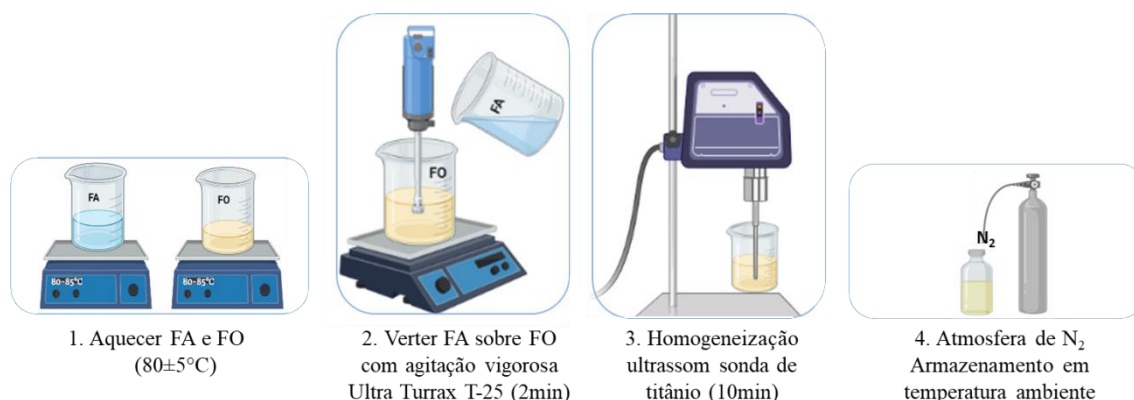
A composição das formulações testadas está apresentada na Tabela 13. A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas e aquecidas, separadamente, a  $80 \pm 5$  °C. A FA foi lentamente vertida sobre a FO, sob agitação, em Ultra Turrax a 8000 rpm, por dois minutos. Em seguida, as partículas foram calibradas, em relação ao diâmetro, em ultrassom (21% de amplitude) por 10 minutos. A suspensão obtida foi, então, resfriada sob agitação manual. A formulação foi armazenada em frascos de penicilina âmbar sob atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. A representação esquemática do processo está apresentada na Figura 12.

Tabela 13 - Composição dos CLN

Componentes		F1	F2	F3	F4	F5
		% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)
FO	Compritol 888 ATO <sup>®</sup>	1,2	1,2	1,6	1,6	1,2
	TCM	0,3	0,8	0,4	0,4	0,8
	Tween 80	1,25	2,0	1,0	2,5	3,0
	Span 80	-	0,5	0	0,5	0,5
	RN104	0,15	0,15	0	0	0
FA	Glicerol	2,0	2,0	2,25	2,0	2,0
	H <sub>2</sub> O (q.s.p)	100	100	100	100	100

Compritol 888 ATO<sup>®</sup> = behenato de glicerila; TCM = triglicerídeo de cadeia média; Tween 80 = polissorbato 80; Span 80 = monooleato de sorbitano.

Figura 12 - Representação esquemática da preparação de CLN



Fonte: Produzida pelo autor utilizando Biorender<sup>®</sup>.

As formulações foram diluídas na proporção de 1:100 em água ultrapura e caracterizadas. O diâmetro médio das partículas foi determinado por DLS utilizando Zetasizer ZS90 a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. Determinou-se o PZ por meio da técnica de DLS acoplada à mobilidade eletroforética. As medidas também foram realizadas utilizando-se equipamento Zetasizer ZS90 à temperatura de 25°C.

O teor de encapsulação (TE) foi determinado pelo método de ultrafiltração descrito a seguir, sendo calculado pela fórmula apresentada a seguir (4):

$$TE (\%) = \frac{RN104 \text{ total} - RN104 \text{ ultrafiltrado}}{RN104 \text{ total}} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

*RN104 total* = RN104 solúvel em água mais aquela encapsulada nos CLN.

*RN104 ultrafiltrado* = RN104 solúvel em água após ultrafiltração realizada com dispositivo Amicon<sup>®</sup> 100K.

Para a análise do RN104 total apresentado na fórmula (4), uma alíquota de 35 µL da formulação foi transferida para balão volumétrico 2 mL. Foram adicionados 500 µL de THF ao balão para que a solubilização dos CLN ocorresse. Em seguida, o volume do balão foi completado com ACN 1% HCl 0,1 M. A dispersão foi centrifugada a 9400 g por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída 2,5 vezes com ACN 1% HCl 0,1 M e analisada por CLAE conforme método validado e descrito no item 4.2.1. Já para a análise do RN104 no ultrafiltrado, a concentração de RN104 foi avaliada após a ultrafiltração realizada com o dispositivo Amicon<sup>®</sup> 100K submetido à centrifugação a 9400 g por 10 minutos. Os dispositivos de ultrafiltração foram mantidos em contato com uma solução aquosa de Tween 20 5% p/v por 12 horas para passivação de suas membranas. Após esse período, as membranas foram lavadas com água ultrapura, por 5 vezes, para eliminar o excesso dessa solução. Uma alíquota do ultrafiltrado foi diluída 1,5 vezes com ACN 1% HCl 0,1 M e analisada por CLAE conforme método validado e descrito no item 4.2.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese do composto RN104

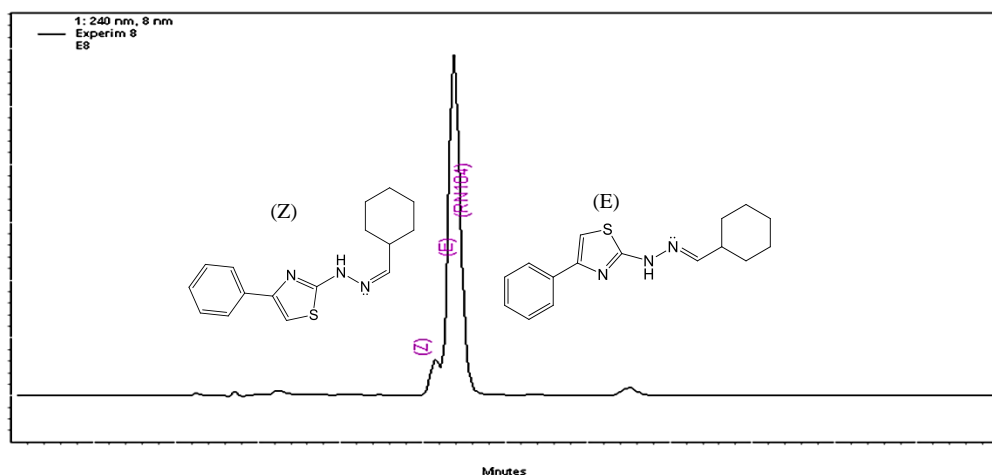
O intermediário de síntese RN103 obtido foi purificado em coluna de sílica e após purificação obteve-se um rendimento de 77%. Na segunda etapa da síntese, o RN104 foi obtido com um rendimento de 83%, na forma de um sólido de cor amarelo ocre. RN104 foi caracterizado por meio de análises de seus espectros na região do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV), bem como de sua faixa de fusão que estava em concordância com o anteriormente publicado (F.F. = 138,5 a 140,1 °C). A pureza do RN104 sintetizado foi 96,40%.

### 4.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de RN104 nas formulações

Definiu-se o uso de uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm), com tamanho de poro de 95 Å e tamanho de partícula 5 µm da marca Agilent®. Como o composto RN104 é altamente lipofílico, testaram-se diferentes composições de fase móvel contendo altas proporções de ACN para evitar uma provável precipitação no interior da coluna. Para o desenvolvimento do método, partiu-se de um método previamente publicado por nosso grupo de pesquisa (SILVA *et al.*, 2022). As condições inicialmente testadas foram ACN: H<sub>2</sub>O (85: 15) com fluxo de 1,0 mL/min, 20 µL de injeção, temperatura de forno 30°C com detecção de DAD a 240 nm de uma solução de RN104 na concentração de 100 µg/mL. Porém, como a redução no tamanho da coluna de 250 mm para 150 mm, não foi possível obter resolução entre os isômeros *Z* e *E* do RN104 (Figura 13).

As tiossemicarbazonas (intermediário de síntese do RN104), por possuírem a ligação carbono-nitrogênio, apresentam equilíbrio dinâmico das formas *E* e *Z*. Em geral, a proporção dos isômeros depende do grupo funcional ao qual o precursor utilizado pertence. Aquelas originadas a partir de aldeídos, majoritariamente, geram isômeros *E*, termodinamicamente mais estáveis, enquanto na utilização de cetonas assimétricas, a formação dos isômeros relaciona-se com os substituintes ligados à carbonila (COSTA *et al.*, 2003).

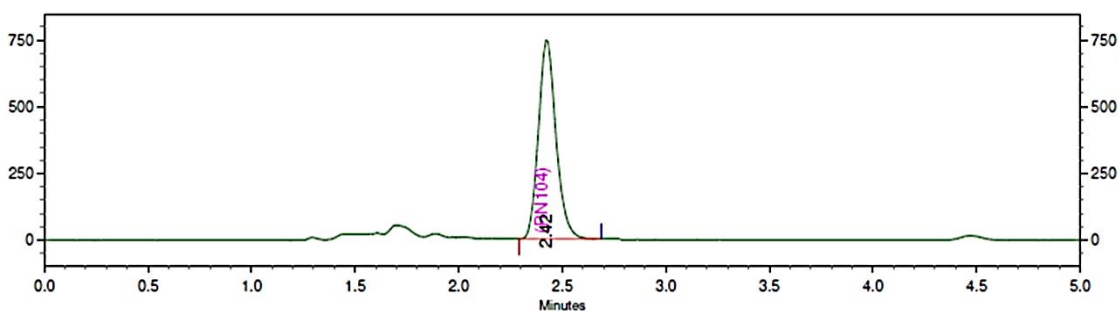
Figura 13 - Cromatograma obtido a partir de solução de RN104 a 100 µg/mL, com fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O (85: 15), fluxo de 1,0 mL/min, 20 µL de injeção, com detecção de DAD a 240 nm



Fonte: Dados da pesquisa.

Como todos os estudos seguintes do composto RN104 seriam com a mistura dos isômeros *Z* e *E* (na proporção aproximada de 6: 94), decidiu-se desenvolver um método em que ambos eluíssem juntos, assim obtendo um único pico cromatográfico. Para isso, realizou-se a acidificação da ACN com HCl 0,1 M e alteração das proporções dos solventes, obtendo-se como fase móvel a mistura de ACN com 0,5% de HCl 0,1 M : H<sub>2</sub>O na proporção de 90:10, em um fluxo de 1 mL/min. Assim, RN104 apresentou nessas condições um tempo de retenção de 2,4 minutos (Figura 14).

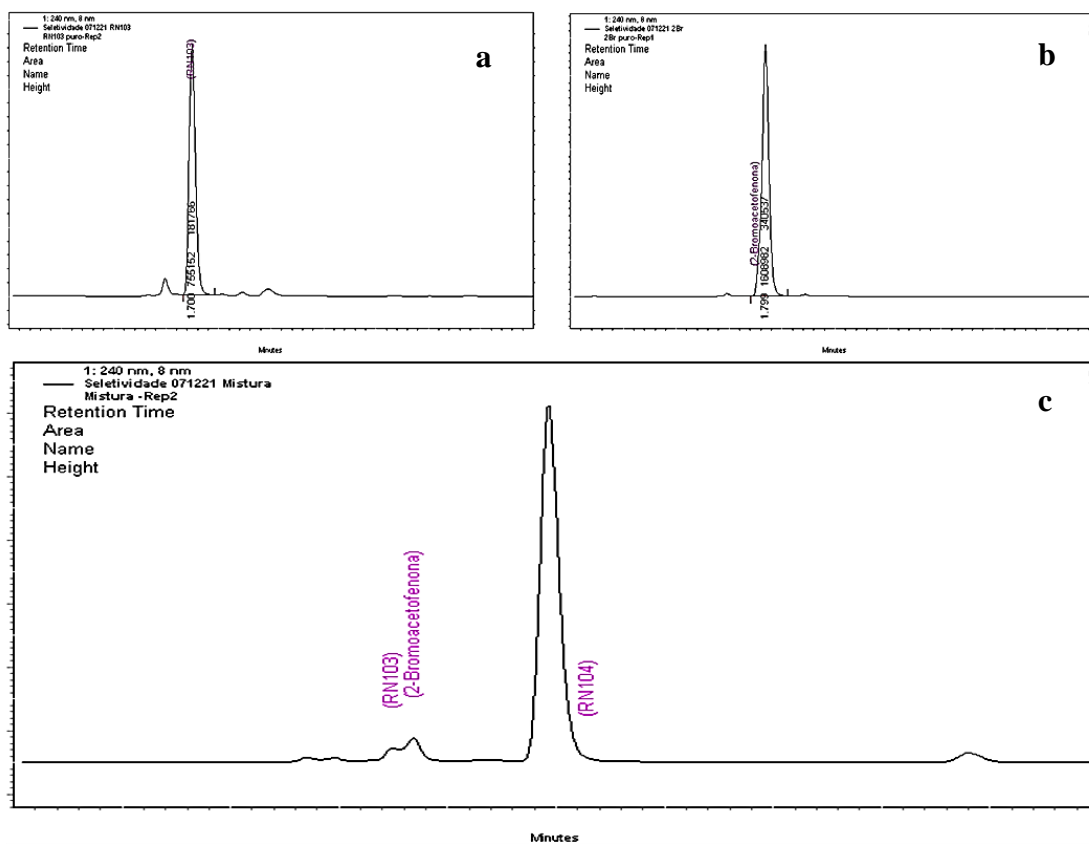
Figura 14 – Cromatograma obtido para RN104; a 100 µg/mL, 10 µL injetados utilizando uma coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, 95 Å) Agilent® a 40 °C e fase móvel composta ACN 0,5% HCl 0,1 M : H<sub>2</sub>O (90: 10) com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 240 nm



Fonte: Dados da pesquisa.

Para verificar se o método desenvolvido era capaz de identificar os materiais de partida, realizou-se a injeção de soluções das substâncias isoladas e misturadas de RN104 a 100 µg/mL, RN103 e 2-bromoacetofenona a 20 µg/mL (Figura 15).

Figura 15 - Cromatogramas obtidos a partir da análise de seletividade. **a** – Cromatograma referente ao RN103 (TR = 1,7 min) na concentração de 20 µg/mL; **b** – Cromatograma referente a 2-bromo-acetofenona (TR = 1,8 min) na concentração de 20 µg/mL; **c** – Cromatograma referente a injeção da mistura das soluções de RN103, 2-bromoacetofenona e RN104 (100 µg/mL; TR = 2,4 min)



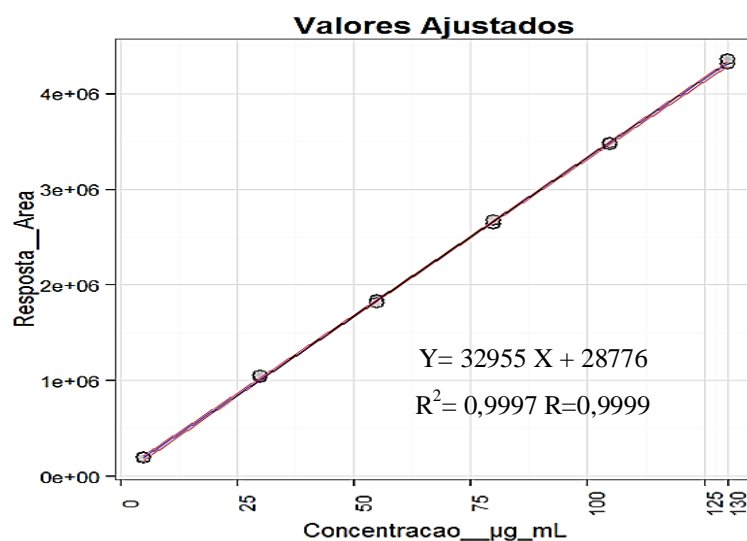
Fonte: Dados da pesquisa.

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas, seguiu-se a validação do método analítico segundo a RDC n°166 de 24 de julho de 2017.

Avaliou-se a linearidade do método por meio da análise de três curvas analíticas, cada uma com seis níveis, sendo as concentrações de 5 a 130 µg/mL (5 a 130% da concentração de trabalho). Construiu-se a curva analítica com os valores de área dos picos de RN104 em cada nível de concentração (Figura 16). O modelo estatístico utilizado foi o método dos mínimos quadrados ordinários. Para aplicá-lo, foram testadas

algumas premissas básicas e a primeira delas foi o teste de *outliers* utilizando o método de Jackknife. Nenhum *outlier* foi identificado e seguiu-se a avaliação da normalidade dos resíduos aplicando o método de Ryan & Joiner; avaliou-se a independência dos resíduos pelo método de Durbin – Watson e analisou-se a homocedasticidade dos resíduos por Levene modificado ou método de Brown – Forsythe (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Os resultados obtidos a partir desses testes estão resumidos na Tabela 14.

Figura 16 - Curva analítica obtida por CLAE-DAD para RN104 na faixa de concentração de 5 a 130 µg/mL



Fonte: Dados da pesquisa, Action Stat®.

Analisando os resultados estatísticos apresentados na Tabela 14, observa-se que *outliers* e os demais resíduos cumpriram as especificações dos testes. Um gráfico de dispersão de resíduos *versus* as concentrações do RN104 foi construído e observa-se que há a distribuição aleatória, não apresentando qualquer tendência (Figura 17 a), bem como a independência desses resíduos em relação à posição da observação no tempo das análises (Figura 17 b). Assim, o método apresentou linearidade adequada.

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para avaliação da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os resultados desse teste estatístico estão resumidos da Tabela 15 e demonstraram que a regressão foi significativa e que não houve desvio de linearidade.

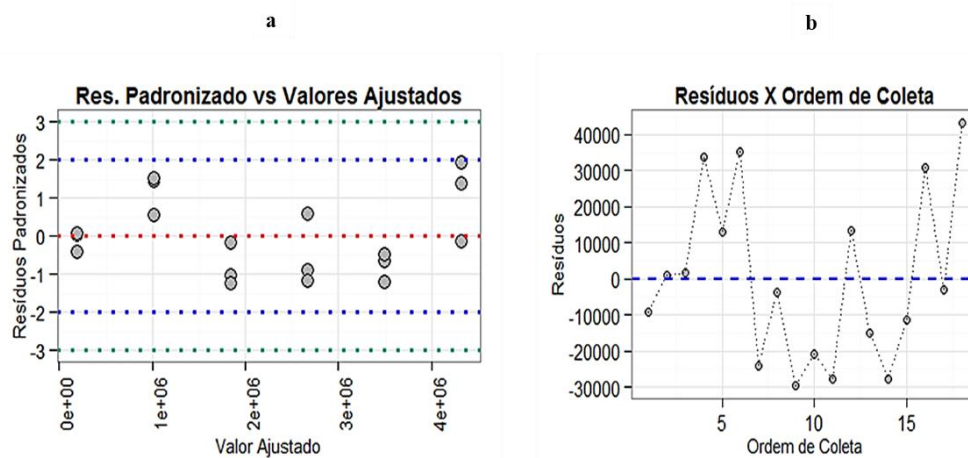
Para o teste de significância da regressão, o valor de F calculado ( $6,05 \times 10^4$ ) foi maior que o  $F_{\text{crítico}}$  (4,50), indicando que a regressão linear é significativa. Já para o teste do desvio da linearidade, o valor de F (-2,20) foi menor que o  $F_{\text{crítico}}$  (3,20), indicando

que não há desvio da linearidade. Dessa forma, segundo a legislação vigente, é possível afirmar que o parâmetro linearidade do método desenvolvido foi validado.

Tabela 14 - Resultados dos testes estatísticos para avaliação das premissas básicas para a linearidade

PARÂMETRO	AMOSTRAS AVALIADAS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Teste de <i>outliers</i>	18 resíduos das três curvas analíticas construídas com seis níveis de concentração cada.	<i>Outliers</i> < 22% (ou seja, menos que 4 pontos) ( $\alpha = 0,05$ )	Nenhum <i>outlier</i> foi retirado.
Normalidade dos resíduos	18 resíduos	$R \geq R_{\text{crítico}}$ ( $0,97 \geq 0,94$ ) ( $\alpha = 0,05$ )	Os resíduos seguem a distribuição normal
Independência dos resíduos	18 resíduos	$d_u < d < 4-d_u$ ( $1,39 < 1,46 < 2,60$ ) ( $\alpha = 0,05$ )	Os resíduos são independentes.
Homocedasticidade dos resíduos	18 resíduos	$t \leq t_{\text{crítico}}$ ( $0,62 \leq 2,12$ ) ( $\alpha = 0,05$ )	Há homocedasticidade

Figura 17 - Distribuição dos resíduos das curvas analíticas. **a** – dispersão dos resíduos *versus* concentração RN104; **b** – resíduos *versus* posição da observação no tempo



Fonte: Dados da pesquisa, Action Stat®.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) para avaliação da significância da regressão e do desvio da linearidade

Fonte de variação (FV)	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	F <sub>crítico</sub> ( $\alpha=0,05$ )
Regressão	1	$3,56 \times 10^{13}$	$3,56 \times 10^{13}$	$6,05 \times 10^4$	4,50
Resíduo	16	$9,42 \times 10^9$	$5,89 \times 10^8$	-	-
Desvio da linearidade	5	$2,11 \times 10^{13}$	$4,23 \times 10^{12}$	-2,20	3,20
Entre níveis	6	$5,68 \times 10^{13}$	-	-	-
Erro puro	11	$-2,11 \times 10^{13}$	$-1,92 \times 10^{12}$	-	-
Total	17	$3,56 \times 10^{13}$	-	-	-

Na precisão intracorrida ou repetibilidade, as amostras foram preparadas por um mesmo analista e analisadas em uma mesma corrida analítica (n=6). O teor médio determinado foi de 102,85%, a partir da equação da reta, com DPR de 2,76%. Já a precisão intercorrida ou precisão intermediária difere do teste anterior por ter as amostras preparadas por analistas distintos e preparadas em dois dias diferentes (n=12). O teor médio foi de 102,36% com DPR igual a 2,73%. Os resultados estão apresentados da Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados de precisão para o método analítico por CLAE-DAD.

<b>Parâmetro</b>	<b>Dia 1 – Teor (%)</b>	<b>Dia 2 – Teor (%)</b>
	105,83	98,20
	98,46	98,69
Teor das replicatas (%)	103,13	103,58
	106,03	104,51
	101,55	101,39
	102,13	104,81
Teor médio (%)	102,85	102,36
	(Precisão intracorrída n = 6)	(Precisão intercorrída n = 12)
DPR (%)	2,76	2,73

O critério de aceitação do ensaio de precisão não está descrito na legislação brasileira vigente. Assim, segundo os critérios estabelecidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), o método desenvolvido pode ser considerado preciso por apresentar  $DPR \leq 5,3\%$  (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

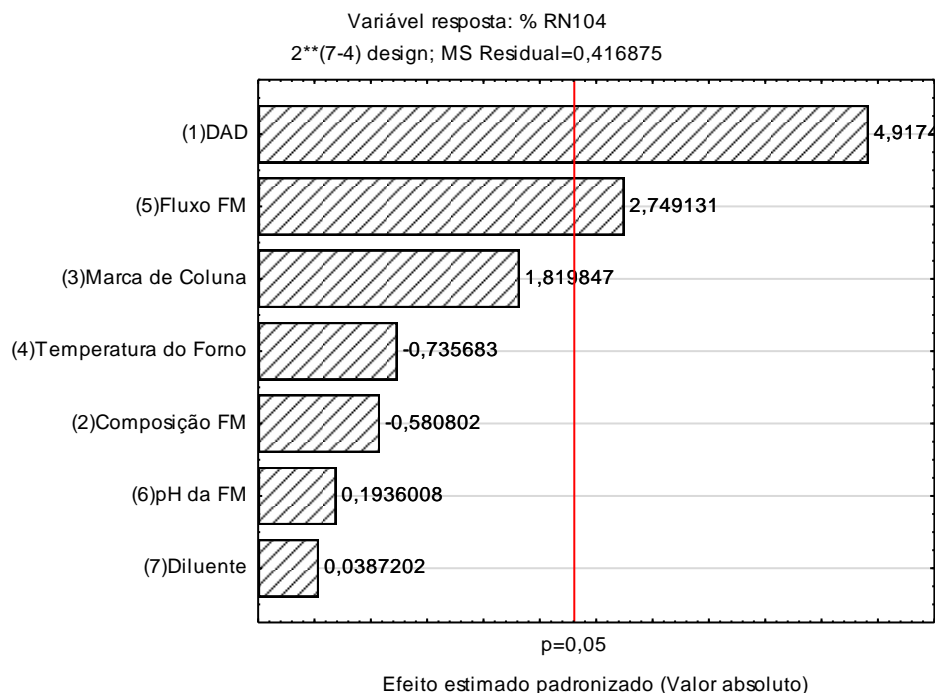
A exatidão foi verificada por meio de nove determinações que contemplaram a faixa linear de trabalho, sendo três réplicas de cada concentração (30, 80 e 130 % da concentração de trabalho). A exatidão foi avaliada por meio da recuperação (conforme equação 1), pois como RN104 é uma substância nova, não há padrão comercial disponível para utilização do método de adição de padrão. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 17. Os valores de recuperação entre 90 % e 107% (média = 102,43%) e  $DPR \leq 5,3\%$  ( $DPR = 1,01\%$ ) indicam que o método desenvolvido apresentou exatidão adequada para a quantificação do RN104 (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

Tabela 17 - Resultados de exatidão para o método analítico por CLAE-DAD

<b>Nível</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Recuperação média (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
	103,31		
Baixo (30%)	103,61	103,39	0,16
	103,33		
	101,01		
Médio (80%)	102,94	102,37	1,16
	103,17		
	101,97		
Alto (130%)	101,53	101,56	0,39
	101,17		
Média	-	102,43	1,01

No teste de robustez, foi calculado efeito de cada fator sobre o doseamento do RN104 na amostra, gerando um gráfico de Pareto (Figura 18). Os valores de contrastes menores que o valor de 2,306 (*t Student*;  $n = 8$  e nível de confiança de 95%) não influenciam significativamente na resposta analítica e, então, o método é considerado robusto para as variáveis consideradas dentro do domínio experimental testado. Os resultados mostram que das sete variáveis, apenas a alteração do comprimento de onda de detecção e o fluxo da fase móvel são considerados fatores relevantes e requerem atenção no momento de aplicação do método em questão.

Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados sobre a variável resposta % do RN104



Fonte: Dados da pesquisa, Statistica®.

Utilizando as fórmulas já apresentadas, o LD calculado foi de 0,30  $\mu\text{g/mL}$  e o LQ calculado 0,99  $\mu\text{g/mL}$ . A partir dos valores calculados, realizou-se a determinação experimental do LQ e LD com base na relação sinal/ruído. Para o LQ a relação sinal ruído deve ser 10:1, já para LD 3:1. Para tal, realizou-se diluições sequenciais de uma solução de RN104 e o LD experimental foi 0,20  $\mu\text{g/mL}$  e LQ experimental 0,70  $\mu\text{g/mL}$ . Os LD e LQ encontrados pela razão sinal/ruído foram consideravelmente menores do que àqueles calculados pela equação e se aproximam mais dos valores reais, já que foram obtidos a partir da resposta de soluções diluídas.

A sensibilidade de um método analítico está relacionada à variação mínima que é preciso impor a concentração da solução para se obter uma variação significativa na resposta (sinal). Assim, o método validado é sensível, pois uma concentração de 0,70  $\mu\text{g/mL}$  é capaz de produzir resposta satisfatória, sendo muito inferior ao primeiro ponto da faixa de trabalho que é de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

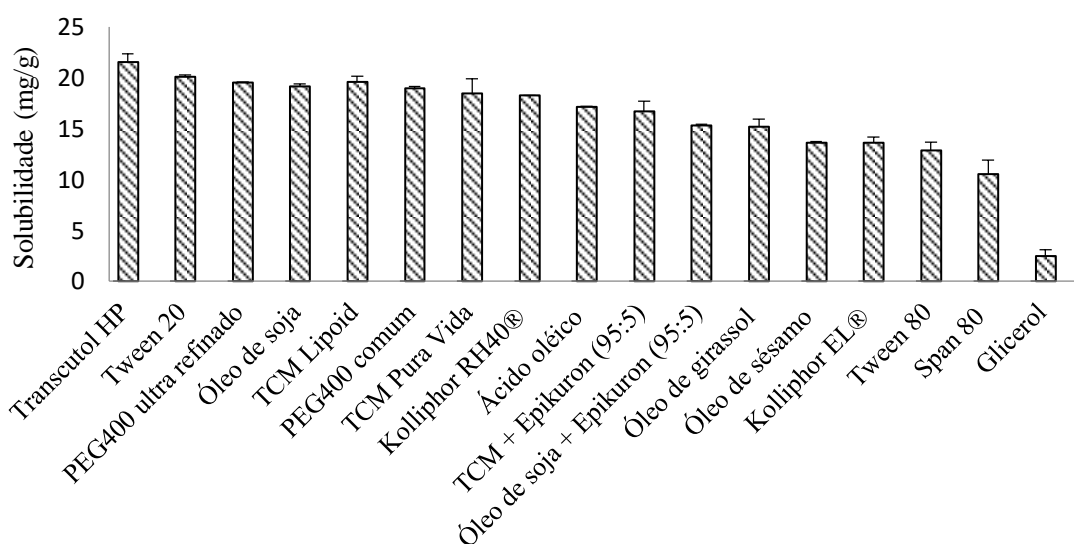
A seletividade de um método baseia-se na capacidade de quantificar o analito na presença de outros componentes de uma amostra. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, uma vez que nenhum pico interferente do solvente (branco) ou dos excipientes

eluiu no tempo de retenção do RN104. Além disso, o índice de pureza de pico calculado pelo Software Class-VP<sup>®</sup> apresentou valores superiores a 0,97 em todas as análises realizadas.

### 4.3 Solubilidade do RN104 em diferentes excipientes

Os resultados obtidos para a solubilidade do RN104 nos constituintes do SEDDS estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Solubilidade máxima do RN104 em diferentes constituintes do SEDDS (média  $\pm$  desvio padrão; n=3)



Fonte: Dados da pesquisa, Statistica<sup>®</sup>.

A solubilidade do RN104 no óleo de soja (19,13 mg/g) e no TCM (18,44 mg/g) foram estatisticamente iguais. Enquanto a solubilidade no Tween 20 (polissorbato 20) (20,11 mg/g) foi a maior dentre os surfactantes seguido do Kolliphor RH40<sup>®</sup> (óleo de rícino hidrogenado polioxil 40) (18,31 mg/g) e do Tween 80 (polissorbato 80) (12,89 mg/g). Dentre os cossolventes, PEG 400 (polietilenoglicol 400) (18,99 mg/g) e Transcutol<sup>®</sup> HP (éter monoetílico de dietilenoglicol) (21,50 mg/g) não apresentaram diferença estatística na capacidade de solubilizar o RN104.

### 4.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações

#### 4.4.1 SEDDS

A partir dos resultados obtidos nos testes de solubilidade do RN104, inicialmente, o óleo de soja (EHL = 7,0) e os surfactantes Kolliphor RH40<sup>®</sup> (óleo de rícino hidrogenado polioxil 40) (EHL = 14-16) e Tween 20 (polissorbato 20) (EHL = 16,7) foram escolhidos para compor as formulações brancas. Pretendia-se avaliar a influência do Span 80 (monooleato de sorbitano) (cossurfactante, EHL = 4,0) e do PEG400 (cossolvente) sobre o tamanho dos glóbulos e PDI das emulsões formadas após a dispersão dos SEDDS. Como nenhuma das 12 formulações brancas preparadas inicialmente (descritas na Tabela 9) mantiveram-se isotrópicas após 24 horas do preparo, avaliou-se então outras composições e proporções mantendo óleo de soja como excipiente base.

O óleo de soja é um triglicerídeo de cadeia longa (TCL) que possui como constituintes principais o ácido linoleico (cerca de 50%), o ácido oleico (cerca de 23%) e o ácido linolênico (7%) (SILVA *et al.*, 2006). Os TCL, geralmente, não são miscíveis com surfactantes hidrofílicos ou cossolventes e, portanto, na prática, faz-se necessário misturar outro tipo de óleo ou adicionar cossurfactantes de menores valores de EHL (GURRAM *et al.*, 2015).

Assim, dado a solubilidade equivalente do RN104 em TCM, avaliou-se o efeito de sua adição, bem como de outros surfactantes (Tween 80, polissorbato 80, EHL = 15) e cossolventes (Transcutol HP, éter monoetílico de dietilenoglicol) na isotropia dos sistemas formulados, descritos na Tabela 10. Dentre as novas 10 formulações preparadas, apenas F28 e F32 mantiveram-se estáveis após 24 horas do preparo. Porém, após 48 horas e 72 horas observou-se separação de fases para ambas, respectivamente. Considerando o que esses dois SEDDS tinham em comum, verificou-se que o TCM estava em maior concentração do que o óleo de soja. A partir dessa observação experimental, combinada ao relato da literatura de que o TCL apresenta dificuldade de miscibilidade com surfactantes hidrofílicos (EHL >12), além da dificuldade de microemulsionar quando comparado ao TCM (PATRAVALE & DATE, 2009), decidiu-se trocar a base oleosa do SEDDS para o TCM.

Os lipídeos que possuem cadeias de ácidos graxos de 6 a 12 carbonos são chamados de TCM. Eles são a mais comum escolha de óleo para a formulação de SEDDS, pois possuem certa resistência à oxidação e possuem alta capacidade solvente devido à alta concentração efetiva de grupos éster. O TCM produzido a partir da destilação do óleo de coco é composto por ácidos graxos saturados C8 (ácido caprílico)

e C10 (ácido cáprico) no estado líquido (PRAJAPATI *et al.*, 2011; GURRAM *et al.*, 2015).

Das formulações desenvolvidas com base no TCM, apenas F32 (55% de TCM; 40% de Tween 80 e 5% de Span 80), descrita na Tabela 11, manteve-se isotrópica após 24 horas de preparo e também apresentou  $T_e$  satisfatório ( $< 60$  s). Então, realizou-se a partir de F32, pequenas variações de concentração dos componentes e também a adição de 0 a 5% de PEG400 (cossolvente) (formulações descritas na Tabela 12, Figura 20), a fim de avaliar os impactos no tamanho de partícula, PDI e PZ após a dispersão em água ultrapura.

Apenas as formulações F33, F34 e F35 brancas, descritas na Tabela 12, apresentaram resultados satisfatórios de isotropia 24 horas após o preparo e  $T_e$  inferior a 60 segundos, quando dispersas em água ultrapura. Elas assemelham-se, em sua composição, como do Tipo IIIA de acordo com o sistema de classificação de formulações lipídicas de Pouton (POUTON, 2006), uma vez que possuem mais de 40% de óleo, surfactante de maior proporção de EHL  $> 12$  podendo ou não conter um cossolvente.

Figura 20 - Imagem representativa das formulações SEDDS-brancas



Fonte: Dados da pesquisa.

Assim, as emulsões formadas a partir da dispersão em água ultrapura (1: 200) de F33 F35 e F35 brancas foram avaliadas quanto ao tamanho médio de partícula, PDI e PZ e os resultados estão apresentados na Tabela 18. As diferenças entre todas as medidas foram avaliadas estatisticamente pela aplicação do teste de normalidade seguido por ANOVA de uma via com medidas repetidas seguido de teste de Tukey (Software Past<sup>®</sup> 3.26; HAMMER, HARPER & RYAN, 2001) a um nível de significância de 95%.

Tabela 18 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após a dispersão (1:200) dos SEDDS brancos F33, F34 e F35 em água ultrapura (média  $\pm$  desvio padrão, n=3)

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
F33	115,30 $\pm$ 1,55	0,16 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	-23,65 $\pm$ 0,78
F34	120,43 $\pm$ 2,23	0,24 $\pm$ 0,01	-23,90 $\pm$ 0,28
F35	125,23 $\pm$ 4,44 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,01	-19,60 $\pm$ 0,85 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> diferença significativa comparada a F33;

<sup>b</sup> diferença significativa comparada a F34 e F35;

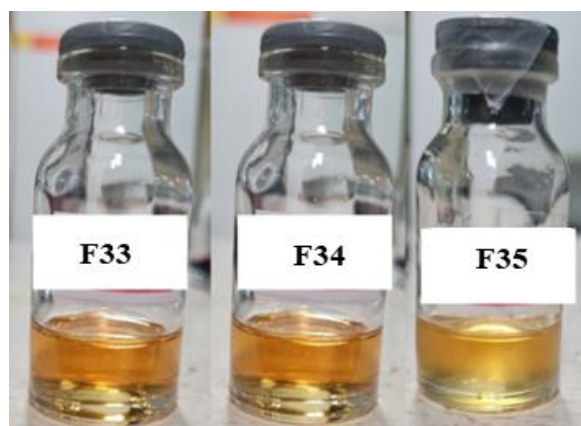
<sup>c</sup> diferença significativa comparada a F33 e F34; p<0,05.

Pode-se observar que houve diferença significativa entre o tamanho médio das partículas das emulsões formadas. F35 tem tamanho significativamente maior que as formulações F33 e F34. Já para os valores de PDI, F33 apresentou-se estatisticamente mais homogênea que as demais. A presença do co-solvente PEG 400 nas concentrações testadas não foi capaz de promover a formação de emulsões mais homogêneas e nem de reduzir o tamanho das gotículas. Observou-se também que as formulações F33 e F34 diferem de F35 em relação ao PZ.

Para o aumento da biodisponibilidade oral, o impacto do tamanho dos glóbulos formados a partir da emulsificação da formulação ainda é discutido. Isso se deve aos poucos estudos publicados sobre administrações *in vivo*, em que variam apenas o tamanho das partículas sem variações nos excipientes e suas concentrações (CHATTERJEE *et al.*, 2016). Porém, a maioria dos artigos publicados sobre SEDDS destaca que a dispersão em nanoescala é um dos principais fatores por trás de uma melhor absorção do fármaco, em comparação a uma solução ou suspensão comum (GURSOY & BENITA, 2004; RAHMAN *et al.*, 2013; CHATTERJEE *et al.*, 2016; RANI *et al.*, 2019).

O RN104 foi incorporado a cada SEDDS-branco obtendo-se formulações de cor amarelo ocre (Figura 21) de concentração 10mg/mL. Após 24 horas, avaliou-se, então, os parâmetros físico-químicos e o TE (%) das emulsões formadas após a dispersão em água (Tabela 19).

Figura 21 - Imagem representativa das formulações SEDDS-RN104 imediatamente após o preparo



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 19 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após a dispersão (1:200) dos SEDDS-RN104 F33, F34 e F35 em água ultrapura (média  $\pm$  desvio padrão; n=3)

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor de encapsulação (%)</b>
F33-RN104	114,60 $\pm$ 2,09	0,18 $\pm$ 0,01	-13,30 $\pm$ 0,28	85,52 $\pm$ 0,16
F34-RN104	193,17 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	-12,85 $\pm$ 0,07	82,39 $\pm$ 1,49
F35-RN104	167,20 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	-9,82 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	79,77 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> diferença significativa comparada a F33; <sup>b</sup> diferença significativa comparada a F33 e F34; p<0,05.

F33-RN104 apresentou tamanho de glóbulo e PDI significativamente menores que as demais formulações. F35-RN104, por outro lado, apresentou valores de PZ (em módulo) e TE significativamente menores quando comparada aos outros SEDDS. A presença de um cossolvente (PEG 400) nas concentrações testadas (0 a 5%) não foi capaz de impactar positivamente nos parâmetros avaliados referentes ao SEDDS-RN104. Esperava-se que a presença do cossolvente promovesse a formação de partículas de menor tamanho, uma vez que ele promove um aumento da difusão da fase oleosa para a fase aquosa levando a formação de microemulsões muito finas (POUTON, 1997; POUTON, 2000; RANI *et al.*, 2019). Porém, F35 que continha a maior concentração de PEG 400 (5%) não apresentou isotropia 24 horas após o seu preparo.

A fim de avaliar *in vitro* o comportamento de cada SEDDS no TGI, realizou-se a dispersão em diferentes meios simulados e avaliou-se os parâmetros físico-químicos conforme apresentados na Tabela 20. Após a realização das medidas realizadas no

Zetasizer, as emulsões foram filtradas em membrana 0,45 µm e o filtrado foi utilizado na determinação do teor de encapsulação (%).

Tabela 20 - Parâmetros físico-químicos das emulsões formadas após dispersão (1: 200) dos SEDDS-RN104 F33, F34 e F35 em diferentes meios simulados (média ± desvio padrão; n=3)

	Tamanho de partícula (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Teor de encapsulação (%)
<b>MSG</b>				
F33-RN104	190,27±0,74	0,24±0,02	-1,23±0,61	85,08±3,50
F34-RN104	220,97±3,29 <sup>a</sup>	0,24±0,01	-1,22±0,06	74,83±0,09 <sup>a</sup>
F35-RN104	210,00±3,36 <sup>a</sup>	0,23±0,03	-1,20±0,19	77,12±0,75
<b>MSG-pepsina</b>				
F33-RN104	218,00±3,69	0,25±0,02	-0,76±0,15	100,55±0,04
F34-RN104	147,13±4,13 <sup>a</sup>	0,23±0,01	-0,60±0,15	77,76±0,68 <sup>a</sup>
F35-RN104	202,43±7,63 <sup>a</sup>	0,23±0,01	-0,60±0,09	78,61±1,22 <sup>a</sup>
<b>MSI</b>				
F33-RN104	202,97±5,60	0,20±0,01	-1,25±0,11	102,72±1,26
F34-RN104	220,53±5,23 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	-1,41±0,08	98,24±0,17 <sup>a</sup>
F35-RN104	271,17±8,21 <sup>a,b</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	-1,42±0,11	85,67±1,53 <sup>a,b</sup>
<b>MSI-pancreatina</b>				
F33-RN104	195,70±6,39	0,29±0,01	-28,9±0,81	100,27±0,03
F34-RN104	298,30±2,91 <sup>a</sup>	0,33±0,03	-23,6±2,83 <sup>a</sup>	99,28±0,04 <sup>a</sup>
F35-RN104	167,30±2,36 <sup>a,b</sup>	0,32±0,04	-23,6±1,84 <sup>a</sup>	100,64±0,05 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> diferença significativa comparada a F33; <sup>b</sup> diferença significativa comparada F34; p<0,05; MSG = meio simulado gástrico (pH=1,2); MSI = meio simulado intestinal (pH = 6,8)

Pode-se notar que F33-RN104 apresentou os melhores resultados nos meios testados. As emulsões obtidas a partir das dispersões produziram partículas monodispersas (IP < 0,3) com tamanhos maiores que 100 nm confirmando a formação de emulsão em escala nanométrica. O TE (%), nos diferentes meios, do RN104 na formulação F1 mostrou-se estatisticamente superior às demais. Os valores, em módulos, de PZ das partículas formadas foram reduzidos no meio que contém pepsina e aumentados na presença da pancreatina, o que pode ser atribuído a natureza de cada enzima.

A pepsina foi estudada pela primeira vez em 1835 pelo naturalista Theodor Schwann. Ela é uma protease monomérica com elevada porcentagem de resíduos ácidos

possuindo peso molecular de 34,5 kDa. O seu sítio catalítico contém dois resíduos de ácido aspártico (Asp32 e Asp 215) e é inativada em  $\text{pH} > 7,0$  (ANDREEVA & RUMSH, 2001; FRUTON, 2002). Ainda que SEDDS não contenham proteínas, é relevante determinar seu comportamento na presença dessa enzima, uma vez que a administração dessas formulações é comumente realizada em cápsulas.

A pancreatina é uma mistura de diferentes enzimas, incluindo proteases, amilases e lipases que desempenham papel fundamental no processo de digestão. A lipase pancreática é a principal enzima envolvida na decomposição de triglicerídeos. Experimentos de lipólise com lipase e pancreatina revelaram a maior liberação de ácidos graxos para TCM, seguidos TCL e surfactantes (ZÖLLER *et al.*, 2022). Avaliando os resultados obtidos na presença de pancreatina, é possível notar que há uma maior dispersão no tamanho das partículas em relação aos demais meios testados. Uma hipótese é que devido à degradação da matriz lipídica, emulsões de diferentes tamanhos de partícula coexistam, bem como micelas. O maior valor negativo de PZ observado na presença da pancreatina também chama a atenção. Provavelmente, isso ocorre também devido à presença dos ácidos graxos do TCM que no pH do meio intestinal estão desprotonados.

A fim de avaliar a estabilidade dos SEDDS-RN104 (armazenados à temperatura ambiente), procedeu-se à análise do teor do RN104 nos intervalos de tempo de 0, 30, 45 e 60 dias. Os dados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Teor do RN104 no SEDDS-RN104 antes da dispersão  
(média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Formulação</b>	<b>t=0 dias</b>	<b>t=30 dias</b>	<b>t=45 dias</b>	<b>t=60 dias*</b>
F33-RN104	96,55 $\pm$ 0,30	95,03 $\pm$ 0,52	95,13 $\pm$ 0,30	84,06 $\pm$ 0,35
F34-RN104	95,60 $\pm$ 0,80	93,07 $\pm$ 0,12	93,15 $\pm$ 0,18	83,41 $\pm$ 0,07
F35-RN104	92,64 $\pm$ 0,10	92,14 $\pm$ 0,10	92,45 $\pm$ 0,04	76,10 $\pm$ 0,02

\* representa diferença significativa comparada aos demais tempos avaliados;  $p < 0,05$ .

Após 60 dias do preparo das formulações o teor do RN104 foi significativamente menor do que aquele medido no tempo zero para todas as formulações avaliadas. A coloração das formulações alterou-se ao longo do tempo e com 60 dias apresentavam-se marrom avermelhada, mas sem a presença de precipitação (Figura 22). RN104 é uma molécula susceptível a degradação por diversos mecanismos,

inclusive por oxidação, o que pode explicar os resultados observados (SILVA *et al.*, 2022).

Figura 22 - Imagem representativa das formulações SEDDS-RN104 após 60 dias de preparo



Fonte: Dados de pesquisa.

Diante de todos os resultados apresentados, a F1-RN104 mostrou-se como a mais promissora formulação SEDDS.

#### 4.4.2 CLN

Após o preparo dos CLN-branco, o tamanho de partícula, PDI e PZ das formulações foram medidos (diluição de 1: 100) e os resultados estão apresentados na Tabela 22. As formulações foram acondicionadas em frascos âmbar a temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio.

Tabela 22 - Parâmetros físico-químicos CLN brancos (1: 100)

(média  $\pm$  desvio padrão; n=3)

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Aspecto visual</b>
F1-branco	112,70 $\pm$ 3,61	0,15 $\pm$ 0,01	-7,58 $\pm$ 0,81	branco leitoso
F2-branco	36,19 $\pm$ 0,77	0,24 $\pm$ 0,03	-16,10 $\pm$ 0,28	transparente
F3-branco	247,70 $\pm$ 3,25	0,33 $\pm$ 0,03	-10,74 $\pm$ 0,33	branco leitoso
F4-branco	256,10 $\pm$ 4,40	0,54 $\pm$ 0,03	-13,40 $\pm$ 0,99	branco leitoso
F5-branco	262,30 $\pm$ 3,68	0,80 $\pm$ 0,02	-13,89 $\pm$ 0,36	branco leitoso

Dos cinco CLN brancos preparados, F4 e F5 apresentaram maiores valores de PDI. Para ambas as formulações, observou-se que partículas de tamanho reduzido ( $< 15$

nm) coexistiam a outras de tamanho maiores. Isso pode ser explicado pela formação de micelas dado a alta concentração de surfactante presente na composição das formulações (Tabela 13). Essa formação ocorre porque à medida que há o aumento na concentração das moléculas de surfactante, a interface se destina a saturação e ao acúmulo dessas moléculas, que após atingir esse ponto de saturação interfacial, associam-se formando micelas. A concentração mínima para a formação delas é denominada concentração micelar crítica (CMC) e pode ser considerada uma propriedade fundamental dos surfactantes quando em solução (AL-SOUFI & NOVO, 2021). As micelas são definidas como agregados moleculares anfifílicos que de modo espontâneo associam-se. Abaixo da CMC, os monômeros de surfactante são predominantes no sistema, mas em maiores concentrações coexistem estruturas micelares e monômeros em um equilíbrio dinâmico. Essa coexistência, mesmo que em pequena proporção, altera o valor médio de tamanho encontrado pelo DLS, além de causar aumento do PDI (MABROUK, HAMED & MANSOUR, 2022).

Já F1 e F2 apresentaram menores tamanhos de partícula e PDI, parâmetros que são altamente desejáveis para esse tipo de formulação.

Os valores de PZ das formulações de CLN variaram de -7 a -16 mV o que poderia ser um indicativo de sistemas menos estáveis quando se avalia o valor descrito na literatura como ideal (em módulo de 30 mV), porém na composição deles há a presença de Tween 80 (polissorbato 80), um surfactante hidrofílico que possui uma cadeia polimérica de óxido de etileno que confere impedimento estérico às partículas melhorando a estabilidade dos CLN (DAS & CHAUDHURY, 2011).

F1 e F2 foram selecionados a partir dos resultados dos parâmetros físico-químicos de suas formulações brancas para então carrear o RN104 (0,15% p/v ou 1,5 mg/mL). Os parâmetros físico-químicos dos CLN-RN104 são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Parâmetros físico-químicos CLN-RN104 (1: 100)

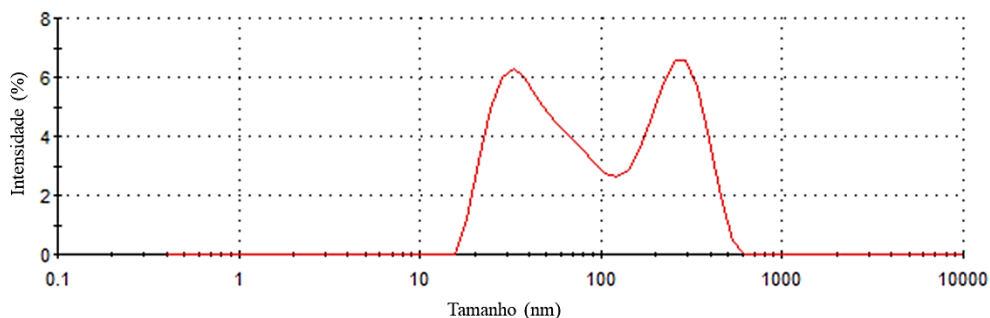
(média ± desvio padrão; n=3)

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor de Encapsulação (%)</b>	<b>Aspecto visual</b>
F1-RN104	137,00±3,93	0,45±0,02	-7,39±0,03	98,00±0,11	ocre leitoso
F2-RN104	129,60±2,47	0,22±0,01 <sup>a</sup>	-10,40±0,21 <sup>a</sup>	99,80±0,12 <sup>a</sup>	ocre leitoso

<sup>a</sup> diferença significativa comparada a F1; p<0,05.

F1-RN104 mostrou-se polidispersa com  $PDI > 0,3$  apresentando duas populações principais de partículas quando se analisou a distribuição por intensidade: cerca de 56% com diâmetro médio em torno de 50 nm e 44% em torno de 260 nm (Figura 23). F2-RN104 apresentou-se monodispersa ( $IP < 0,3$ ), com uma grande população de partículas com diâmetro médio em torno de 130 nm (Figura 24).

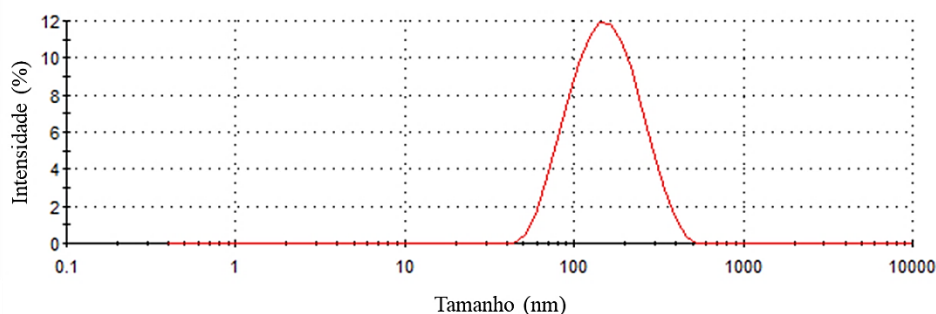
Figura 23 - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade em CLN F1-RN104



Fonte: Dados de pesquisa.

Já F2-RN104 apresentou-se monodispersa ( $IP < 0,3$ ), com uma grande população de partículas com diâmetro médio em torno de 130 nm (Figura 24).

Figura 24 - Distribuição de tamanho das partículas por intensidade em CLN F2-RN104



Fonte: Dados de pesquisa.

É interessante ressaltar que a proporção de lipídeos sólido: líquido é de 4:1 e 6:4 em F1 e F2, respectivamente. Não há diferença significativa entre os tamanhos de partícula obtidos para as formulações carregadas com RN104. Entretanto, como F2 possui maior quantidade de TCM para acomodar o ativo, pode-se observar que o tamanho de partícula do CLN carregado é muito maior que o de seu branco (SCHUBERT & MULLER-GOYMANN, 2003). F2 também apresentou eficiência de

encapsulação do RN104 significativamente superior à encontrada para F1. A maior quantidade de TCM pode ser a responsável pela maior acomodação do ativo na matriz lipídica.

Ambos CLN contendo RN104 foram avaliados quanto à estabilidade nos tempos 0, 30 e 45 dias. A eficiência de encapsulação do ativo ao longo do tempo foi avaliada, bem como o tamanho das partículas, IP e PZ. Esses resultados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Parâmetros físico-químicos CLN-RN104 (1: 100) no estudo de estabilidade (média ± desvio padrão; n=3)

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor de Encapsulação (%)</b>
<b>T = 0 dias</b>				
F1-branco	112,70±3,61	0,15±0,01	-7,58±0,81	-
F2-branco	36,19±0,77	0,24±0,03	-16,10±0,28	-
F1-RN104	137,00±3,93	0,45±0,02	-7,39±0,03	98,00±0,27
F2-RN104	129,57±2,47	0,22±0,01 <sup>a</sup>	-10,40±0,21 <sup>a</sup>	99,80±0,30 <sup>a</sup>
<b>T = 30 dias</b>				
F1-branco	111,58±2,78	0,13±0,01	-7,99±0,04	-
F2-branco	39,20±1,25	0,20±0,03	-17,25±0,32	-
F1-RN104	167,50±5,89 <sup>a</sup>	0,44±0,01	-7,78±0,02	94,61±0,60
F2-RN104	125,32±2,39	0,22±0,02	-12,20±0,25	94,51±0,07
<b>T = 45 dias</b>				
F1-branco	110,50±0,66	0,12±0,02	-10,32±0,23	-
F2-branco	43,58±0,13	0,18±0,01	-19,20±0,33	-
F1-RN104	390,30±21,65 <sup>a</sup>	0,76±0,06 <sup>a</sup>	-32,10±0,57 <sup>a</sup>	46,28±0,43 <sup>a</sup>
F2-RN104	122,80±2,29	0,23±0,02	-28,00±0,92 <sup>a</sup>	54,47±0,54 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> há diferença significativa em relação as medições realizadas nos demais tempos; p<0,05.

Os CLN brancos tiveram seus parâmetros físico-químicos estáveis ao longo dos 45 dias analisados. Porém, no aspecto visual, F1-branco apresentou um pequeno agregado de lipídeos que se dissolveu quando diluído (1:100) para realização das medidas no Zetasizer no tempo de 45 dias. Quando esses parâmetros foram analisados para CLN-RN104 F1, o tamanho de partícula foi significativamente diferente do tempo zero já em 30 dias, e mais que dobrou de tamanho 15 dias após essa medida, revelando a baixa estabilidade do sistema e sua tendência em formar agregados.

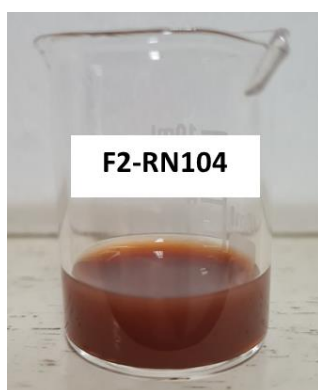
F2 mostrou-se uma formulação mais promissora, uma vez que o tamanho de partícula e PDI mantiveram-se iguais ao longo do tempo tanto para formulação branca quanto para a carregada.

É importante notar que o PZ medido aos 45 dias de F2-RN104 apresentou maior valor negativo, indicando uma possível relação com a degradação do ativo que saiu da matriz lipídica, já que esse aumento não é observado na formulação branca. Isso pode ser evidenciado pela grande redução do teor de encapsulação, de 99,8% (T = 0 dias) para 54,47% (T = 45 dias), combinado ao aumento em módulo do valor medido de PZ.

No momento do preparo, a formulação F2-RN104 apresentou uma coloração amarelo-leitosa e pH inicial de 6,3, posteriormente ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH 0,1 M. Após 45 dias, o pH da formulação diminuiu para 5,0 e sua coloração tornou-se marrom-avermelhada (Figura 25). Essa alteração de pH, não observada na formulação branca, pode estar associada à degradação da molécula de RN104.

O RN104 é uma molécula susceptível à degradação, tanto por oxidação quanto por hidrólise, conforme previamente determinado em estudos do nosso grupo (SILVA *et al.*, 2022). Assim, é um grande desafio preparar formulações aquosas que contenham RN104 e que sejam estáveis por períodos minimamente adequados diante desta característica da molécula.

Figura 25 - Imagem representativa da formulação CLN F2-RN104 após 45 dias do preparo



Fonte: Dados de pesquisa.

A constatação da alteração de pH do CLN-RN104 é um forte indício de que a molécula do RN104 sofreu degradação na formulação, de forma que a estabilidade obtida na formulação CLN foi menor do que em SEDDS.

## 5 CONCLUSÃO

Nesta etapa dos estudos, foi possível desenvolver SEDDS e CLN capazes de carrear RN104. Com base nos resultados obtidos, é evidente que o sistema autoemulsionável apresenta vantagens em relação ao CLN. Entre elas, destacam-se a maior capacidade de carga do ativo (SEDDS = 10 mg/mL; CLN = 1,5 mg/mL), maior estabilidade devido à ausência de água (SEDDS = 60 dias; CLN = 30 dias) e ainda maior facilidade de preparo e escalonamento.

Considerando os resultados alcançados, SEDDS foi escolhida como a melhor formulação na busca pela melhora na biodisponibilidade oral do RN104, e, portanto, será o foco dos estudos subsequentes.

## **CAPÍTULO II**

### **OTIMIZAÇÃO DE SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL CONTENDO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104**

## 1 INTRODUÇÃO

Neste **CAPÍTULO 2** será descrita a otimização do sistema autoemulsionável para carrear o composto RN104. Para tal, inicialmente, procedeu-se a construção de diagramas de fase pseudoternários com base nos resultados de solubilidade obtidos no capítulo anterior. Uma vez estabelecida a melhor composição de excipientes para a formulação, realizou-se um planejamento experimental composto central com metodologia de superfície de resposta (CCD-RSM). Esta ferramenta é muito útil para sistematizar e acelerar a otimização de processos, permitindo avaliar diversos parâmetros em um pequeno número de experimentos. A partir de um modelo matemático construído com base nas respostas monitoradas, foi possível prever, segundo a desejabilidade, a maior capacidade de carga combinada ao menor tamanho de gotícula, obtendo-se assim a composição ideal do SEDDS.

Uma vez estabelecida a melhor formulação SEDDS-RN104, realizou-se a avaliação de estabilidade do sistema, bem como o estudo de liberação do RN104 *in vitro*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Otimizar, avaliar a estabilidade e a liberação *in vitro* do RN104 do SEDDS.

### 2.2 Objetivos específicos

- Construir diagramas de fase pseudoternários a partir dos excipientes com maior capacidade de solubilização do RN104;
- otimizar a composição da formulação por meio de um planejamento composto central com superfície de resposta (CCD- RSM);
- avaliar a estabilidade do SEDDS-RN104;
- testar diferentes meios para proceder o teste de liberação *in vitro* do RN104;
- realizar o teste de liberação *in vitro* do RN104 do SEDDS utilizando o método de diálise;
- avaliar o SEDDS-RN104 otimizado por técnicas de microscopia.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Solventes e reagentes

- a) Água ultrapurificada em sistema Mili-Q Millipore® (Bedford, MA, EUA);
- b) reagentes de grau cromatográfico: acetonitrila (ACN) (Dinâmica® Indaiatuba, SP).
- c) reagentes de grau analítico: acetato de etila (Labsynth®, Diadema, SP); ácido acético (Labsynth®, Diadema, SP), ácido clorídrico (Labsynth®, Diadema, SP), álcool etílico (J.T.Baker®, Xalostoc, EM, México); fosfato de potássio monobásico (J.T.Baker®, Xalostoc, EM, México); cloreto de sódio (Sigma-Aldrich®, São Paulo).
- d) excipientes utilizados nos testes das formulações: óleo de soja (marca comercial Liza®, Uberlândia, MG), Kollpihor RH 40® (Sigma-Aldrich®, São Paulo), Tween 20 (Labsynth®, Diadema, SP), Tween 80 (Labsynth®, Diadema, SP), Span 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo), TCM (Lipoid® GmbH, Ludwigshafen, Alemanha; marca comercial Pura Vida®, SP), ácido oleico (Croda® HealthCare), PEG 400 comum (Croda® HealthCare, Snaith, UK), PEG 400 ultrarefinado (Croda® HealthCare, Snaith, UK), Epikuron®, óleo de girassol (marca comercial Liza®, Uberlândia, MG), glicerol (Casa da Química Indústria e Comércio Ltda, São Paulo), óleo de sésamo (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha).

##### 3.1.2 Equipamentos e acessórios

- a) Equipamentos: cromatógrafo Shimadzu, equipado com bomba quaternária LC-10ADvp, detector UV-VIS SPD-10A, detector DAD SPD-M10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseificador DGU - 14 A, forno de coluna CTO - 10 Avp e autoinjeter SIL-10ADvp (Kioto, Japão) com software Class-VP para processamento dos dados; agitador tipo vórtex MS1, IKA; balança analítica com precisão de 0,01 mg BP 211 D, SARTORIUS; balança analítica, SHIMADZU; banho de ultrassom 1510R-MT, BRANSON; orbital shaker 2D (Agimaxx), Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido); centrífuga MR 23i, JOUAN; microscópio de luz polarizada (Zeiss Axio Imager. M2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha); microscópio eletrônico de transmissão (microscópio Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI120 kV/Quanta; Philips, Holanda).

- b) Acessórios: membrana de éster de celulose (diâmetro de 33 mm, cut-off de 14 KDa; Sigma-Aldrich, Steinheim Albuch, Alemanha), filtros 0,45  $\mu\text{m}$  (Sorblin Technologies®, Santa Maria, Brasil); coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm), com tamanho de poro de 95 Å e tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$  da marca Agilent®; membrana de diálise de celulose, balões volumétricos calibrados, provetas, vials, seringas, pipetas automáticas calibradas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Diagramas de fase pseudoternários

Uma fase surfactante foi preparada pela combinação de emulsificante e coemulsificante em diferentes proporções de massa (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3). O óleo foi combinado com a fase surfactante em proporções fixas de peso (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1). Após 24 h, água foi adicionada gota a gota às diferentes misturas, a temperatura ambiente, até a turbidez ou separação de fases ocorrer. Um ponto monofásico, leitoso e de baixa viscosidade foi considerado como ponto de microemulsão (ME), e foi utilizado para construir diagramas de fases pseudoternários utilizando Origin 2023 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os lados do triângulo equilátero representam o emulsificante, o coemulsificante e o óleo. A região de formação da emulsão foi utilizada para determinar os componentes adequados e suas proporções.

### 3.2.2 Otimização do SEDDS utilizando CCD-RSM

O CCD-RSM com dois fatores e cinco níveis foi empregado como ferramenta para otimizar o SEDDS-RN104. As variáveis independentes, que incluem a proporção de emulsificante para coemulsificante (X1) e a porcentagem de óleo (X2), foram identificadas como fatores críticos responsáveis pela carga de RN104 (Y1, mg/mL) e tamanho de partícula (Y2, nm). Os fatores independentes e seus níveis são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Níveis das variáveis independentes no CCD

	<b>-1,414</b>	<b>-1,0</b>	<b>0</b>	<b>+1,0</b>	<b>+1,414</b>
X1	0,6	1,0	2,0	3,0	3,4
X2	63,0	65,0	70,0	75,0	77,0

X1: razão emulsificante para coemulsificante; X2: porcentagem de óleo.

O CCD-RSM foi delineado de forma aleatória e planejado utilizando o software Stat-Ease 360 (Minneapolis, MN, EUA), e as superfícies de resposta 3D construídas a partir das equações polinomiais ajustadas. Ao total foram realizados oito experimentos mais as quintuplicata no ponto central. Para preparar as formulações do CCD, foi determinada a massa correspondente da mistura de óleo e surfactante para se obter 3 g. A mistura foi agitada a 100 rpm em banho-maria a  $70 \pm 5$  °C por 30 minutos. Após um período de repouso de 24 horas, RN104 (30 mg) foi adicionado às formulações de SEDDS (3 g) e mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente até completa solubilização do ativo.

O tamanho de partícula (nm) e a carga do RN104 (%) no SEDDS foram determinados da seguinte maneira: após 24 horas, as formulações foram centrifugadas a 9400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído em água ultrapura (1:200) e mantido sob agitação magnética por 1 minuto para emulsificação. O diâmetro médio das partículas das emulsões obtidas foi medido utilizando espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 25 °C com um feixe de laser de ângulo fixo (90 °), empregando um Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Os dados foram expressos como tamanho médio, avaliado por médias ( $n = 3$ ; média  $\pm$  desvio padrão). Posteriormente, as amostras foram filtradas através de membranas de 0,45  $\mu$ m e diluídas para quantificar a carga de RN104 utilizando o método validado CLAE-DAD.

### 3.2.3 Estudo de estabilidade SEDDS-RN104

Como já apresentado no Capítulo I, após 60 dias do preparo das formulações (Tabela 21), o teor do RN104 foi significativamente menor do que aquele medido no tempo zero. Assim, novos estudos de estabilidade do SEDDS-RN104 foram conduzidos a partir da adição de um antioxidante, palmitato de ascorbila (PA) em diferentes concentrações: 0,00 (E1), 0,02 (E2), 0,04 (E3), 0,08 (E4) e 0,10% (E5) (p/p).

Mensalmente, as formulações foram avaliadas durante seis meses para monitorar quaisquer alterações na aparência física (tais como separação de fase, precipitação do ativo ou alteração de coloração); no diâmetro médio das gotas (nm); na polidispersidade (PDI); no potencial Zeta (PZ) e no conteúdo de RN104. Todos os parâmetros foram determinados em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, considerando significância para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.2.4 Estudo de liberação *in vitro* do RN104

Diante da conhecida dificuldade de solubilização do RN104 em meios aquosos, realizou-se uma avaliação de sua solubilidade em diferentes meios aceptores de diálise. O perfil de liberação *in vitro* do RN104 foi avaliado para o ativo livre e para o SEDDS-RN104, utilizando membrana de éster de celulose (diâmetro de 33 mm, cut-off de 14 KDa) previamente hidratada em água ultrapura por 24 horas. O SEDDS-RN104 (10 mg/mL) foi emulsionado em água (1:4), e então 500  $\mu$ L dessa dispersão foram adicionados à bolsa de diálise, com equivalência de massa de 1,25 mg de RN104. A bolsa de diálise foi imersa em 60 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 com polissorbato 80 a 2%, a  $37,0 \pm 0,5$  °C, sob agitação constante (100 rpm) em agitador orbital. Amostras do meio externo (500  $\mu$ L) foram coletadas nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 360, 480 e 720 minutos, diluídas em solvente do método validado, filtradas (0,45  $\mu$ m) e quantificadas por CLAE-DAD. O volume retirado foi substituído por meio a  $37,0 \pm 0,5$  °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.2.5 Avaliação do efeito da diluição no SEDDS-RN104

Para avaliar o efeito da diluição, o SEDDS-RN104 (10 mg/mL) foi diluído em 100, 200, 500 e 1000 vezes em água ultrapura. Além disso, procedeu-se à caracterização da emulsão após dispersão (1:200) do SEDDS-RN104 (10 mg/mL) em MSG pH 1,2 e MSI pH 6,8, com e sem pancreatina. O tamanho de partícula, PDI e PZ foram determinados conforme descrito anteriormente (3.2.4.1, Capítulo I). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### 3.2.6 Microscopia de luz polarizada

Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da emulsão formada após dispersão do SEDDS-RN104 em água (1:200) foi colocada em lâmina para avaliação da presença de cristais por microscopia de luz polarizada equipada com câmera digital AxioCam. Para comparação visual, realizou-se o mesmo procedimento de diluição para RN104 livre, SEDDS-branco e PA nas mesmas concentrações utilizadas na formulação carregada.

### *3.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

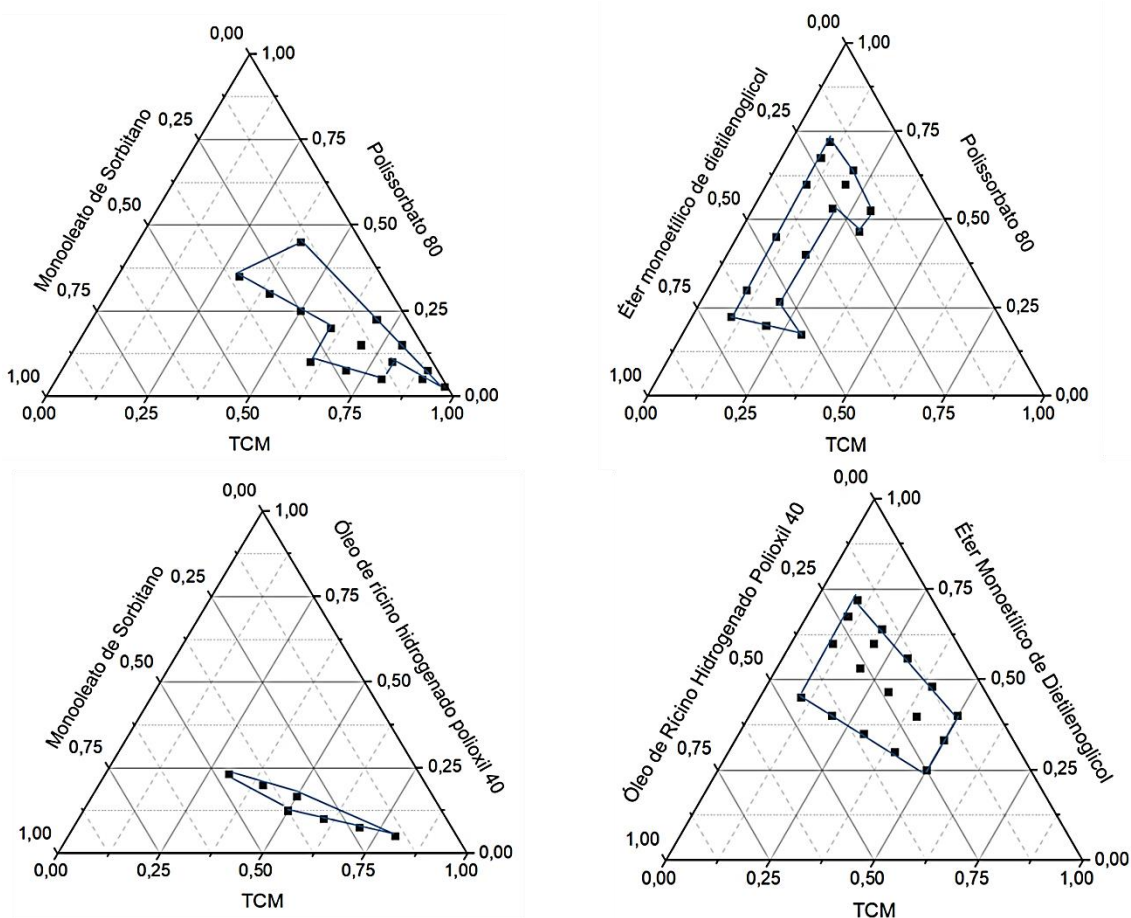
Uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  das emulsões formadas após dispersão do SEDDS-RN104 em água ultrapura (1:200) foi colocada sobre uma grade de cobre coberta com filme formvar. Após 1 min de adsorção, o excesso de líquido foi removido com papel filtro. As grades foram gotejadas com uma solução aquosa de ácido fosfotúngstico (1%) e o excesso da solução foi drenado após 1 min. A amostra seca foi então analisada em um microscópio eletrônico de transmissão no Centro de Microscopia da UFMG.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Diagramas de fase pseudoternários**

As regiões de formação de emulsão podem ser identificadas por meio da construção dos diagramas fase pseudoternários. A área destacada é onde o óleo, o emulsificante e o coemulsificante formam, em uma proporção específica, uma microemulsão homogênea e estável (POUTON, 2006). Isso pode ser útil na avaliação da autodispersibilidade potencial de uma formulação (RANI & RADHA, 2021). Neste estudo, o SEDDS produzido com óleo de soja mostrou-se instável em 24 horas, portanto, seu diagrama pseudoternário não foi representado. Assim, o TCM foi selecionado como o óleo fixo devido à sua capacidade semelhante de solubilização do RN104. PEG400 também foi avaliado como coemulsificante; no entanto SEDDS formulados utilizando esse excipiente apresentaram separação de fases dentro de algumas horas após o preparo. Como pode ser visto na Figura 26, a área de emulsão obtida com combinação de monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) e polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) foi ampla, além de apresentar maior proporção de óleo e menor concentração de surfactante/coemulsificante, o que pode conferir menor toxicidade à formulação (DOKANIA & JOSHI, 2015). Assim, esta composição foi selecionada para os estudos posteriores.

Figura 26 - Diagramas de fases pseudoternários mostrando as regiões de microemulsão (a área dentro da linha sólida) com TCM como fase oleosa e diferentes emulsificantes e coemulsificantes



Fonte: Dados da pesquisa, Origin®

#### 4.2 Otimização do SEDDS utilizando CCD-RSM

Otimizar uma formulação é um processo complexo que requer extensa experimentação. No entanto, o uso do CCD-RSM no desenvolvimento de formulações pode oferecer a possibilidade de avaliar muitas variáveis em diferentes níveis com número de experimentos reduzido. Nos estudos anteriores, a proporção emulsificante/coemulsificante (X1) e a % de óleo (X2) mostraram-se fatores consideráveis no carregamento do RN104 (Y1) e também no tamanho de partícula (Y2). A análise de resposta do Stat-Ease 360 demonstrou que o modelo quadrático forneceu o melhor ajuste para cada resposta Y1 e Y2. Os modelos matemáticos codificados estão descritos a seguir:

$$Y1 = 96,86 - 4,39X2 + 2,57X1 + 5,34 X1.X2 - 17,52X1^2$$

$$(R^2=0,9855; p<0.05)$$

$$Y2 = 164,25 + 140,15X2 - 156,60X1 - 85,49X1.X2 + 97,07X2^2 + 115,96X1^2$$

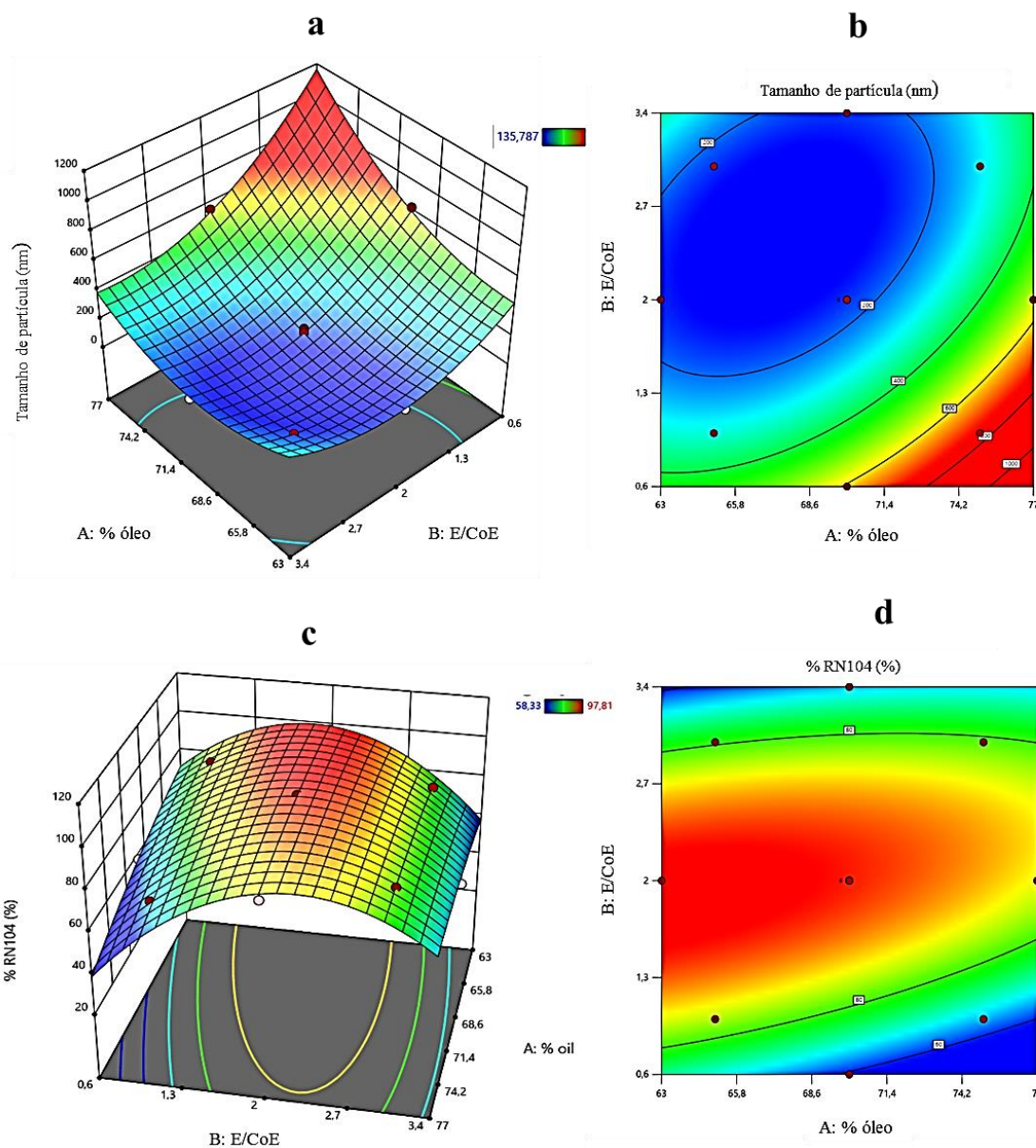
$$(R^2=0,9918; p<0.05)$$

ANOVA foi aplicada para avaliar a carga do RN104 (Y1) e o tamanho de partícula (Y2), e o modelo quadrático foi significativo ( $p < 0,001$ ) para ambas as respostas. Os modelos construídos não apresentaram falta de ajuste. Para Y1 o  $R^2$  predito = 0,8926 e  $R^2$  ajustado = 0,9752; Y2  $R^2$  predito = 0,9435 e  $R^2$  ajustado = 0,9859, ambos com boa concordância, uma vez que a diferença entre  $R^2$  predito e  $R^2$  ajustado foi inferior a 0,2. Além disso, ambos apresentaram precisão adequada (Y1 = 25,03; Y2 = 34,20), portanto os modelos podem ser usados para navegar no espaço de design testado. As superfícies de resposta 3D e os gráficos de contorno para carregamento do RN104 (Y1) e tamanho de partícula (Y2) são apresentados na Figura 27. As Figuras 27A e 27B descrevem o efeito de X1 e X2 em Y2. O aumento do teor de óleo (X2) e a diminuição da proporção de emulsificante e coemulsificante (X1) leva ao aumento gradual do tamanho das partículas. As Figuras 27C e 27D mostraram que a carga do RN104 aumenta quando a quantidade de óleo diminui combinada com a proporção emulsificante/coemulsificante no nível zero (polissorbato 80: monooleato sorbitano 2:1).

A formulação otimizada de SEDDS-RN104 foi selecionada com base nos critérios estabelecidos que visam atingir o valor máximo de carga de ativo minimizando o tamanho da partícula. Esse cálculo de desejabilidade foi realizado aplicando o método de predição de ponto do Software Stat-Ease 360. Os resultados desejados para SEDDS-RN104 podem ser obtidos com uma concentração de óleo de 65,5% e uma razão de emulsificante para coemulsificante na proporção de 2.

A precisão do modelo construído foi confirmada conduzindo três experimentos paralelos com base no ótimo previsto para a formulação. A média de carga do RN104 foi de  $99,4 \pm 0,1\%$  (previsto 99,43%) e o tamanho médio das partículas foi de  $118,4 \pm 0,7$  nm (previsto 116,75 nm). Ambos os valores de resposta experimental estão de acordo com os valores previstos, indicando que o modelo está bem ajustado à otimização da formulação. O desvio absoluto para cada resposta foi inferior a 10%, confirmando a boa previsão do modelo matemático.

Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta e o contorno correspondente mostrando a influência da porcentagem de óleo e da proporção entre emulsificante e coemulsificante no tamanho das partículas (a ; b) e carga de RN104 (c ; d)



Fonte: Dados da pesquisa, Stat-Ease 360<sup>®</sup>.

### 4.3 Estudo de estabilidade SEDDS-RN104

A formulação otimizada por CCD-RSM (E1, sem adição de antioxidante) permaneceu estável por menos de dois meses (Tabela 26).

Tabela 26 - Parâmetros físico-químicos no estudo de estabilidade de E1 SEDDS-RN104  
(média ± desvio padrão)

	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3
RN104 autoemulsionado (%)	98,61±0,58	98,17±0,14	74,89±0,23	54,97±0,16
Tamanho de partícula (nm) <sup>a</sup>	121,2±1,1	132,3±1,3	145,2±0,7	165,8±1,6
Potencial zeta (mV) <sup>b</sup>	-16,5±0,6	-12,3±0,8	-9,9±0,2	-7,41±0,3
Índice de Polidispersão	0,24±0,01	0,24±0,02	0,26±0,02	0,28±0,01

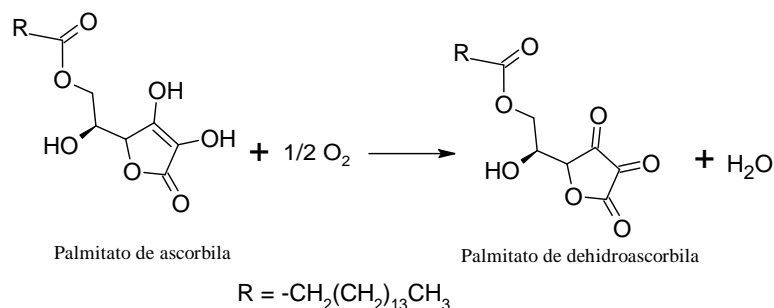
**Notas:** T = 0, T = 1, T = 2 e T = 3 indicam medidas após 0, 1, 2 e 3 meses; (a) O tamanho médio das partículas e (b) o potencial Zeta foram medidos após diluição de 200 vezes em água Milli-Q, respectivamente, por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e DLS acoplado com mobilidade eletroforética, usando Zetasizer Nano-ZS90 com ângulo fixo feixe de laser (90°) a 25 °C. Os dados foram expressos pela média (n = 3) ± desvio padrão (DP).

Os valores negativos observados para o PZ podem ser atribuídos à presença de ácidos graxos originados de surfactantes derivados de ésteres ácidos, como monooleato de sorbitano e polissorbato 80 (SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2013). Ao longo dos meses, houve um aumento do tamanho de partícula e PDI. Concomitantemente, foi observada diminuição no RN104 autoemulsionado (%) e do valor em módulo do PZ.

Os óleos são propensos à oxidação, um processo comumente retardado pela adição de antioxidantes, como os derivados do ácido ascórbico. Embora o ácido ascórbico seja abundante na natureza, é pouco associado a óleos devido à sua natureza hidrofílica. O derivado sintético do ácido ascórbico amplamente utilizado é o PA um éster com propriedades lipofílicas que é praticamente insolúvel em água.

O PA previne a peroxidação lipídica ao extinguir o oxigênio singlete, transformando-se então em uma forma oxidada desprovida de atividade oxidante (TENEVA & DIMCHEVA, 2016; MORIBE *et al.*, 2011) (Figura 28).

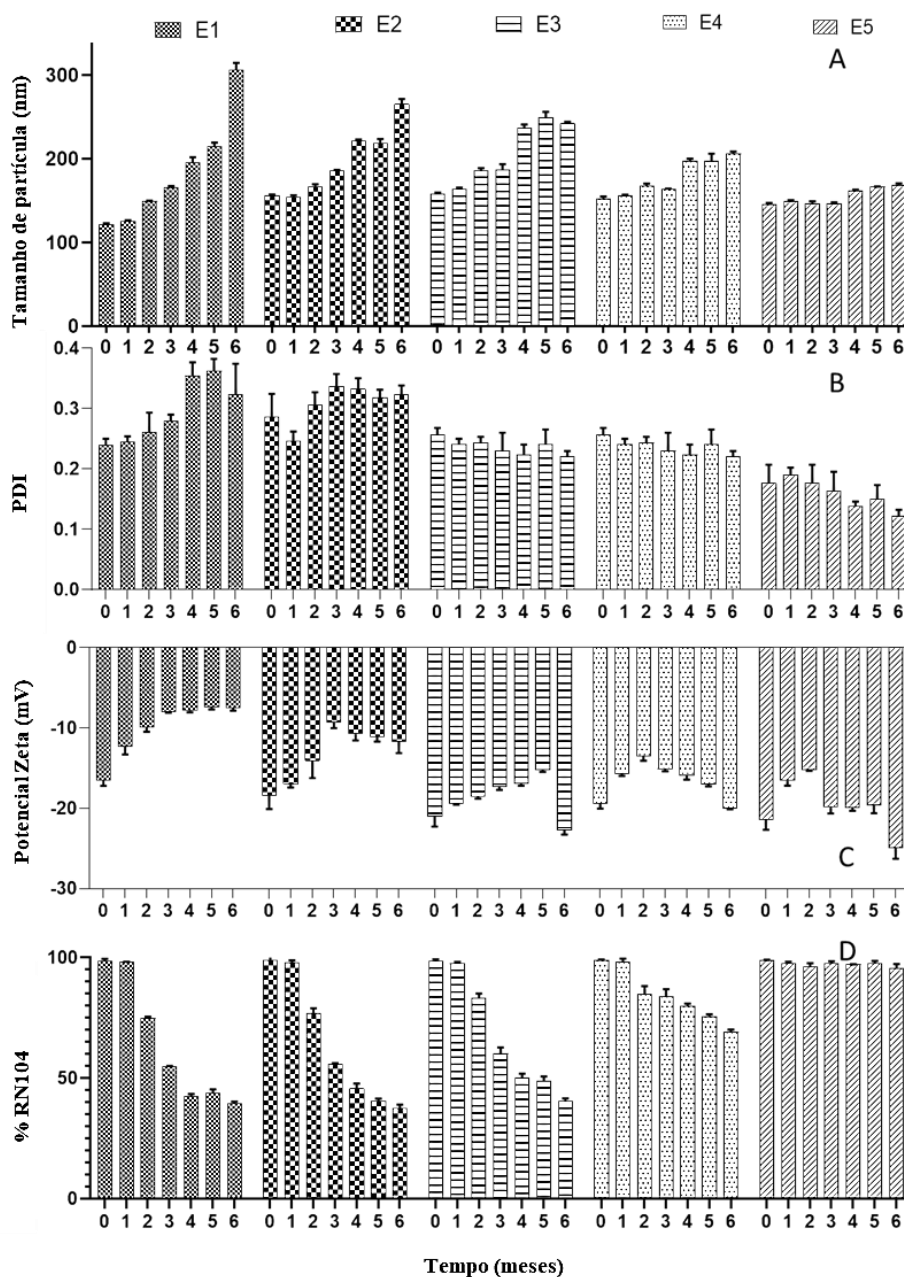
Figura 28 - Reação de oxidação do palmitato de ascorbila.



Fonte: Adaptado de MORIBE *et al.*, 2011.

Com o objetivo de aumentar o tempo de estabilidade, o PA foi adicionado em diferentes concentrações (E1, E2, E3, E4 e E5). Os resultados são apresentados na Figura 29.

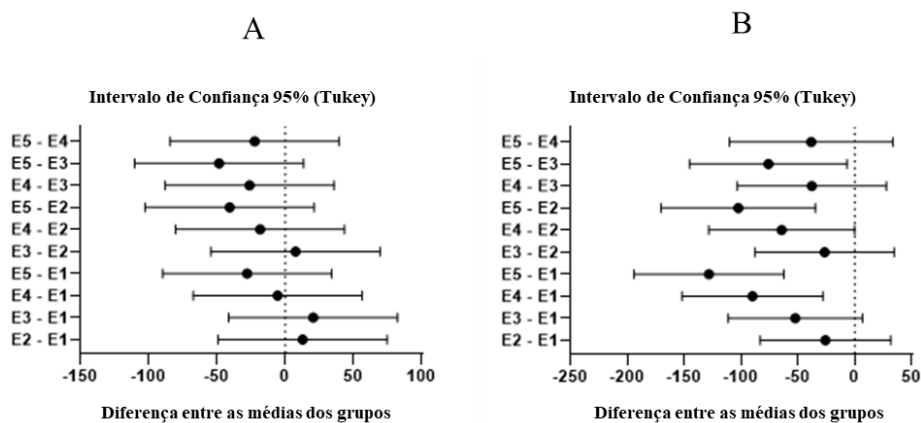
Figura 29 - Estabilidade do SEDDS-RN104 com diferentes concentrações de PA: E1 (0,00%), E2 (0,02%), E3 (0,04%), E4 (0,08%) e E5 (0,10%), ao longo de 6 meses. (A) Tamanho médio de partícula (nm); (B) Índice de Polidispersão (PDI), (C) Potencial Zeta (mV) e (D) % RN104. Os dados foram expressos pela média ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão (DP)



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Não houve diferença significativa entre o tamanho médio de partículas após a emulsificação das formulações E1-E5 ao longo do período de acompanhamento de 6 meses ( $p = 0,2197$ ) (Figura 30 A). No entanto, ao comparar o tamanho das partículas no momento específico de 6 meses, foi observada diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre as formulações com diferentes concentrações de PA (E5-E3; E5-E2; E5-E1 e E4-E1) (Figura 30 B).

Figura 30 - Intervalos de confiança calculados para o tamanho de partícula após ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (A) Diferença entre médias dos grupos durante os 6 meses; (B) diferença entre as médias dos grupos no momento específico de 6 meses



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Em relação ao conteúdo do RN104 observado ao longo dos 6 meses, houve uma diferença significativa ( $p = 0,0185$ ) entre E1 e E5 e entre E5 e E2 (Tabela 27 e Figura 31A). Ou seja, a adição do PA na maior concentração foi capaz de reduzir a degradação do RN104 na formulação durante o tempo acompanhado.

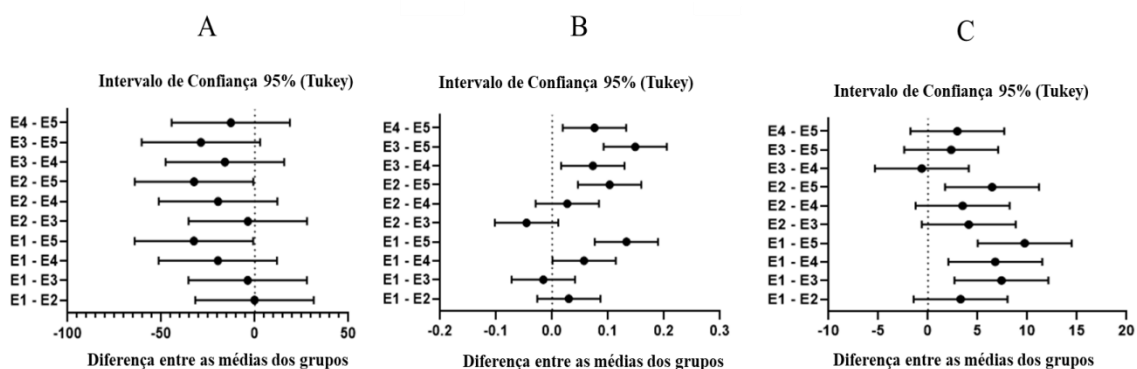
Analisando os valores de PDI, observou-se diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ) na comparação entre E1-E4 e E1-E5 (Figura 31B). Este achado indica que a concentração de AP a 0,1% (m/m) (E5) é a mais adequada para a manutenção de um sistema monodisperso. Em relação à ZP, houve diferença ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo sem PA (E1) e aqueles com suas maiores concentrações (E3, E4 e E5) (Figura 31C).

O conteúdo do RN104 na formulação E5, contendo 0,1% (p/p) de PA, permaneceu consistentemente estável durante todo o estudo (Tabela 27). Esta estabilidade não foi observada para as formulações com menores concentrações de PA.

Tabela 27 - % RN104 nas formulações ao longo de seis meses (média  $\pm$  desvio; n=3)

Tempo (meses)	E1	E2	E3	E4	E5
T = 0	98,58 $\pm$ 0,60	98,88 $\pm$ 1,13	98,53 $\pm$ 0,51	98,98 $\pm$ 0,15	98,78 $\pm$ 0,27
T = 1	98,18 $\pm$ 0,10	97,90 $\pm$ 0,70	97,60 $\pm$ 0,42	98,24 $\pm$ 0,99	97,53 $\pm$ 0,52
T = 2	74,88 $\pm$ 0,50	76,81 $\pm$ 1,55	83,37 $\pm$ 1,27	84,84 $\pm$ 2,41	96,18 $\pm$ 1,06
T = 3	54,93 $\pm$ 0,10	55,96 $\pm$ 0,16	60,33 $\pm$ 1,74	84,00 $\pm$ 2,11	97,47 $\pm$ 0,72
T = 4	42,40 $\pm$ 0,76	45,68 $\pm$ 1,52	50,03 $\pm$ 1,34	79,87 $\pm$ 0,75	97,26 $\pm$ 0,05
T = 5	43,92 $\pm$ 1,04	40,47 $\pm$ 0,78	48,88 $\pm$ 1,32	75,61 $\pm$ 0,65	97,65 $\pm$ 0,66
T = 6	39,60 $\pm$ 0,53	37,46 $\pm$ 1,10	40,37 $\pm$ 0,89	69,17 $\pm$ 0,72	95,63 $\pm$ 1,24

Figura 31 - Intervalos de confiança calculados após ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (A) Diferença entre médias de grupos para % RN104; (B) diferença entre médias de grupos para PDI; (C) diferença entre médias dos grupos para ZP



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Quanto ao aspecto macroscópico, E4 e E5 mantiveram aspecto líquido ocre límpido, semelhante às formulações recentemente preparadas. Contudo, a cor das outras formulações mudou gradualmente para castanho-avermelhado ao longo do tempo (Figura 32). É importante ressaltar que nenhuma formulação exibiu quaisquer sinais de precipitação durante todo o período de avaliação. Assim, o E5 foi escolhido para estudos subsequentes devido à sua considerável estabilidade e características físicas.

Figura 32 - Imagem representativa das formulações E1 *versus* E5 após 45 dias do preparo quando já se nota diferenciação de coloração entre elas



Fonte: Dados da pesquisa.

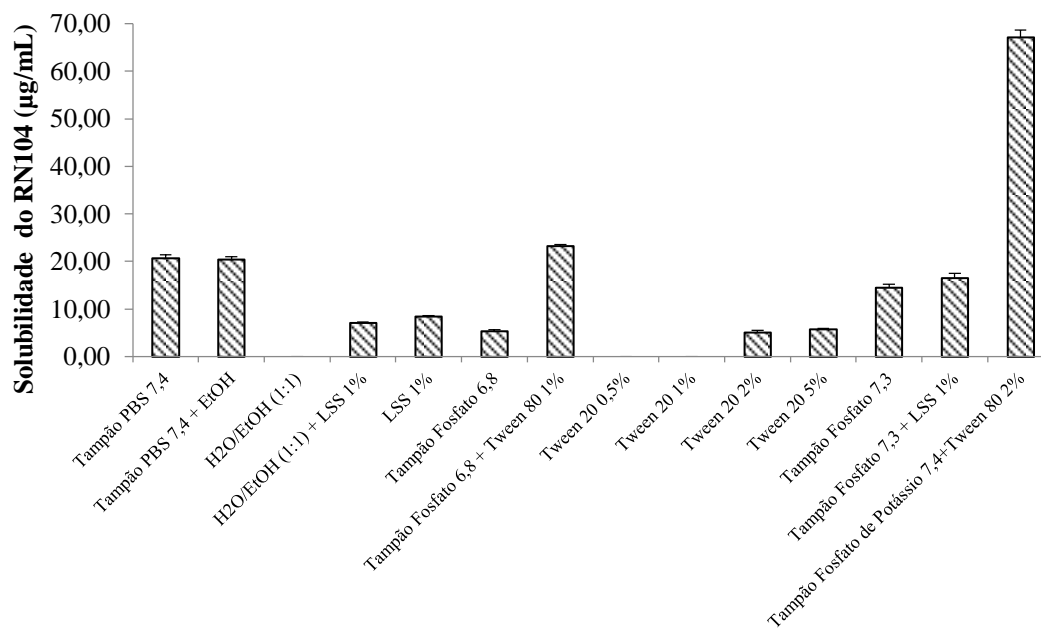
#### 4.4 Estudo de liberação *in vitro* do RN104

Os resultados dos testes de solubilidade do RN104 em diferentes meios aceptores estão apresentados na Figura 33.

Em alguns dos meios aceptores testados, H<sub>2</sub>O/EtOH (1:1) e solução aquosa de Tween 20 0,5% e 1%, não foi possível quantificar o RN104, pois sua concentração encontrava-se abaixo do LQ do método validado.

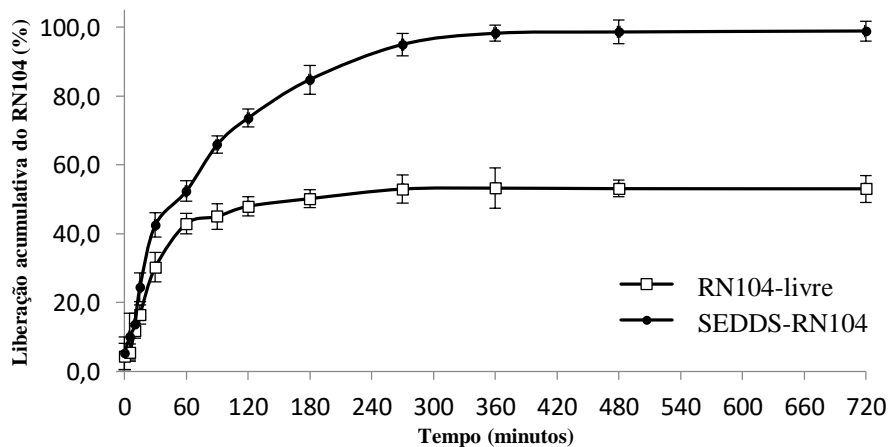
O tampão fosfato de potássio pH 7,4 + Tween 80 2% (p/v) (Farmacopeia, 2019) foi o meio com a maior capacidade de solubilização do RN104 (67,14 µg/mL). Assim, este foi utilizado no estudo de liberação *in vitro* por diálise.

Após 360 minutos, o SEDDS-RN104 alcançou quase 100% de liberação do RN104 no meio, enquanto a dissolução acumulativa do ativo livre foi de cerca de 53%. Conforme representado, o SEDDS-RN104 aumentou substancialmente a taxa de dissolução do ativo (Figura 34).

Figura 33 - Gráfico de solubilidade do RN104 ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes meios aceptores

Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Figura 34 - Liberação acumulativa do RN104 (%) para formulação SEDDS e para o ativo livre



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Nos primeiros 10 minutos, a liberação acumulativa do RN104 foi estatisticamente semelhante entre a formulação e o ativo livre. Porém, a partir dos 15 minutos, houve diferença significativa nos perfis de liberação ( $p < 0,05$ ). Esta diferença demonstrou que o sistema SEDDS e o estado pré-solubilizado do ativo na fase oleosa em forma de partículas de escala nanométrica podem aumentar a sua dissolução e, conseqüentemente, a sua absorção no TGI (DOKANIA & JOSHI, 2015, MISHRA *et al.*, 2021, POUTON, 2006, SHEHATA *et al.*, 2016).

#### 4.5 Avaliação do efeito da diluição no SEDDS-RN104

Ao avaliar o efeito de diluição no SEDDS-RN104 (10 mg/ mL), todas as amostras resultaram em tamanhos de partículas na escala nanométrica (< 130 nm) após a diluição, e não ocorreram alterações significativas neste parâmetro nas condições testadas ( $p < 0,05$ ), conforme detalhado na Tabela 28. As variações de pH utilizando meio simulado gástrico (pH 1,2) e meio simulado intestinal (pH 6,8) foram realizadas para simular o trânsito do TGI. Estas observações implicam que a estabilidade das gotículas formadas após a emulsificação, quer em termos de cinética ou termodinâmica, alinham-se com as características associadas à formação de formulações à base de lípidos tipo IIIA (POUTON, 2006).

Tabela 28 - Robustez de diluição para SEDDS-RN104 (10 mg/mL) em diferentes meios (média  $\pm$  desvio, n = 3)

Diluição	Tamanho de partícula (nm)	PDI	PZ (mV)	RN104 emulsionado (%)
<b>1:100*</b>	119,2 $\pm$ 1,2	0,23 $\pm$ 0,02	-14,7 $\pm$ 0,1	98,32 $\pm$ 0,74
<b>1:200*</b>	120,4 $\pm$ 2,2	0,24 $\pm$ 0,01	-15,5 $\pm$ 0,2	98,48 $\pm$ 0,89
<b>1:500*</b>	121,4 $\pm$ 0,4	0,24 $\pm$ 0,01	-13,5 $\pm$ 0,1	97,85 $\pm$ 1,02
<b>1:1000*</b>	119,7 $\pm$ 1,5	0,23 $\pm$ 0,02	-14,9 $\pm$ 0,1	97,96 $\pm$ 1,31
<b>1:200 MSG</b>	122,4 $\pm$ 1,4	0,24 $\pm$ 0,01	-12,2 $\pm$ 0,2	98,14 $\pm$ 0,90
<b>1:200 MSI</b>	123,4 $\pm$ 2,1	0,24 $\pm$ 0,02	-13,8 $\pm$ 0,2	97,78 $\pm$ 1,17

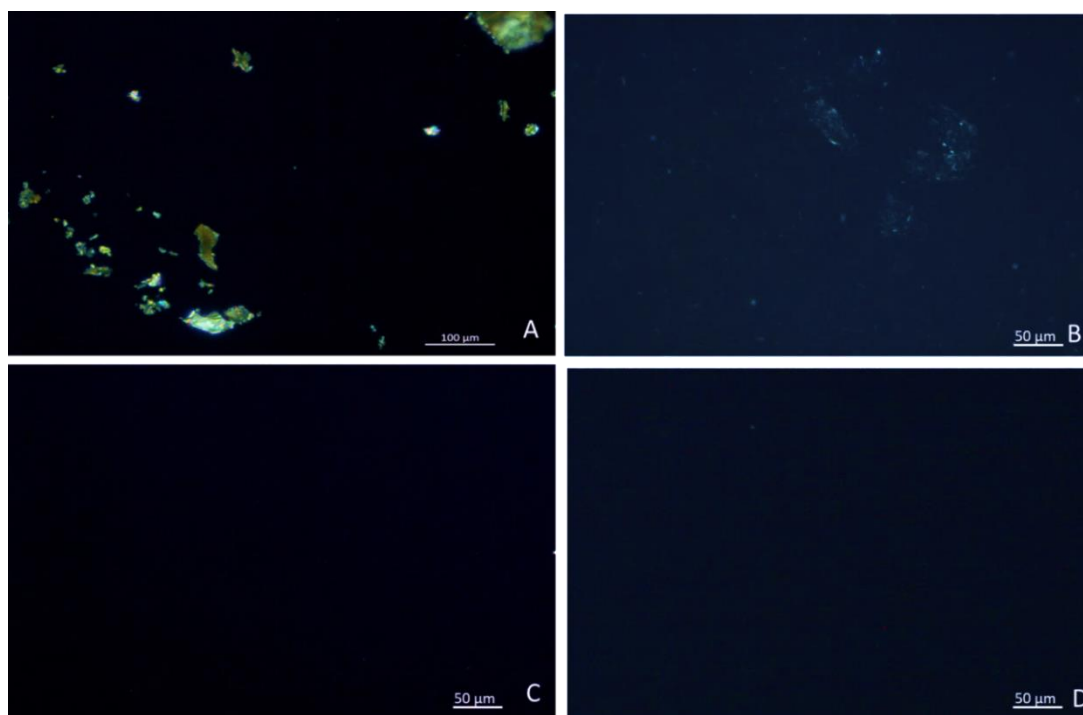
\* diluição em água ultrapura; MSG= meio simulado gástrico; MSI= meio simulado intestinal.

O tamanho médio das partículas foi de 122,4 $\pm$ 1,4 nm (com PDI de 0,24 $\pm$ 0,01) em pH 1,2 e 123,4 $\pm$ 2,1 (com PDI de 0,24 $\pm$ 0,02) em pH 6,8, respectivamente. O RN104 autoemulsionado foi determinado utilizando o método analítico validado e, consistentemente, foram observados valores superiores a 97% em todos os experimentos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

#### 4.6 Microscopia de luz polarizada

As imagens de microscopia de luz polarizada revelaram inequivocamente a ausência de cristais do RN104 (Figura 35). Esta descoberta é essencial para o desempenho da formulação, uma vez que a precipitação do ativo, especialmente após a diluição, pode retardar sua absorção (CERPUNJAK *et al.*, 2013, GUPTA *et al.*, 2011, MISHRA *et al.*, 2021). A ausência de precipitação sugere que o RN104 permanece associado às gotículas, um fenômeno que poderia tanto aumentar sua absorção quanto reduzir sua degradação (POUTON, 2006, RAHMAN *et al.*, 2013).

Figura 35 - Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada para visualização de cristais do RN104 após diluição em água (1:200). (A) RN104 livre (10 mg/mL); (B) PA livre (0,1% p/p); (C) SEDDS-RN104 (10 mg/mL), (D) SEDDS-branco

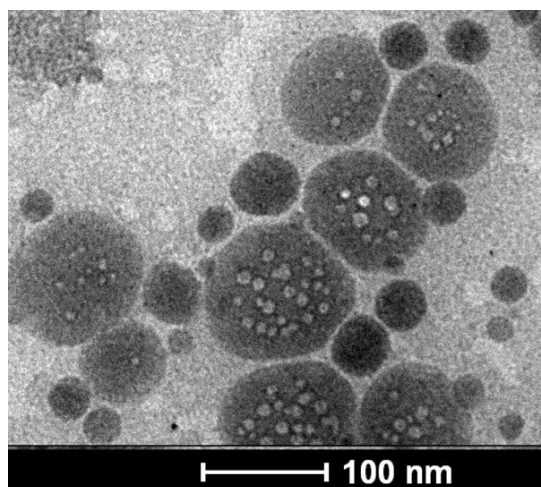


Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Em termos de morfologia, foram observadas gotículas esféricas (Figura 36) com distribuição de tamanho e polidispersidade comparáveis àquelas obtidas nos experimentos de DLS (Tabela 27).

Figura. 36 - Análise por microscopia eletrônica de SEDDS-RN104 disperso em água ultrapura (1:200; aumento de 20.000 x)



Fonte: Dados da pesquisa.

## 5 CONCLUSÃO

Nesta fase da pesquisa, utilizando a metodologia de planejamento de experimentos, foi possível otimizar uma formulação SEDDS que forma uma emulsão nanométrica capaz de encapsular o RN104 eficientemente, quando disperso em água e em meios gastrointestinais simulados. A caracterização da formulação foi realizada de maneira a combinar diferentes técnicas, as quais confirmaram o perfil esperado para este tipo de formulação. O SEDDS-RN104 contendo palmitato de ascorbila (0,1% p/p) demonstrou estabilidade à temperatura ambiente por até 6 meses. Com base nos resultados satisfatórios obtidos com o SEDDS formulado, a próxima etapa do estudo envolveu a avaliação do perfil farmacocinético em um modelo murino de administração *per os*.

### **CAPÍTULO III**

## **AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO ORAL DO DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104 INCORPORADO EM SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL**

## 1 INTRODUÇÃO

No **CAPÍTULO 3** será descrita a comparação da biodisponibilidade oral do RN104 quando administrado aos animais na formulação SEDDS-RN104 e na forma livre. Para tal, inicialmente, procedeu-se ao desenvolvimento e a validação do método bioanalítico por CLAE- EM/EM para quantificar o RN104 no plasma dos animais. Em seguida, o SEDDS desenvolvido foi avaliado quanto à sua capacidade de melhorar a biodisponibilidade do RN104 após administração *per os*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar a farmacocinética *per os* do RN104 quando administrado aos animais incorporado à formulação SEDDS e em sua forma livre.

### 2.2 Objetivos específicos

- desenvolver e validar método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificar o RN104 em plasma animal;
- proceder o estudo farmacocinético em camundongos fêmeas Swiss;
- calcular os parâmetros farmacocinéticos do RN104 quando administrado incorporado à formulação e em sua forma livre.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Solventes e reagentes

- a) Água ultrapurificada em sistema Mili-Q Millipore® (Bedford, MA, EUA);
- b) reagentes de grau cromatográfico: acetonitrila (ACN) (Dinâmica® Indaiatuba, SP); ácido fosfórico 85% v/v (Sigma-Aldrich®, São Paulo).
- c) reagentes de grau analítico: fosfato de potássio monobásico (J.T.Baker®, Xalostoc, EM, México);
- d) excipientes utilizados: Tween 80 (Labsynth®, Diadema, SP), Span 80 (Sigma-Aldrich®, São Paulo), TCM (Lipoid® GmbH, Ludwigshafen, Alemanha), CMC (Sigma-Aldrich®, São Paulo).

- e) salina estéril (flaconete de 10ml, SAMTEC<sup>®</sup>);
- f) heparina (frasco 5mL, BLAU FARMACÊUTICA<sup>®</sup>).
- g) clotrimazol SQR (United States Pharmacopeia – USP – Rockville, USA), lote: J.

### 3.1.2 Equipamentos e acessórios

- a) Equipamentos: balança analítica, Shimadzu; centrífuga MR 23i, JOUAN<sup>®</sup>; Sistema CLAE-EM/EM composto por: cromatógrafo líquido Agilent<sup>®</sup> 1200; espectrômetro de massas SCIEX<sup>®</sup> QTRAP 5500; freezer vertical -70 °C UTL-2186, REVCO<sup>®</sup>.
- b) acessórios: tubos criogênicos de 2,0 e 3,5 mL e de fundo cônico tipo Falcon de 15 e 50 mL; tubos tipo *insert* de fundo plano de 250 µL, filtros 0,45 µm (Sorblin Technologies<sup>®</sup>, Santa Maria, Brasil); coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm), com tamanho de poro de 95 Å e tamanho de partícula 5 µm da marca Agilent, balões volumétricos calibrados, provetas, vials, eppendorf, seringas, pipetas automáticas calibradas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de RN104 em plasma de camundongos

#### 3.2.1.1 Parâmetros CLAE-EM/EM

Para o desenvolvimento do método bioanalítico partiu-se de um método previamente validado e publicado (SILVA *et al.*, 2020). As análises CLAE-EM/EM foram realizadas utilizando um sistema Agilent<sup>®</sup> 1200 (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, EUA) e um espectrômetro de massa AB SCIEX<sup>®</sup> QTRAP 5500 (AB SCIEX, Framingham, MA, EUA), equipado com Fonte Turbo Ionspray no modo electrospray. A coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) foi mantida a 40 °C. A agulha foi lavada por 30 segundos com solução de água: metanol: acetona (40:40:20 v/v).

A fonte de íons de eletropulverização foi operada no modo de ionização positiva e o nitrogênio foi usado como gás de nebulização e dessolvatação. O potencial de desagrupamento (DP) foi ajustado em 30 V para padrão interno (PI) (clotrimazol) e 75 V para RN104, potencial de entrada (EP) em 3 V para PI e 6 V para RN104, gás de

cortina 15 psi, tensão de spray de íons (IV) +4500 V, temperatura da fonte 600 °C, gás nebulizador (GS1) 50 psi, gás turbo (GS2) 45 psi e gás de colisão ideal (CAD) foi definido como médio. A quantificação foi realizada pelo modo *Multiple Reactions Monitoring* (MRM). Os dados MRM foram coletados pelo espectrômetro de massa usando um tempo de permanência de 150 ms (20 pontos de dados por transição).

As transições MRM foram:  $m/z$  286,1  $\rightarrow$   $m/z$  176,1 para quantificação de RN104 (energia de colisão 31 V e potencial de saída da célula de colisão 9 V),  $m/z$  286,1  $\rightarrow$   $m/z$  112,2 para monitoramento de RN104 (energia de colisão 22 V e colisão potencial de saída da célula 6 V),  $m/z$  345,2  $\rightarrow$   $m/z$  277,1 para quantificação PI (energia de colisão 14 V e potencial de saída da célula de colisão 15 V) e  $m/z$  345,2  $\rightarrow$   $m/z$  165,2 para monitoramento PI (energia de colisão 44 V e potencial de saída da célula de colisão 8 V).

#### *3.2.1.2 Preparo dos pontos da curva de calibração e controle de qualidade*

Os pontos da curva de calibração foram preparados em um pool de plasma branco de camundongos nas seguintes concentrações de RN104: 0,5 ng/mL (limite inferior de quantificação, LIQ), 1,25, 2,50, 5,00, 7,50, 10,0, 20,0, 30,0 e 40,0 ng/mL. Amostras de controle de qualidade (CQ) baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluição (CQD) foram preparadas a 1,50, 15,0, 35,0, 200,0 e 600 ng/mL. Para a análise, os plasmas enriquecidos em CQD (200,0 e 600 ng/mL) foram diluídos 5 e 15 vezes com plasma branco para a concentração final de 40 ng/mL.

#### *3.2.1.3 Preparo da amostra*

Uma alíquota de 100  $\mu$ L do plasma de camundongos foi dispensada em um microtubo de 1,0 mL. Posteriormente, 20  $\mu$ L da solução de trabalho do PI (500 ng/mL) foram adicionados e agitados em vórtex por 30 segundos. Para avaliar a eficiência de extração de diferentes solventes orgânicos, 200  $\mu$ L de acetonitrila ou metanol foram adicionados e depois agitados em vórtex por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 13.540  $g$  por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um insert de 250  $\mu$ L, acondicionado em vial âmbar e injetado no sistema cromatográfico.

#### *3.2.1.4 Validação do método*

A validação do método foi realizada seguindo os procedimentos descritos nas diretrizes regulatórias: Resolução nº 27, 2012 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil) (ANVISA, 2012) e o Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2018 de *Food and Drug Administration* (FDA, 2018).

Para avaliar a seletividade, foram analisadas seis amostras individuais de plasma branco de camundongos. Os cromatogramas obtidos foram comparados com as amostras no LIQ. Os picos de interferentes nos tempos de retenção de RN104 e do PI foram considerados dentro do limite aceitável se a área foi inferior a 20% da área do analito e a 5% da área do PI. O LIQ foi determinado como a menor concentração de analito no plasma de camundongos que apresentou exatidão (desvio  $\pm 20\%$  da concentração nominal) e precisão (coeficiente de variação (CV)  $\leq 20\%$ ).

O efeito residual foi avaliado injetando-se uma amostra de plasma branco seguido de uma amostra no limite superior de quantificação (LSQ) do método e na sequência duas amostras de plasma branco. As respostas dos picos interferentes nos tempos de retenção do RN104 devem ser inferiores a 20% e no tempo de retenção do PI inferiores a 5%.

As curvas de calibração foram obtidas pela análise de padrões de calibração em nove concentrações diferentes, extraídos em duplicata durante três dias consecutivos. As curvas foram plotadas usando concentração *versus* razão de área de pico para RN104/PI, na faixa de 0,5 a 40,0 ng/mL. Houve aprovação da curva de calibração quando 75% dos pontos apresentaram desvios inferiores aos descritos (20% para o LIQ e de 15% para os demais níveis), além de ter no mínimo seis níveis de concentração incluindo LIQ e LSQ aprovados.

A precisão e exatidão foram avaliadas por meio da análise de cinco réplicas de amostras em três dias distintos, em cinco concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A precisão foi aprovada se o CV fosse  $\leq 15\%$  para cada CQ e  $\leq 20\%$  para o LIQ. A exatidão foi aceitável quando a concentração encontrada estava dentro de  $\pm 15\%$  dos valores nominais para cada CQ e dentro de  $\pm 20\%$  no LIQ.

A determinação do efeito de matriz foi realizada pelo método do fator matricial normalizado (FMN). Esse efeito para o RN104 e PI foi avaliado em três níveis de CQ: CQB, CQM e CQA. Esta avaliação envolveu a comparação da área média das amostras não extraídas (adicionadas após a extração) com a área média das soluções padrão em fase móvel em cada nível de CQ. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e um coeficiente de variação (CV)  $\leq 15\%$  para FMN foi considerado aceitável.

A recuperação da extração foi avaliada comparando-se as áreas dos picos das amostras de plasma branco adicionadas do RN104 e do PI antes da extração com amostras em fase móvel nas mesmas concentrações. Foram avaliados três níveis: CQB, CQM e CQA em triplicata. A taxa de recuperação foi expressa como a porcentagem da concentração nominal do analito ou PI na matriz biológica que foi extraída.

A estabilidade do RN104 no plasma de camundongos foi avaliada usando amostras CQB, CQM e CQA sob as seguintes condições de armazenamento: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC) (3 ciclos, congelamento a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e descongelamento a  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), estabilidade de curta duração (ECD) (6 h a  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), estabilidade a longa duração (ELD) (8 semanas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e estabilidade pós-processamento (EPP) no amostrador automático (6 h a  $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Todas as análises de estabilidade foram realizadas em triplicata e simultaneamente a uma curva de calibração. A estabilidade foi confirmada se o desvio das concentrações nominais estivesse dentro de  $\pm 15\%$ .

### 3.2.2 Estudo farmacocinético

O protocolo de experimentação animal para o estudo farmacocinético foi submetido à avaliação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFMG e aprovado em 29 de março de 2021, sob o número de protocolo 46/2021 (Anexos).

Para a condução do estudo, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 23-30 g, os quais foram alojados em uma sala com temperatura controlada e tiveram livre acesso à água e comida, seguindo ciclos de 12 horas de claro/escuro. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, cada um composto por 40 indivíduos ( $n = 4/\text{tempo}$ ). O primeiro grupo foi tratado com SEDDS-RN104 (10 mg/mL) previamente emulsionado em água ultrapura na proporção de 1:1, enquanto o segundo grupo recebeu uma suspensão de RN04 (6,5 mg/mL) em 0,5% p/v de carboximetilcelulose (CMC). Cada animal recebeu uma dose de RN104 equivalente a 50 mg/kg, administrada *per os*.

Em intervalos predefinidos após a administração (10, 20, 30, 45, 60 minutos e 2, 4, 6, 8 e 12 horas), amostras de sangue foram coletadas por decapitação em tubos heparinizados (10  $\mu\text{l}$  de heparina 5 UI/mL) e imediatamente centrifugadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a 13.540 g, por 10 minutos. O plasma obtido foi armazenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a quantificação do RN104 utilizando o método CLAE/EM-EM previamente validado.

Calculou-se as médias, mínimos, máximos e foi realizada a ANOVA com um  $\alpha$  de 0,05. Os valores de  $C_{\text{máx}}$  e de  $T_{\text{máx}}$  foram obtidos a partir da média aritmética dos valores máximos obtidos para cada administração. A  $ASC_{0-t}$  foi calculada pelo método dos trapezoides. A  $K_{\text{El}}$  foi calculada pela aplicação do modelo de regressão linear às concentrações plasmáticas correspondentes à fase de eliminação do RN104 (últimos 4 tempos de coleta), sendo a inclinação obtida correspondente ao seu valor. Calculou-se o  $t_{1/2}$  por meio da equação:  $t_{1/2} = 0,693/ K_{\text{El}}$  e, para o cálculo da  $ASC_{0-\infty}$ , foram utilizados os valores da  $K_{\text{El}}$  e da  $ASC_{0-t}$ , empregando-se a equação:  $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/K_{\text{El}}$  (onde  $Ct$  é a última concentração do fármaco determinada acima do LIQ). O volume de distribuição aparente ( $Vd$ ) foi calculado pela equação:  $Vd/F = CL/ K_{\text{el}}$  e o *clearance* por  $(CL/F) = \text{dose}/ ASC_{0-\infty}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Parâmetros CLAE-EM/EM

O comportamento de ionização do RN104 em modo positivo já foi caracterizado anteriormente, junto à utilização do clotrimazol como PI na validação do método bioanalítico (SILVA *et al.*, 2020).

Inicialmente foi testada a fase móvel composta por acetonitrila e água (85:15, v/v) acidificada com ácido fórmico 0,1% a uma vazão de 1,0 mL/min conforme previamente publicado (SILVA *et al.*, 2020), mas não foi possível reter o PI de maneira satisfatória, uma vez que a coluna atualmente utilizada apresenta comprimento de 150 mm, sendo menor do que a anterior de 250 mm.

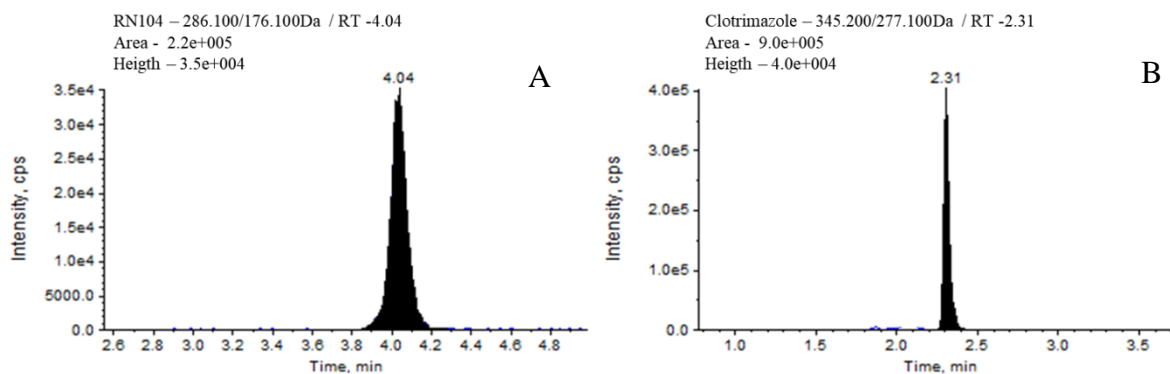
Modificações subsequentes nas condições cromatográficas foram realizadas para aumentar a retenção do PI e diminuir o consumo de solvente. As condições ideais, caracterizadas por sinais de alta intensidade e um menor tempo de corrida, foram alcançadas utilizando eluição gradiente com acetonitrila e acetato de amônio 2 mM (90:10, v/v) com 0,5% (v/v) de ácido fórmico, com fluxo de 0,7 mL/min de 0 a 2,3 min, aumentado para 0,8 mL/min de 2,4 a 4,5 min e depois equilibrado em 0,7 mL/min por 0,5 minutos. O uso de ácido fórmico na fase móvel foi essencial para aumentar a ionização tanto do analito quanto do PI no modo de ionização por eletrospray positivo (ESI(+)). Nessas condições, os tempos de retenção foram de 2,3 min para o PI e 4,0 min para o RN104 (Figura 37).

## 4.2 Preparo da amostra

No processo de preparação de amostras utilizando o método de precipitação de proteínas, foram avaliados dois solventes: acetonitrila e metanol. A introdução de solvente orgânico na amostra provoca uma redução na constante dielétrica da matriz, deslocando as moléculas de água que circundam as regiões hidrofóbicas na superfície da proteína. Isso, por sua vez, facilita as interações eletrostáticas entre as proteínas, levando à sua agregação e subsequente precipitação (POLSON *et al.*, 2003).

A utilização de acetonitrila não gerou resultados satisfatórios, pois durante os testes do solvente extrator, foi observada supressão de ionização para o PI e uma indução de ionização para o composto RN104. Isso impossibilitaria a eliminação do efeito de matriz por meio do FMN. Por outro lado, ao empregar o metanol, foi observada uma supressão de ordens de grandeza muito próximas para ambos os compostos, além de um sobrenadante mais límpido. Portanto, o metanol foi selecionado como solvente extrator para este método.

Figura 37 - Cromatogramas CLAE-EM/EM de plasma branco enriquecido com RN104 (7,5 ng/mL) (A) e PI na concentração de trabalho (100 ng/mL) (B)



Fonte: Dados da pesquisa.

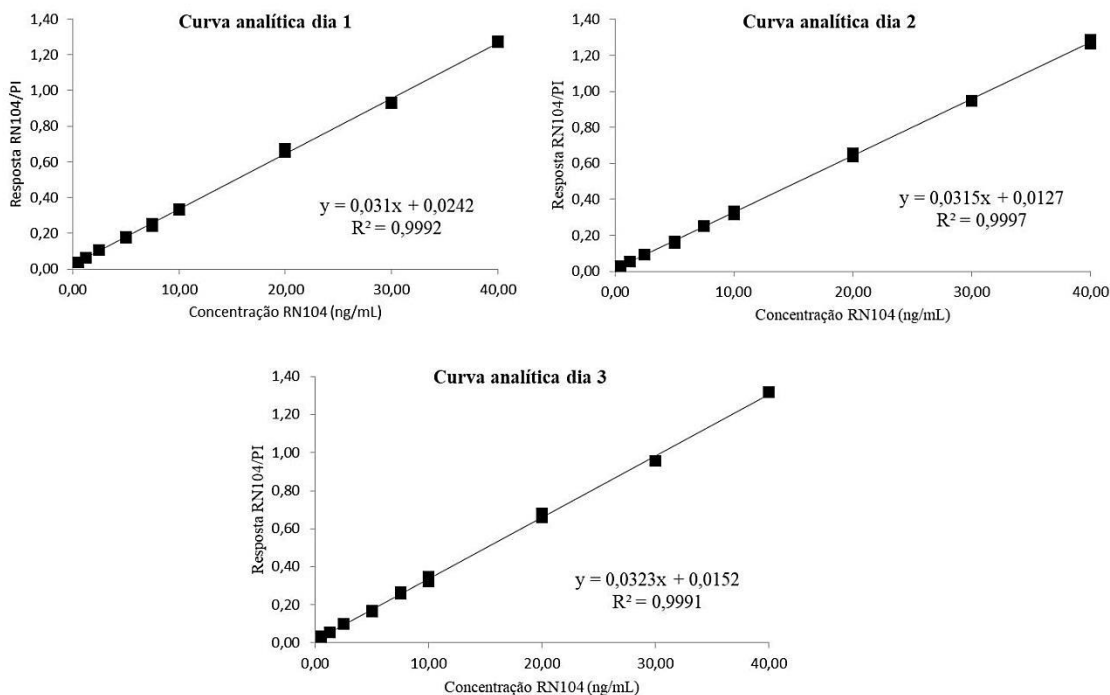
## 4.3 Validação do método

Na validação do método foram construídas três curvas de calibração conforme descrito no item 3.3.3.4. As equações das retas obtidas a partir de cada uma das curvas de calibração são apresentadas na Figura 38.

As curvas foram analisadas em três dias consecutivos e demonstraram uma linearidade adequada dentro da faixa de trabalho (0,50 a 40 ng/mL) para o composto RN104. Esta adequação foi confirmada pelo fato de que todas as três curvas

apresentarem um coeficiente de correlação superior a 0,99,  $DPR \leq 20\%$  em relação à concentração nominal do LIQ e  $DPR \leq 15\%$  em relação às demais concentrações da curva. Nas curvas dos dias dois e três, um ponto foi excluído de cada uma, mantendo-se ainda dentro do limite estabelecido de mais de 75% dos níveis aprovados.

Figura 38 - Curvas analíticas obtidas em plasma de camundongo para o composto RN104, na faixa de 0,5 a 40 ng/mL, em dias consecutivos



Fonte: Dados da pesquisa.

As áreas do PI nas amostras zero foram muito semelhantes às aquelas encontradas para as demais amostras das curvas analíticas. A regressão linear sem fator de ponderação resultou na equação média  $y = 0,0316x + 0,0172$ , com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) acima de 0,99 ( $r^2 = 0,9989$ ).

A seletividade do método foi confirmada pela ausência de qualquer pico interferente nos mesmos tempos de retenção do PI e do RN104, em seis amostras de plasma branco analisadas. Assim, o método foi capaz de diferenciar e quantificar o analito e o PI na presença dos interferentes da matriz biológica, metabólitos e impurezas. Caso o método desenvolvido não seja seletivo, isso pode acarretar na obtenção de concentrações muito diferentes das reais, afetando a precisão e a exatidão das análises.

Para mitigar o efeito residual, a seringa e a alça do injetor foram lavadas por 30 segundos com solução de água: metanol: acetona (40:40:20 v/v). Após a adoção deste procedimento, não foi verificado *carryover* nas amostras de plasma branco injetadas após as amostras de LSQ.

A precisão e exatidão foram confirmadas pelas análises de cinco níveis de CQ: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. O CV esteve consistentemente abaixo de 15% em todas as amostras, e os valores de exatidão variaram de 97 a 102% da concentração nominal, confirmando a exatidão e precisão do método dentro da faixa de concentração testada (Tabela 29). Os resultados do CQD demonstraram que a diluição das amostras com plasma branco dentro da faixa proposta não afetou os resultados da análise.

Tabela 29 - Precisão intracorrida e intercorrida (CV,%) e exatidão (%) para RN104

CQ nível	Intracorrida		Intercorrida	
	(n = 5)		(n = 15)	
	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
LIQ (0,5 ng/mL)	4,46	98,92	5,54	97,55
CQB (1,5 ng/mL)	2,92	97,40	5,67	102,26
CQM (15 ng/mL)	3,73	98,70	2,54	99,13
CQA (35 ng/mL)	3,86	100,76	3,04	99,42
CQD (200 ng/mL)	6,60	102,52	7,15	102,42
CQD (600 ng/mL)	3,82	102,37	6,21	101,56

A avaliação dos valores de FMN não indicou efeito matricial significativo no método, com valores de CV obtidos abaixo de 15% para todas as amostras analisadas (Tabela 30). Assim, a matriz plasmática não interferiu de forma significativa no processo de ionização e na detecção do analito, pois a utilização do FMN foi capaz de minimizar o efeito supressor observado.

Tabela 30 - FMN calculados a partir dos testes de efeito matriz

	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
FMN			
1	1,01	1,01	0,99
2	1,01	0,96	0,98
3	1,01	1,03	1,02
Média FMN	1,01	1,00	1,00
CV (%)	0,43	3,98	1,88

A recuperação foi avaliada por meio da comparação de amostras de plasma branco adicionadas de RN104 e PI antes da extração com amostras em solução, nas mesmas concentrações. Os resultados foram expressos em relação à porcentagem da concentração nominal do analito na matriz biológica (Tabela 31).

Tabela 31 - Taxas de recuperação (%) obtidas para RN104 e PI

<b>Recuperação (%)</b>	<b>CQB</b>			<b>CQM</b>			<b>CQA</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Replicatas									
RN104	73,82	74,96	74,47	73,91	74,63	75,03	77,62	77,73	76,66
Média ± desvio (n = 3)	74,42 ± 0,54			75,03 ± 1,35			77,34 ± 0,58		
Replicatas									
PI	76,07	74,15	75,46	74,97	76,60	76,84	72,33	74,21	73,03
Média ± desvio (n = 3)	75,23 ± 0,95			76,14 ± 1,02			73,19 ± 0,93		

A recuperação relativa média (n = 9) de RN104 e PI foi de  $75,59 \pm 1,54\%$  e  $74,85 \pm 1,48\%$ , respectivamente. Não há um limite estabelecido para a aprovação da recuperação, porém é desejado que as taxas de recuperação tanto do analito quanto do PI sejam constantes dentro da faixa de concentração de trabalho como apresentado neste método.

O RN104 demonstrou estabilidade em amostras de plasma durante pelo menos 6 horas à temperatura ambiente (ECD), oito semanas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ELD), 6 horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  após a extração (EPP) e após três ciclos de congelamento-descongelamento (ECC), uma vez que as alterações médias no conteúdo do analito permaneceram dentro de  $\pm 15\%$  (EPR %) da concentração inicial (Tabela 32). Todas as amostras de plasma obtidas de camundongos no estudo farmacocinético e durante a validação foram processadas dentro dos prazos definido e dos ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela 32 - Resultados obtidos na avaliação da estabilidade do RN104 em plasma de camundongo

	ECC			ECD		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	1,28	12,80	30,55	1,33	12,60	32,82
CV%	5,19	4,16	2,82	1,43	3,02	2,38
EPR%*	-13,44	-7,63	-13,36	-8,14	-14,39	-6,93
	ELD			EPP		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	1,31	13,64	31,73	1,31	14,51	31,34
CV%	4,46	2,13	8,07	2,14	8,79	4,22
EPR%*	-11,06	-1,59	-10,01	-9,30	-2,01	-11,13

\* Calculado em relação às amostras recém-preparadas.

Dessa maneira, é possível afirmar que nas análises realizadas foram obtidos valores próximos aos reais, uma vez que a estabilidade do RN104 e PI na matriz biológica foi comprovada.

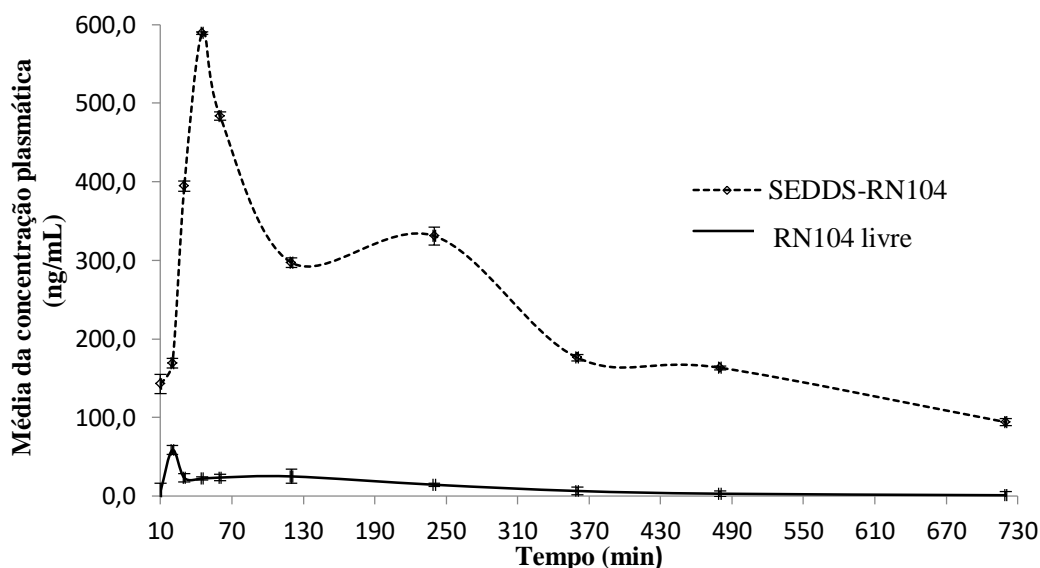
#### 4.4 Estudo farmacocinético

Nenhuma mudança comportamental ou sinais de toxicidade foram observados nos camundongos ao longo do experimento. A extração do RN104 do plasma e sua quantificação seguiram o método bioanalítico validado neste estudo. Amostras de

plasma acima do LSQ foram diluídas de acordo com o procedimento validado e reanalisadas para se adequarem à faixa de concentração da curva de calibração.

A Figura 39 mostra o gráfico referente à concentração do RN104 no plasma *versus* o tempo após a administração *per os* de SEDDS-RN104 e RN104 livre. Concentrações plasmáticas expressivamente mais altas do RN104 foram encontradas nos camundongos que receberam SEDDS-RN104 em comparação com aqueles tratados com RN104 livre. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados e estão na Tabela 33.

Figura 39 - Curvas de concentração plasmática *versus* tempo para SEDDS-RN104 e RN104 livre após administração *per os* em camundongos  
(média  $\pm$  desvio padrão, n = 4)



Fonte: Dados da pesquisa.

Em comparação com o RN104 livre, foi observado um aumento de 21 vezes na  $AUC_{0-t}$  do SEDDS-RN104. A biodisponibilidade relativa do SEDDS-RN104 em relação ao RN104 livre foi de 2133%. Estes resultados demonstraram um aumento significativo na biodisponibilidade oral do RN104 após sua incorporação no SEDDS formulado.

Em estudo anterior (de SÁ *et al.*, 2018), camundongos infectados com *Cryptococcus* foram tratados com RN104 livre por via intraperitoneal na dosagem de 10 mg/kg. Os resultados revelaram uma maior taxa de sobrevivência para animais tratados com RN104 livre em comparação com o grupo controle tratado com fluconazol na mesma dose (10 mg/kg). Portanto, considerando-se que no presente estudo foi utilizada

a dose de 50 mg/kg, prevê-se que a concentração plasmática observada para SEDDS-RN104 seja suficientemente eficaz para controlar a infecção fúngica.

Tabela 33 - Parâmetros farmacocinéticos após administração *per os* de SEDDS-RN104 e RN104 livre em camundongos (média  $\pm$  desvio padrão)

Parâmetros	SEDDS-RN104	RN104 livre
$C_{\max}$ (ng/mL)	589,2 $\pm$ 10,8	58,6 $\pm$ 3,3
$T_{\max}$ (min)	45 $\pm$ 0	20 $\pm$ 0
AUC <sub>0-t</sub> (ng/mL.h)	2698,5 $\pm$ 52,7	126,5 $\pm$ 3,3
AUC <sub>0-∞</sub> (ng/mL.h)	3549,3 $\pm$ 67,5	130,2 $\pm$ 3,4
$T_{1/2}$ (h)	6,3 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,1
$K_{el}$ (h <sup>-1</sup> )	0,11 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01
Vd/F (L/Kg)	0,13 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,04
CL/F (mL/h/Kg)	0,01 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,01
Biodisponibilidade relativa (%)	2133	-

n = 4 /tempo de coleta

Os componentes utilizados no SEDDS desempenham um papel fundamental na solubilização do RN104, pois esta formulação apresenta o ativo em nanogotículas, oferecendo uma área superficial significativamente aumentada que facilita sua absorção. Outro aspecto notável do SEDDS envolve o seu potencial de absorção por meio do sistema linfático, contornando assim o metabolismo hepático de primeira passagem (CHATTERJEE *et al.*, 2016). Dentro do intestino, a emulsão formada pode ser absorvida pelas células M das placas de Peyer. No lúmen intestinal, os triglicerídeos que constituem o SEDDS sofrem decomposição em diglicerídeos, monoglicerídeos e, finalmente, em ácidos graxos livres, que podem formar micelas mistas com sais biliares, entrando nos enterócitos. Uma vez dentro dos enterócitos, os monoglicerídeos e os ácidos graxos são recombinados para formar novos triglicerídeos que se fundem com o colesterol, a apolipoproteína B-48 e os fosfolípidios, dando origem aos quilomícrons (QLM). Os QLM são transportados pelo sistema linfático mesentérico e entram na circulação sistêmica por meio da drenagem linfática no ducto torácico. Conseqüentemente, o ativo-QLM pode entrar no transporte linfático, contornando assim

a circulação portal. Outras possíveis vias de transporte incluem paracelular, fusão e transcitose (DATE *et al.*, 2019; RANI *et al.*, 2019). Esta observação pode explicar porque a taxa de dissolução *in vitro* não é tão significativamente melhorada em comparação com a biodisponibilidade (SHARMA *et al.*, 2020). Os SEDDS demonstraram potencial no aumento da biodisponibilidade oral de vários agentes terapêuticos, como albendazol, ramipril, ezetimiba, cefpodoxima e curcumina (DATE *et al.*, 2010, ZHU & ZHANG, 2020).

Observam-se dois picos na concentração plasmática após a administração do SEDDS-RN104, em 45 min e 250 min, respectivamente. Esse achado pode estar relacionado à circulação entero-hepática, captação por via linfática ou à presença de dois locais de absorção distintos no TGI (ROBERTS *et al.*, 2002; SHAIENDRAKUMAR *et al.*, 2020).

O  $T_{max}$  do SEDDS-RN104 foi mais que o dobro do obtido para o RN104 livre, indicando uma liberação mais sustentada após administração oral. Da mesma forma, o  $T_{1/2}$  obtido para a formulação foi consideravelmente superior (3 vezes). O aumento do  $T_{1/2}$  e a redução do *clearance* obtidos com a formulação SEEDS fazem com que o RN104 seja eliminado mais lentamente, permanecendo disponível na circulação sistêmica por mais tempo. Conseqüentemente, esses fatores levam a um aumento na área sob a curva e na biodisponibilidade do composto.

De forma semelhante, a  $K_{el}$  do SEDDS-RN104 foi três vezes menor que aquela do RN104 livre. Esses achados podem estar relacionados à diminuição do metabolismo de primeira passagem e ao efeito protetor do SEDDS na degradação do RN104. Este efeito pode ser alcançado também pela inibição da atividade do CYP3A4 nos enterócitos em razão da presença dos surfactantes na formulação de SEDDS (ZHANG *et al.*, 2021). Conseqüentemente, a duração da ação do RN104 é prolongada, representando uma vantagem adicional do SEDDS-RN104 em comparação ao RN104 livre.

Os resultados globais do estudo farmacocinético comprovaram que a formulação autoemulsionável desenvolvida cumpriu o seu papel na promoção de uma melhoria na biodisponibilidade oral em relação ao RN104 livre, superando a sua limitada solubilidade em meio aquoso.

Além disso, o perfil de liberação sustentada e a extensão da meia-vida de eliminação do RN104 representam melhorias farmacocinéticas significativas alcançadas com a administração da formulação SEDDS.

## **5 CONCLUSÃO**

SEDDS-RN104 apresentou uma melhoria significativa no perfil farmacocinético e na biodisponibilidade oral deste candidato a fármaco. Portanto, a formulação desenvolvida representa uma conquista notável para superar as limitações biofarmacêuticas e farmacocinéticas do RN104 e consolidar este composto como um potencial candidato antifúngico.

**CAPÍTULO IV**  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E DA CITOTOXICIDADE DO**  
**DERIVADO TIAZOLILHIDRAZONA RN104 INCORPORADO EM SISTEMA**  
**AUTOEMULSIONÁVEL**

## 1 INTRODUÇÃO

No **CAPÍTULO 4** será descrita a avaliação da citotoxicidade do RN104 quando incorporado em um sistema autoemulsionável em comparação à sua forma livre. Para tal, procedeu-se ao teste em células Caco-2 em três diferentes concentrações do RN104. Em seguida, realizou-se o estudo de atividade antifúngica em camundongos C57BL/6 infectados por *Cryptococcus neoformans*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antifúngica do RN104 incorporado em SEDDS em comparação ao ativo livre.

### 2.2 Objetivos específicos

- avaliar a citotoxicidade do RN104 na formulação autoemulsionável em comparação ao composto livre em células Caco-2;
- proceder estudo de atividade antifúngica *in vivo* em camundongos C57BL/6 infectados por *Cryptococcus neoformans* H99.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Solventes e reagentes

- a) Água ultrapurificada filtrada em membrana 0,22 µm;
- b) excipientes utilizados: Tween 80 (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP), Span 80 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo), TCM (Lipoid<sup>®</sup> GmbH, Ludwigshafen, Alemanha), CMC (Dinâmica<sup>®</sup>, Indaiatuba, SP), palmitato de ascorbila (doado por Farmácia de Manipulação);
- c) fluconazol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo);
- d) anestésicos: quetamina e xilazina (Syntec<sup>®</sup>, São Paulo) em PBS;
- e) dimetilsulfóxido (Labsynth<sup>®</sup>, Diadema, SP).
- f) MTT (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, São Paulo).

### 3.1.2 Equipamentos e acessórios

- a) Equipamentos: balança analítica, Shimadzu; agitadores magnéticos; microscópios Olympus<sup>®</sup> CKX53 e Motic<sup>®</sup> BA310E;
- b) Acessórios: fio de sutura (Brasuture<sup>®</sup>); filtro 0,22 µm.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Estudo para avaliação da citotoxicidade da formulação autoemulsionável contendo RN104 em comparação ao ativo livre em modelo de células Caco-2

As células Caco-2 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) em microplacas de 96 poços, na densidade de  $2,0 \times 10^4$  células por poço, incubadas por 48 h a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade.

Após 48 h, o meio de cultura foi retirado e substituído por 100 µL de meio DMEM sem fenol contendo o RN104 na formulação ou em sua forma livre nas concentrações de 5, 10 e 50 µg/mL. Para avaliação do controle de morte celular (controle positivo) foram adicionados meio DMEM contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 50%. Já para o controle de viabilidade celular (controle negativo) foram adicionados meio DMEM puro. A formulação branca também foi testada. Todas as avaliações foram feitas em sextuplicata.

A placa contendo as amostras e os controles foi incubada por 4 horas a 37 °C. Após esse tempo, as soluções em cada poço foram aspiradas e as células novamente incubadas a 37 °C por 2 horas com 30 µL da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) em concentração de 5 mg/mL diluída em meio de DMEM sem fenol e tampão PBS 9:1 (v/v). Em seguida, adicionou-se 70 µL da solução de solubilização de MTT (isopropanol acidificado com HCl 1%). A placa foi então protegida da luz e colocada em um agitador orbital, com agitação a 100 rpm por 15 minutos para favorecer a solubilização dos cristais de formazan.

Após a solubilização, determinou-se as absorbâncias espectrofotometricamente em comprimentos de onda de 570 nm e 690 nm. A viabilidade celular foi calculada em relação a medida de absorbância das células expostas ao controle negativo, que foi considerado o 100% de viabilidade celular.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela aplicação do teste de normalidade seguido por ANOVA de uma via com medidas repetidas e teste de Tukey, a um nível de significância de 95% (Software Past<sup>®</sup> 3.26; HAMMER, HARPER & RYAN, 2001).

### 3.2.2 Estudo para avaliação da atividade antifúngica em modelo murino de infecção por *C. neoformans*

#### 3.2.2.1 Curva de sobrevivência

Para avaliação de atividade antifúngica, utilizou-se camundongos fêmeas C57BL/6, pesando entre 20 e 23 gramas, adquiridas do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, inclusive para os grupos controles. Água e ração fornecidas *ad libitum* e submetidos a ciclos de claro/escuro de 12 horas.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 79/2024, anexos) e seguiram-se protocolos e guias de manejo em consonância com o CONCEA (Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica, 2019).

Para avaliação da influência do RN104 incorporado no sistema autoemulsionável (previamente emulsionado em água ultrapura na proporção de 1:1) na sobrevivência dos animais infectados, foi realizado um estudo no qual os animais foram infectados e tratados diariamente com o RN104 e fluconazol. Para tal, a linhagem *C. neoformans* H99 foi previamente cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 35 °C durante 48 horas. Em seguida, as células foram transferidas para solução salina estéril (NaCl 0,9%) e o inóculo foi contabilizado em câmara de Neubauer com o uso de azul de Trypan e padronizado para  $1 \times 10^5$  células em 30  $\mu$ l.

Para a infecção, os camundongos foram previamente anestesiados com uma solução de quetamina e xilazina, respectivamente, na dose de 80 mg/Kg e 10 mg/Kg diluídas em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Após a sedação, foi realizada a antisepsia do local da incisão utilizando etanol 70% e realizou-se uma pequena incisão medial longitudinal na pele posterior ao mento do animal, próxima à tireoide. A seguir, procedeu-se a separação das camadas dos tecidos expondo a traqueia para a inoculação com 30  $\mu$ L da suspensão fúngica preparada conforme descrito anteriormente. Então, a incisão foi suturada usando um fio de nylon 4-0 (BRASUTURE) e os grupos experimentais foram monitorados e mantidos em gaiolas separadas.

O tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção, sendo 6 animais por grupo. Os tratamentos foram realizados *per os* (50 mg/Kg/animal) e também por via

intraperitoneal (IP) (10 mg/Kg/animal) (SÁ *et al.*, 2018) e cada grupo recebeu o RN104 livre ou SEDDS-RN104. Como controle, foram utilizados: grupo tratado com fluconazol nas mesmas dosagens; grupo que recebeu SEDDS branco; grupo que não recebeu tratamento e grupo não infectado. Os camundongos foram monitorados e tratados diariamente e a curva de sobrevida foi realizada. Aqueles animais que apresentavam sinais avançados da doença como tremores ou imobilidade foram eutanasiados de acordo com as normas do CONCEA.

A construção das curvas de sobrevida bem como as análises estatísticas pertinentes foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.1.

### 3.2.2.2 *Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e avaliação histológica pulmonar e cerebral*

Após análise da sobrevida, novos grupos de animais foram infectados (n = 8/grupo) conforme descrito no item 3.3.2.1, a fim de se analisar a carga fúngica após tratamento por 10 dias. Os grupos foram tratados *per os* com RN104 livre, SEDDS-RN104 ou fluconazol nas mesmas dosagens descritas anteriormente.

Após 10 dias, os animais foram eutanasiados por meio de uma injeção de sobredose de anestésico (quetamina e xilazina, 80 mg/Kg e 10 mg/Kg diluídas em PBS), conforme requerido pelas normas do CEUA da UFMG. O cérebro e pulmão foram retirados, pesados, macerados e diluídos em 1 mL de salina estéril (NaCl 0,9%). Após a homogeneização do macerado, 50 µL de cada pulmão (D1) (n= 6 por grupo) e 100 µL de cada cérebro (n = 6 por grupo) foram plaqueados em ASD e incubados a 35 °C por 48 horas para quantificação da carga fúngica, através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para a determinação de UFC no pulmão, realizou-se duas diluições adicionais de 100 vezes (D2) e de 1000 vezes (D3). Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e então, estabelecida a quantidade de UFC por grama de órgão utilizando a seguinte fórmula (BREDD & DOTERRER, 1916):

$$UFC = \frac{\text{número de colônias}}{\text{peso do órgão}} \times A \times B$$

Em que:

número de colônias = contagem visual do número de colônias na placa;

peso do órgão (g)

A = fator de correção para 1 mL (sendo 10 para o cérebro e 20 para pulmão);

B = fator de diluição (10 para D1, 100 para D2 e 1000 para D3).

Os valores de UFC encontrados para cada grupo foram plotados e os resultados analisados quanto às diferenças significativas por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via a um nível de significância de 95%, seguido de teste de Tukey utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.1.

Para a análise histológica, o pulmão e cérebro foram coletados (n=2/grupo) e acondicionados em solução de formalina a 10% por 24 horas. Após esse período, os órgãos foram transferidos para álcool 70% e mantidos nessa solução por mais 24 horas. Em seguida cada órgão foi cortado em seguimentos e esses acondicionados em cassetes histológicos para confecção de lâminas pela empresa Celulavet – Centro de Diagnóstico Veterinário (Belo Horizonte, MG).

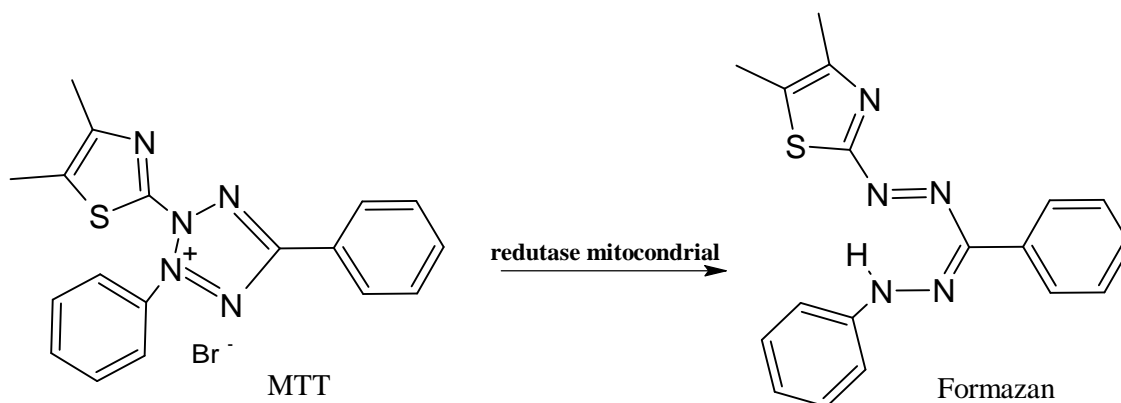
Os tecidos pulmonares foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e os cerebrais em Fontana-Masson (FM) e HE. A visualização dos tecidos foi realizada em microscópio óptico e as imagens respectivas foram capturadas. A quantidade de leveduras e o aspecto visual do tecido foram analisados e classificados segundo um score de 0 a 5 (EMIDIO *et al.*, 2023). Após as pontuações e os resultados foram analisados estatisticamente quanto às diferenças significativas por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via a um nível de significância de 95%, seguido de teste de Tukey utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.1.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Estudo para avaliação da citotoxicidade da formulação autoemulsionável contendo RN104 em comparação ao ativo livre em modelo de células Caco-2**

O método descrito por Mosmann (1983) baseia-se na redução de um sal tetrazólio amarelo (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou MTT) no produto formazan que são cristais de coloração roxa. Essa reação ocorre porque as células viáveis contêm enzimas oxidoredutases dependentes de NADPH que reduzem o MTT em formazan (Figura 40) e é usada para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade (GERLIER & THOMASSET, 1986).

Figura 40 - Esquema da conversão de MTT em cristais de formazan pela enzima redutase mitocondrial



Fonte: Adaptado de GERLIER & THOMASSET, 1986.

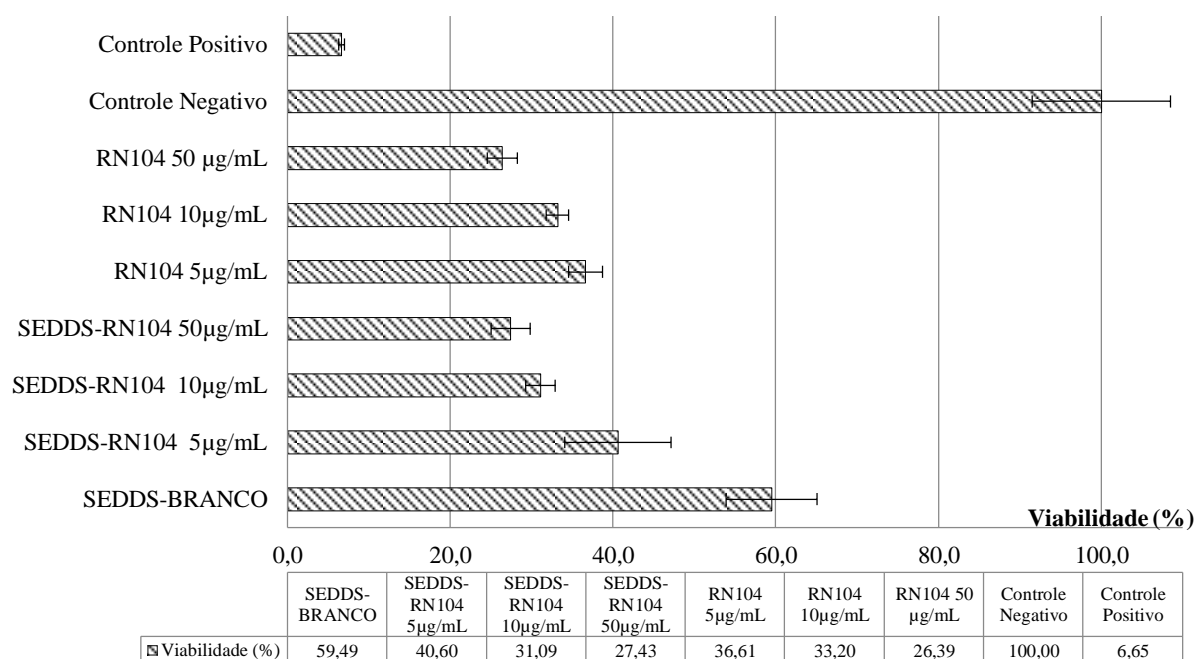
Os cristais de Formazan são insolúveis em água, e só são dissolvidos usando uma solução de solubilização composta por isopropanol acidificado. A solução colorida resultante é quantificada por meio da medida da absorbância de cada poço. Quanto mais roxa a solução, maior é o número de células viáveis metabolicamente ativas.

A partir dos valores de absorbância medidos para cada um dos poços, calculou-se a viabilidade das células Caco-2. Os resultados dos ensaios de MTT foram utilizados para construir um gráfico de porcentagem de viabilidade celular em relação às diferentes concentrações testadas de SEDDS-RN104 e RN104 livre (Figura 41).

A citotoxicidade é a capacidade intrínseca de uma substância em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo ou não culminar em morte celular. As células Caco-2 são originárias de carcinoma de cólon humano. Em condições experimentais específicas, têm capacidade de se diferenciar formando uma monocamada com características funcionais e morfológicas semelhantes ao epitélio intestinal (HIDALGO, RAUB & BORCHARDT, 1989).

O resultado do controle negativo foi considerado como 100% de viabilidade. O controle positivo resultou em uma viabilidade celular de  $6,65 \pm 0,34$  %. De acordo com os resultados do teste, todas as concentrações testadas de SEDDS-RN104 e de RN104 livre foram tóxicas para as células Caco-2, uma vez que todos os valores de viabilidade celular foram inferiores a 70%, incluindo a formulação branca.

Figura 41 - Gráfico de viabilidade celular (%) em relação às diferentes concentrações testadas de SEDDS-RN104 e de RN104 livre

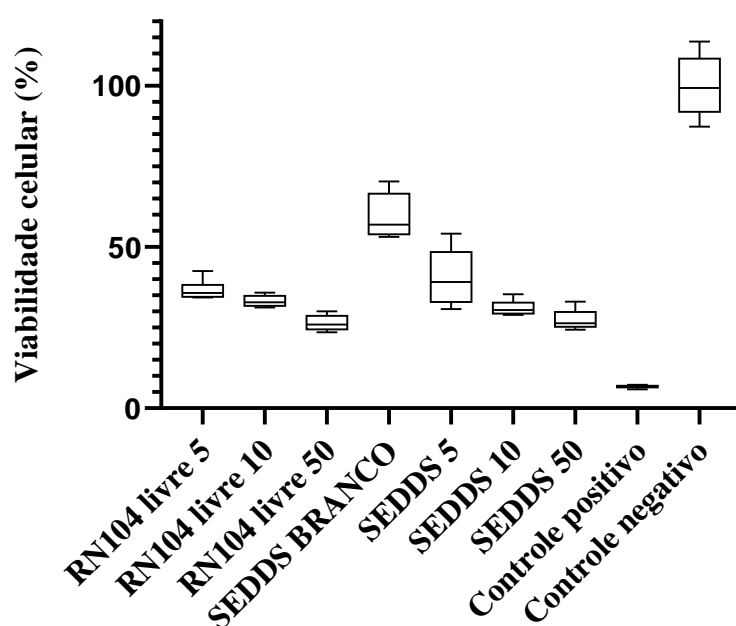


É interessante ressaltar que o teste de one-way ANOVA indica que há diferença estatística entre os grupos ( $F$  calculado = 34,56 >  $F$  tabelado = 22,38). O pós-teste de Tukey indica que a formulação branca é significativamente menos tóxica que todas as concentrações do RN104 livre testadas. Isso indica que apesar da concentração de tensoativo presente no SEDDS, a formulação é capaz de minimizar o efeito tóxico observado com a molécula livre. A formulação carregando a menor concentração do RN104 (5 µg/mL) é menos tóxica que o ativo livre nessa mesma concentração. Porém para as demais concentrações não houve diferença significativa entre a formulação e o ativo livre, como evidenciado no gráfico Box-plot apresentado na Figura 42.

O modelo de células Caco-2 tem sido amplamente utilizado para avaliar a permeabilidade e a toxicidade de candidatos a fármacos e possui valor preditivo bastante confiável. Porém vale destacar que esse modelo apresenta algumas deficiências como a falta da camada de muco, a variabilidade entre laboratórios, diferenças em expressão de enzimas e transportadores, junções mais estreitas que a dos enterócitos humanos, além do longo período de cultivo necessário (PANSE & GERK, 2022).

A citotoxicidade dos compostos e dos componentes das formulações para a monocamada de células Caco-2 é uma das limitações cruciais das avaliações de permeabilidade em condições *in vitro*. O efeito citotóxico pode levar a rompimentos na monocamada, no caso dos SEDDS pela presença de tensoativos, ou ainda afetar a atividade dos transportadores e, portanto, gerar uma avaliação inadequada do efeito de efluxo (BU *et al.*, 2016).

Figura 42 - Gráfico Box-plot para viabilidade celular (%) dos diferentes tratamentos avaliados



Fonte: Dados da pesquisa.

Assim, antes dos estudos de permeabilidade, recomenda-se determinar os efeitos do ativo e da formulação na viabilidade da monocamada das células Caco-2. Como o RN104 e a formulação autoemulsionável impactaram na viabilidade das células, não foi possível realizar o estudo de permeabilidade.

## 4.2 Estudos para avaliação da atividade antifúngica em modelo murino de infecção por *C. neoformans*

### 4.2.1 Curva de sobrevivência

Em 1958, Edward L. Kaplan e Paul Meier publicaram um artigo sobre como tratar os dados de observações incompletas (KAPLAN & MEIER, 1958). Atualmente,

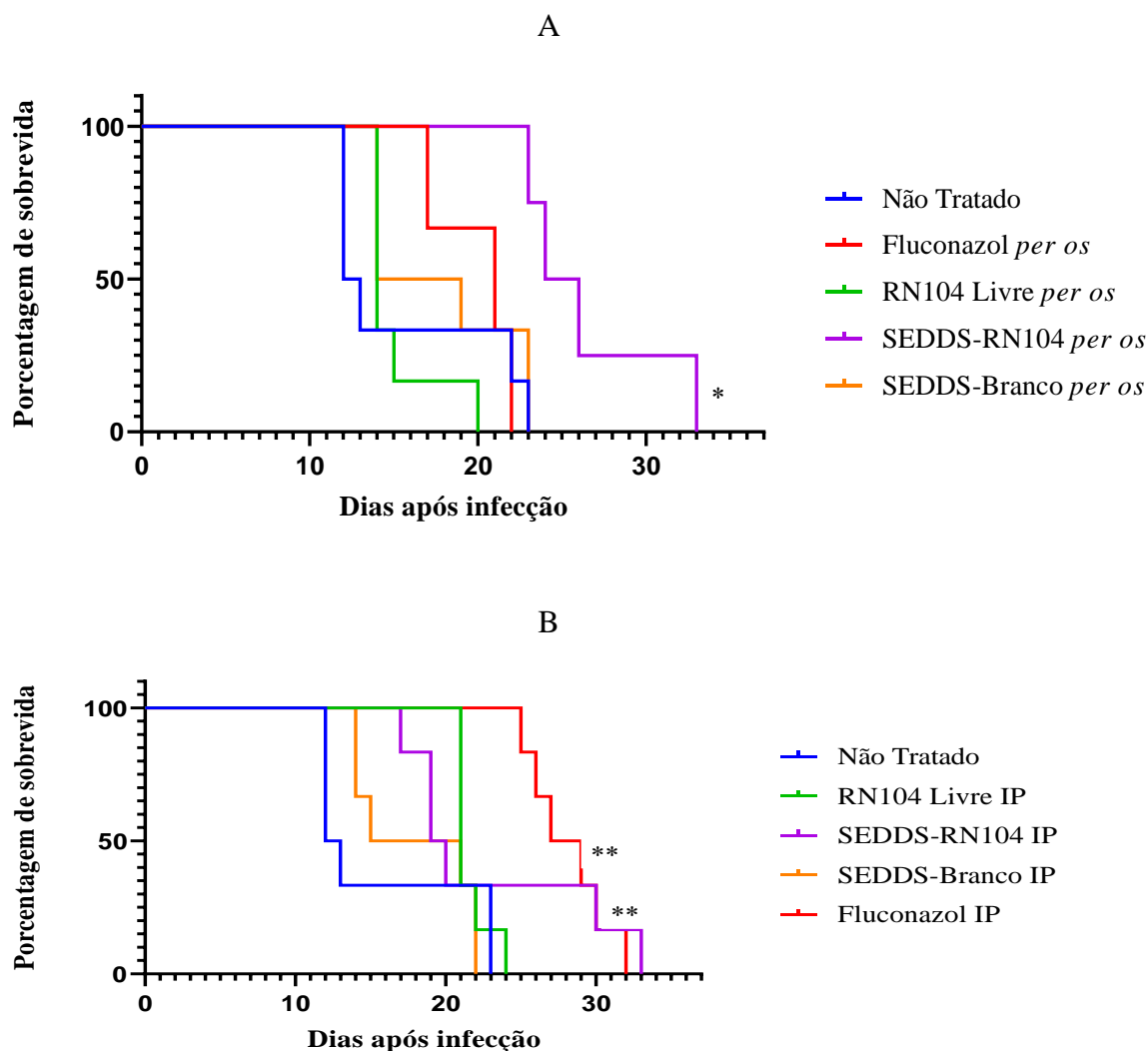
as curvas de Kaplan-Meier são amplamente utilizadas em pesquisas médicas e de saúde para analisar o tempo até a ocorrência de um evento específico e comparar a eficácia de diferentes tratamentos ou intervenções (RICH *et al.*, 2010).

A análise de sobrevivência é um modelo estatístico não paramétrico no qual a variável dependente é o intervalo de tempo enquanto a variável independente é a ocorrência de determinado evento, que pode ser a morte (LIRA, ANTUNES-FOSCHINI & ROCHA, 2020).

Na Figura 43, estão apresentadas as curvas de sobrevida estimadas por Kaplan-Meier para cada um dos tratamentos administrados.

Figura 43 - Curvas de Kaplan-Meier para os tratamentos administrados pelas vias *per os* (A) e intraperitoneal (B); \* ( $p < 0,05$  em relação ao grupo NT e aos demais tratamentos)

\*\* ( $p < 0,05$  em relação ao grupo NT)



Pode-se observar na Figura 43 A que a curva de sobrevivência após o tratamento com SEDDS-RN104 *per os* ficou acima de todas as outras, sugerindo que os animais que receberam a formulação desenvolvida tem maior probabilidade de sobreviver por mais tempo do que os que receberam outros tratamentos. Já na Figura 43 B nota-se que os animais tratados com fluconazol e SEDDS-RN104 IP apresentaram curvas bem próximas a partir de 30 dias.

Como passo inicial da análise estatística, estimou-se a mediana em dias após a infecção (d.p.i) para cada tratamento a partir das curvas (Tabela 34).

Tabela 34 - Tempos (d.p.i) de sobrevivência dos animais submetidos a diferentes tratamentos

<b>Tratamentos</b>	<b>Mediana (d.p.i)</b>	<b>Primeiro óbito do grupo (d.p.i)</b>
<b>Não tratado</b>	12,5	12
<b>RN104 livre <i>per os</i></b>	14	14
<b>SEDDS-RN104 <i>per os</i></b>	25	23
<b>SEDDS-branco <i>per os</i></b>	16,5	14
<b>Fluconazol <i>per os</i></b>	19	17
<b>RN104 livre IP</b>	21	22
<b>SEDDS-RN104 IP</b>	20	17
<b>SEDDS-branco IP</b>	17	14
<b>Fluconazol IP</b>	28	25

d.p.i = dias após infecção; IP = intraperitoneal; n = 6.

Como esperado, o menor tempo de vida foi encontrado para o grupo infectado e não tratado, com o primeiro óbito no grupo ocorrendo no 12º dia após a infecção. Ao analisar o efeito dos diferentes tratamentos administrados *per os* na letalidade, observou-se que SEDDS-RN104 retardou significativamente o início dos óbitos, com o primeiro animal sucumbindo no 23º dia. O maior tempo de sobrevivência foi observado com a administração intraperitoneal de fluconazol, com o primeiro óbito ocorrendo no 25º dia, conforme demonstrado na Tabela 34.

Para a comparação dos tratamentos, os resultados foram agrupados por vias de administração e aplicou-se o teste de *logrank*. Este teste sob a hipótese de igualdade das

curvas de sobrevida tem uma distribuição qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de valor igual a 13,04 para a via *per os* e de 13,81 para a via IP, resultando em um p-valor respectivamente de 0,0079 e 0,0111, o que evidencia a existência de diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Para identificar quais tratamentos diferem entre si dentro de uma mesma via de administração, realizaram-se comparações, dois a dois, usando o teste de *logrank* combinado à avaliação do *hazard ratio* (HR). O HR é calculado a partir da razão entre as inclinações das curvas de sobrevida (ou taxa de risco), uma medida da velocidade com que os indivíduos de um grupo morrem (VERBEECK & SAAD, 2024).

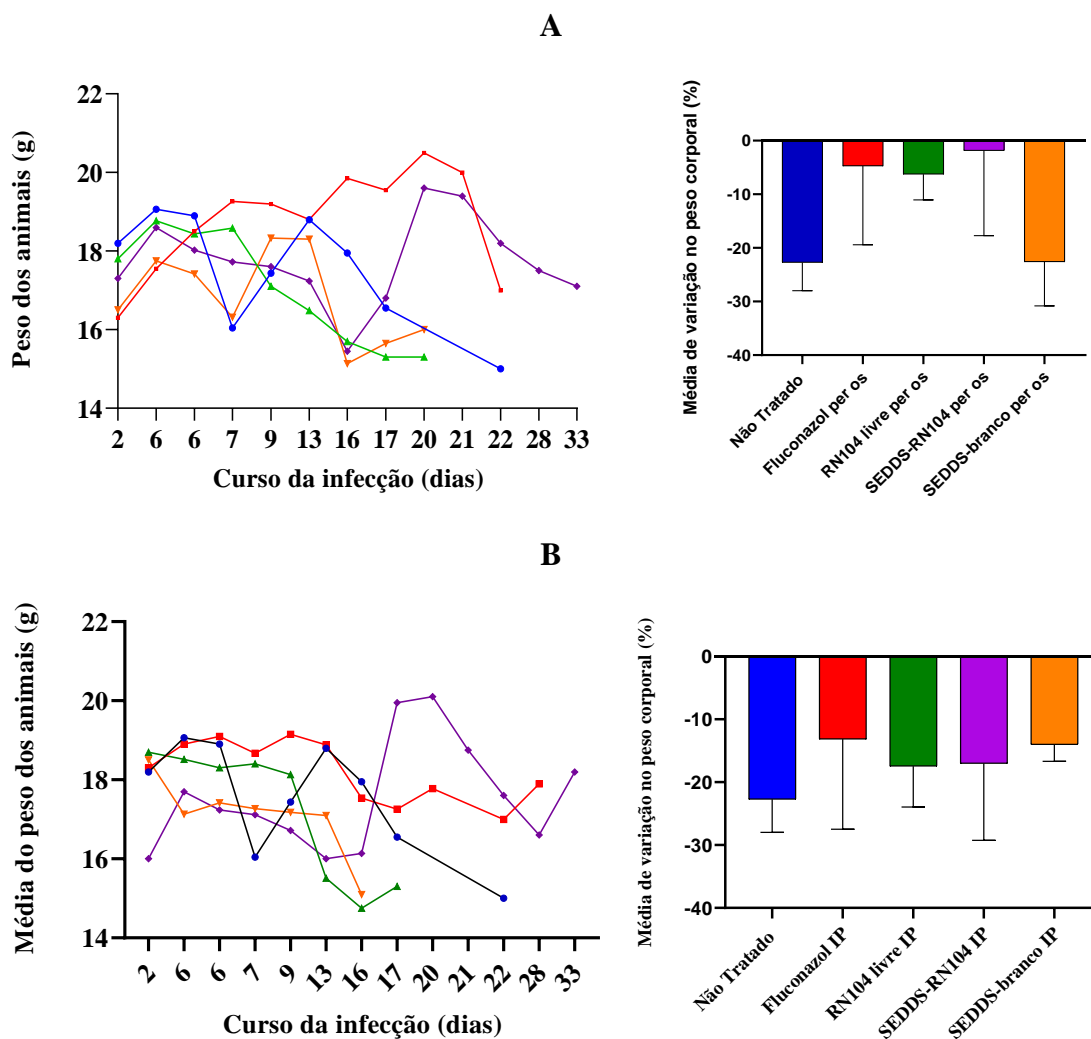
Quando se compara o fluconazol e SEDDS-RN104 administrados *per os*, obteve-se um p-valor igual a 0,0067 no teste *logrank*, indicando uma diferença significativa entre estes tratamentos ( $p < 0,05$ ), com um HZ (SEDDS-RN104/fluconazol) igual a 0,22. Esse valor de HZ indica uma redução de 78% na taxa de eventos (morte) quando se administra SEDDS-RN104 em comparação ao fluconazol. A formulação também demonstrou ser significativamente superior ao RN104 administrado em sua forma livre ( $p = 0,0024$ ; HZ SEDDS-RN104/RN104 livre = 0,27).

Além disso, ao analisar os dados do grupo não tratado comparado ao grupo tratado com a formulação branca (SEDDS-Branco) *per os*, não há evidência estatística de diferença entre eles ( $\chi^2 = 1,33$ ;  $p = 0,2485$ ). Isso sugere que a formulação desenvolvida não é tóxica aos animais na dose administrada diariamente. Outro dado que reforça essa conclusão é que a variação de peso corporal desses grupos também não apresentou diferença significativa ( $p = 0,9999$ ), indicando que a formulação não afeta adversamente no peso dos animais (Figura 44 A). A perda de peso do grupo não tratado ( $-22,71 \pm 2,16$  %) é de mesma ordem da do grupo que recebeu SEDDS-branco ( $-22,58 \pm 3,36$  %), indicando que provavelmente esteja relacionada ao curso da doença. Outro ponto a destacar é que a menor perda de peso foi observada no grupo tratado com SEDDS-RN104 *per os* ( $-1,84 \pm 6,32$ ) sendo significativamente diferente de outros grupos que receberam tratamento.

Quando a via de administração avaliada é a IP (Figura 43 B), observa-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados com fluconazol e SEDDS-RN104 ( $\chi^2 = 0,1013$ ;  $p = 0,7503$ ), nem quando comparamos RN104 livre e SEDDS-RN104 ( $\chi^2 = 0,0450$ ;  $p = 0,9463$ ). A formulação branca administrada no peritônio dos animais também não causou efeitos tóxicos, uma vez que não houve

diferença estatística na curva de sobrevida entre SEDDS-Branco e o grupo NT ( $\chi^2 = 0,0450$ ;  $p = 0,9463$ ). Quando se avalia a média da variação de peso corporal, há diferença estatística entre o grupo não infectado e os grupos tratados, mas não entre os diferentes tratamentos (Figura 44 B).

Figura 44 - Média do peso dos animais de cada grupo experimental tratado por via *per os* (A) e intraperitoneal (B) ao longo do curso da infecção (dias)



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

Por fim, comparou-se as curvas de sobrevida dos grupos tratados com fluconazol IP e SEDDS-RN104 *per os* ( $\chi^2 = 0,0144$ ;  $p = 0,9042$ ), bem como entre SEDDS-RN104 IP e *per os* ( $\chi^2 = 0,4981$ ;  $p = 0,4803$ ) verificando que não houve diferença significativa entre eles.

O resultado da curva de sobrevida de SEDDS-RN104 *per os* pode estar relacionado à farmacocinética da formulação autoemulsionável, que promoveu um

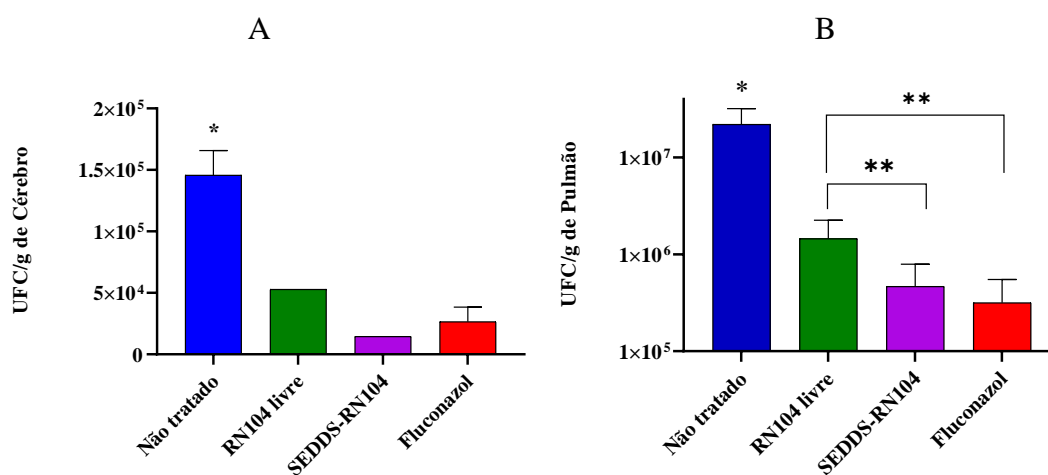
aumento do  $T_{1/2}$ , redução do *clearance* e aumento significativo do  $C_{max}$ . Dessa forma, com a formulação, foi possível superar as limitações farmacocinéticas do RN104, resultando em um ganho na eficácia terapêutica.

#### 4.2.2 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e avaliação histológica pulmonar e cerebral

A carga fúngica pulmonar e cerebral recuperada foi menor em todos os grupos que receberam tratamento quando compara ao grupo não tratado (Figura 45).

No cérebro (Figura 45A), a carga fúngica recuperada nos animais do grupo não tratado apresentou uma média de  $1,46 \times 10^5$  UFC/g. Já para o grupo tratado com fluconazol a média foi de  $2,70 \times 10^4$ . O valor de UFC/g foi  $5,29 \times 10^4$  no RN104 livre e  $1,45 \times 10^4$  no SEDDS-RN104. Houve diferença estatística entre o grupo não tratado e os demais que receberam tratamento ( $p = 0,0065$ ). Entretanto, não foi possível estabelecer uma diferença significativa entre os tratamentos realizados com RN104, uma vez que foi possível a recuperação de fungos em apenas um animal dentro desses grupos. Apesar disso, o composto RN104 demonstrou potencial na redução da carga fúngica cerebral, já que fungos foram recuperados de apenas um animal em cada grupo tratado ( $n = 6$ ) com RN104, enquanto no grupo tratado com fluconazol a recuperação ocorreu em 3 animais ( $n = 6$ ).

Figura 45 - Determinação de UFC/g no cérebro (A) e UFC/g no pulmão (B) após 10 dias de infecção intratraqueal com  $1 \times 10^5$  células de *C. neoformans* H99 e tratamento diário; \* ( $p < 0,05$  em relação aos grupos que receberam tratamento; \*\* ( $p < 0,05$  entre os tratamentos)



Fonte: Dados da pesquisa, GraphPad Prism®.

No pulmão (Figura 45B), a carga fúngica recuperada nos grupos tratados foi significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo não tratado. A média de UFC/g foi de  $1,76 \times 10^7$  nos animais não tratados e de  $1,62 \times 10^6$ ,  $5,56 \times 10^5$  e  $4,77 \times 10^5$  UFC/g para RN104 livre, fluconazol e SEDDS-RN104, respectivamente. A administração de SEDDS-RN104 resultou em uma redução significativa na carga fúngica pulmonar em relação ao RN104 livre ( $p < 0,05$ ). No que se refere ao fluconazol, não houve diferença significativa em comparação com o SEDDS-RN104 ( $p = 0,9788$ ).

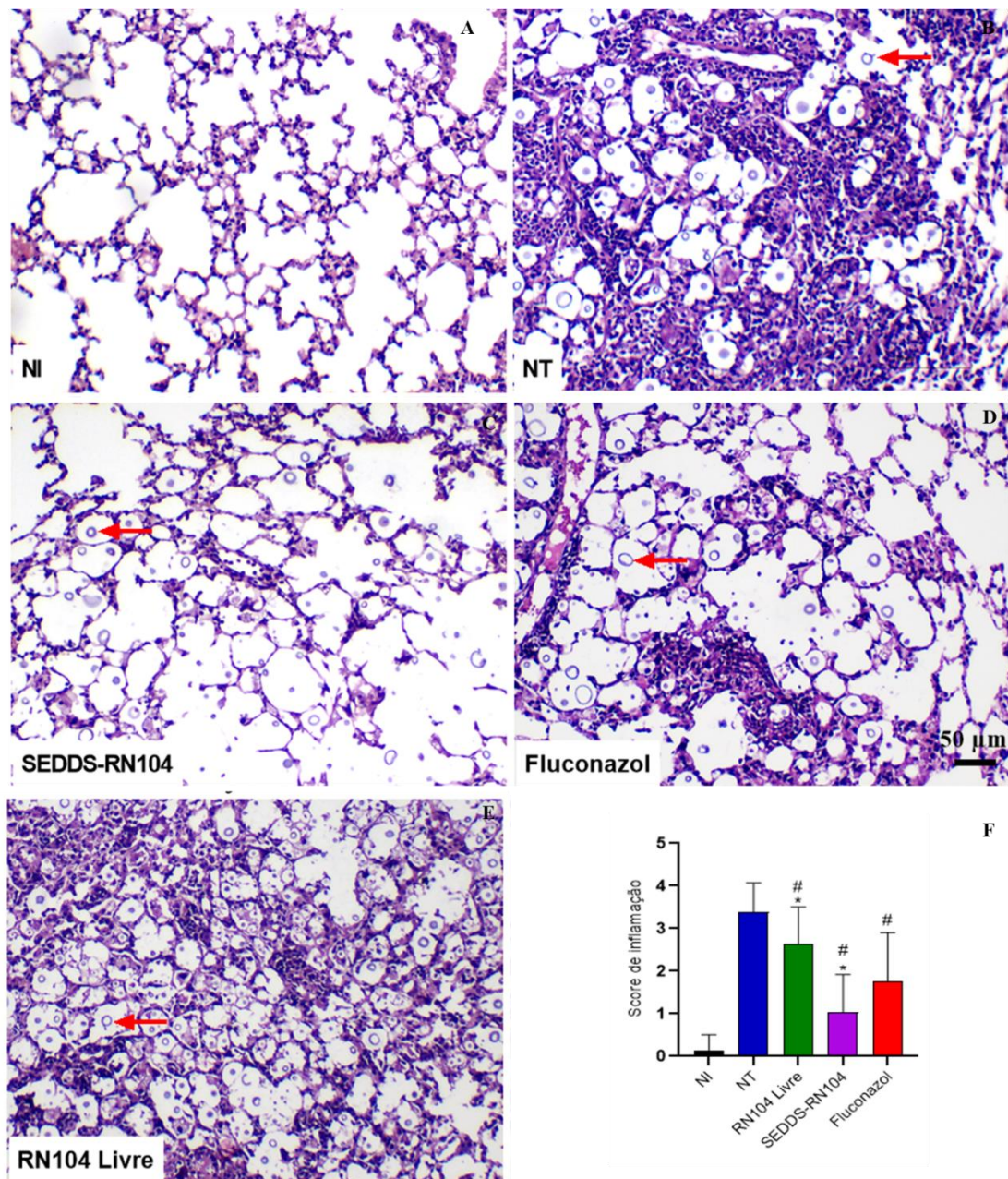
Para o preparo das lâminas de histologia utilizou-se duas colorações, HE (cérebro e pulmões) e Fontana-Masson (FT) (cérebro), sendo a última capaz de evidenciar a parede celular fúngica e os pigmentos de melanina (GAZZONI, PEGAS & SEVERO, 2008).

A análise histológica pulmonar (Figura 46) revelou que os camundongos não tratados apresentaram um infiltrado inflamatório difuso e intenso, além da perda da estrutura da parede alveolar. O grupo tratado com SEDDS-RN104 mostrou um menor número de leveduras (apontadas pelas setas), infiltrado inflamatório discreto e preservação da integridade da parede alveolar, tanto em comparação ao grupo não tratado quanto aos demais tratamentos ( $p < 0,0001$ ). Todos os grupos tratados (RN104 livre, SEDDS-RN104 e fluconazol) apresentaram um menor escore inflamatório em comparação ao grupo não tratado. Entre os tratamentos analisados, o grupo SEDDS-RN104 destacou-se por apresentar menor inflamação em relação ao fluconazol ( $p = 0,0179$ ) (Figura 46 F).

Já na análise histopatológica do cérebro dos animais (Figura 47), não foi possível detectar sinais de inflamação ou a presença de leveduras após o tempo de infecção avaliado. Esses resultados são condizentes com aqueles encontrados nos experimentos de determinação do número de UFC, que indicaram menor carga fúngica no cérebro, comparado ao pulmão.

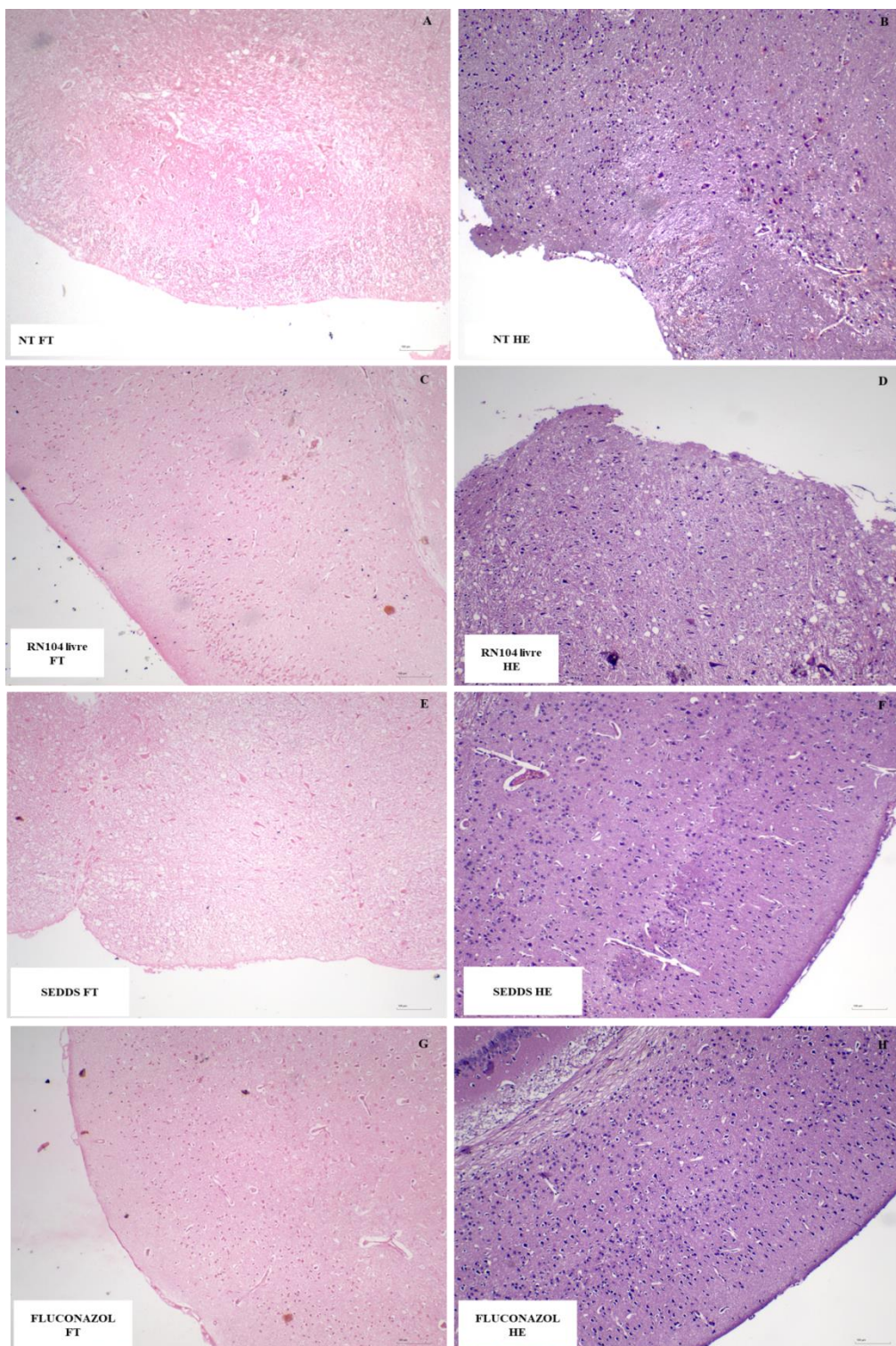
Com base nesses resultados, a formulação SEDDS-RN104 mostrou uma atividade antifúngica promissora nos principais órgãos acometidos pela criptococose, principalmente o pulmão. A similaridade entre a potência de SEDDS-RN104 e do fluconazol indica que a formulação pode ser uma alternativa viável ao tratamento antifúngico convencional para criptococose pulmonar.

Figura 46 - Secções histopatológicas de pulmão dos grupos experimentais. (A) não infectado, (B) não tratado, (C) tratado com SEDDS-RN104, (D) tratado com fluconazol e (E) tratado com RN104 livre (E). (F) Gráfico de escore de inflamação pulmonar. As setas vermelhas indicam as leveduras identificadas. \* $p < 0,05$  em relação ao fluconazol, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo não tratado; pontas das setas em vermelho destacam a presença do fungo



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 47 - Secções histopatológicas de cérebros dos grupos experimentais. (A e B) não tratado; (C e D) RN104 livre; (E e F) SEDDS-RN104 e (G e H) fluconazol. HE = hematoxilina-eosina; FM = Fontana-Masson



Fonte: Dados da pesquisa.

No cérebro, os dados apontaram para uma redução na carga fúngica com o uso de SEDDS-RN104, apesar da recuperação de fungos ter sido limitada a um único animal nos grupos tratados com RN104. Tal resultado é um indício de que o composto é capaz de atravessar a barreira-hematoencefálica. Estudos adicionais com modelo de infecção intracraniana são necessários para melhor avaliação da atividade de SEDDS-RN104 no cérebro.

## **5 CONCLUSÃO**

Os resultados indicaram que a formulação SEDDS-RN104 é uma abordagem promissora para o tratamento da criptococose, principalmente nos pulmões, com uma eficácia comparável ao fluconazol e superior ao RN104 livre.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O SEDDS-RN104 desenvolvido mostrou ser capaz de formar emulsões que retêm o ativo em suas gotículas, após a dispersão em meios que simulam o TGI. As características como tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão permaneceram dentro dos parâmetros adequados. Além disso, a formulação apresentou estabilidade à temperatura ambiente, sendo eficaz na melhoria da farmacocinética do RN104, promovendo concentrações plasmáticas superiores em comparação ao ativo na sua forma livre, em modelo murino.

A administração *per os* da formulação proporcionou uma redução significativa na taxa de mortalidade quando comparada tanto ao fluconazol quanto ao RN104 livre, evidenciando sua eficácia terapêutica. A análise conjunta da curva de sobrevivência e da histopatologia confirmou o efeito antifúngico promissor do sistema, com resultados particularmente destacados nos pulmões dos animais, onde a formulação apresentou um desempenho superior às demais abordagens testadas.

Portanto, o SEDDS-RN104 desenvolvido se apresenta como uma alternativa viável e promissora ao fluconazol no tratamento da criptococose, alcançando eficácia equivalente quando administrado *per os*. Esses achados corroboram a hipótese inicial deste trabalho, demonstrando que um nanossistema pode superar as limitações biofarmacêuticas do RN104, abrindo novas perspectivas para o seu uso no tratamento da criptococose.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, Shweta *et al.* Quetiapine fumarate loaded nanostructured lipid carrier for enhancing oral bioavailability: design, development and pharmacokinetic assessment. **Current Drug Delivery**, v. 18, n. 2, p. 184-198, 2021.

AL-SOUFI, Wajih; NOVO, Mercedes. A surfactant concentration model for the systematic determination of the critical micellar concentration and the transition width. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5339, 2021.

ANDREEVA, Natalia S.; RUMSH, Lev D. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. **Protein Science**, v. 10, n. 12, p. 2439-2450, 2001.

BETAGERI, Guru V. Self-emulsifying drug delivery systems and their marketed products: a review. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm**, v. 13, n. 02, 2019.

BREED, Robert S.; DOTERRER, W. D. The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. **Journal of bacteriology**, v. 1, n. 3, p. 321-331, 1916.

BU, Pengli *et al.* Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 162-171, 2016.

CALVO, Pilar; VILA-JATO, José L.; ALONSO, María J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

ČERPNJAK, Katja *et al.* Lipid-based systems as promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Acta pharmaceutica**, v. 63, n. 4, p. 427-445, 2013.

CHATTERJEE, Bappaditya *et al.* Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. **Drug delivery**, v. 23, n. 9, p. 3639-3652, 2016.

CHEN, Chih-Chieh *et al.* Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 474-482, 2010.

CHEN, Chih-Chieh *et al.* Orally delivered salmon calcitonin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by micelle-double emulsion method via the combined use of different solid lipids. **Nanomedicine** (London). 2013; 8(7):1085–100.

CHEN, Yanli *et al.* Cryptococcus neoformans infection in the central nervous system: the battle between host and pathogen. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1069, 2022.,

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. Nanoemulsions—advances in formulation, characterization and applications in drug delivery. **Application of nanotechnology in drug delivery**, v. 3, p. 77-126, 2014.

CHOI, Kyeong-Ok *et al.* Positively charged nanostructured lipid carriers and their effect on the dissolution of poorly soluble drugs. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 672, 2016.

CONSIGLIERI, Vladi Olga; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. Helou, Cimino e Daffre: Farmacotécnica. 2021.

COSTA, Paulo *et al.* *Substâncias carboniladas e seus derivados*, 1<sup>a</sup> ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.

DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DATE, Abhijit A. *et al.* Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.

DEVRAJ, Ravi *et al.* Choice of nonionic surfactant used to formulate type IIIA self-emulsifying drug delivery systems and the physicochemical properties of the drug have a pronounced influence on the degree of drug supersaturation that develops during *in vitro* digestion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 4, p. 1050-1063, 2014.

DHAVAL, Mori *et al.* Lipid-based emulsion drug delivery systems—A comprehensive review. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 1-24, 2022.

EMIDIO, Elúzia Castro Peres *et al.* Staphylococcus aureus triggers a protective inflammatory response against secondary Cryptococcus gattii infection in a murine model. **Microbes and Infection**, v. 25, n. 6, p. 105122, 2023.

FANG, G *et al.* Improved oral bioavailability of docetaxel by nanostructured lipid carriers: in vitro characteristics, in vivo evaluation and intestinal transport studies. **RSC Adv.** 2015; 5:96437–47.

Farmacopeia Brasileira 6. ed. V. 1, Brasília, DF: Anvisa, 2019. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>.

FIRACATIVE, Carolina *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.

FIRACATIVE, Carolina; MEYER, Wieland; CASTAÑEDA, Elizabeth. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii species complexes in Latin America: a map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 282, 2021.

FRUTON, Joseph S. A history of pepsin and related enzymes. **The Quarterly review of biology**, v. 77, n. 2, p. 127-147, 2002.

GABA, Bharti *et al.* Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration. **Drug Delivery**, v. 22, n. 6, p. 691-700, 2015.

GADAD, Anand Panchakshari *et al.* Rosuvastatin loaded nanostructured lipid carrier: For enhancement of oral bioavailability. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 50, n. 4, p. 605-611, 2016.

GANESAN, Poovi; NARAYANASAMY, Damodharan. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.

GAO, Haoshi *et al.* Integrated in silico formulation design of self-emulsifying drug delivery systems. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 11, p. 3585-3594, 2021.

GASCO, Maria R. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution**. U.S. Patent n. 5,250,236, 5 out. 1993.

GAZZONI, Alexandra Flávia; PEGAS, Karla Lais; SEVERO, Luiz Carlos. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 76-78, 2008

GERLIER, Denis; THOMASSET, Nicole. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of immunological methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 1986.

GUPTA, Shweta; KESARLA, Rajesh; OMRI, Abdelwahab. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

GURRAM, A. K. *et al.* Role of components in the formation of self-microemulsifying drug delivery systems. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 77, n. 3, p. 249, 2015.

GURSOY, R. Neslihan; BENITA, Simon. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 173-182, 2004.

GUSHIKEN, Alexis C.; SAHARIA, Kapil K.; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 493-514, 2021.

HAIDER, Mohamed *et al.* Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 288, 2020.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., and P. D. RYAN, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.

HENAO-MARTÍNEZ, Andrés F.; CHASTAIN, Daniel B.; FRANCO-PAREDES, Carlos. Treatment of cryptococcosis in non-HIV immunocompromised patients. **Current opinion in infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 278-285, 2018.

HIDALGO, Ismael J.; RAUB, Thomas J.; BORCHARDT, Ronald T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 2, p. 736-749, 1989.

IZUTSU, Ken-ichi. Applications of freezing and freeze-drying in pharmaceutical formulations. **Survival strategies in extreme cold and desiccation**, p. 371-383, 2018.

KARWAL, Rohit *et al.* Current trends in self-emulsifying drug delivery systems (SEDDSs) to enhance the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, n. 1, 2016.

KAPLAN, Edward L.; MEIER, Paul. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

KM, Asha Spandana *et al.* A review of the preparation, characterization and application of nanostructured lipid carriers. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1130-1135, 2020.

KOHLI, Kanchan *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. **Drug discovery today**, v. 15, n. 21-22, p. 958-965, 2010.

LEPAK, Alexander J.; ANDES, David R. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 5, p. a019653, 2015.

LIMPER, Andrew H. *et al.* Fungal infections in HIV/AIDS. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e334-e343, 2017.

LIRA, Rodrigo Pessoa Cavalcanti; ANTUNES-FOSCHINI, Rosalia; ROCHA, Eduardo Melani. Survival analysis (Kaplan-Meier curves): a method to predict the future. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 83, p. V-VII, 2020.

MABROUK, Mokhtar M.; HAMED, Nouran A.; MANSOUR, Fotouh R. Physicochemical and electrochemical methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants: a comprehensive review. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 153, n. 2, p. 125-138, 2022.

MAHAPATRA, Anjan Kumar *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): An update from formulation development to therapeutic strategies. **Int. J. PharmTech Res**, v. 6, n. 2, p. 546-568, 2014.

MARQUES BORGES, Gabriel Silva *et al.* Novel self-nanoemulsifying drug-delivery system enhances antileukemic properties of all-trans retinoic acid. **Nanomedicine**, v. 15, n. 15, p. 1471-1486, 2020.

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MISHRA, Vijay *et al.* Orally administered self-emulsifying drug delivery system in disease management: advancement and patents. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 18, n. 3, p. 315-332, 2021.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MOMIN, Mahek; WEBB, Ginny. The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6302, 2021.

MORIBE, Kunikazu *et al.* Drug nanoparticle formulation using ascorbic acid derivatives. **Journal of drug delivery**, v. 2011, n. 1, p. 138929, 2011.

MOURAD, Ahmad; PERFECT, John R. The war on cryptococcosis: a review of the antifungal arsenal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.

MU, Huiling; HOLM, René. Solid lipid nanocarriers in drug delivery: characterization and design. **Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 8, p. 771-785, 2018.

MÜLLERTZ, Anette *et al.* New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1622-1636, 2010.

NGAN, Nguyen Thi Thuy; FLOWER, Barnaby; DAY, Jeremy N. Treatment of Cryptococcal Meningitis: How Have We Got Here and Where are We Going?. **Drugs**, v. 82, n. 12, p. 1237-1249, 2022.

PANSE, Nimishraj & GERK, Phillip M. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 624, p. 122004, 2022.

PATEL, Ravish J.; PATEL, Zil P. Formulation optimization and evaluation of nanostructured lipid carriers containing valsartan. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 2077-2086, 2013

PATEL, P., & PATEL, M. Nanostructured lipid carriers-a versatile carrier for oral delivery of lipophilic drugs. **Recent Patents on Nanotechnology**, 15(2), 154-164, 2021.

PATHAK, Kamla; RAGHUVANSHI, Smita. Oral bioavailability: issues and solutions via nanoformulations. **Clinical pharmacokinetics**, v. 54, n. 4, p. 325-357, 2015.

PATRAVALE, Vandana B.; DATE, Abhijit A. Microemulsions: pharmaceutical applications. **Microemulsions: background, new concepts, applications, perspectives**, p. 259-301, 2009.

PAUL, Kaushani *et al.* Drug–lipid conjugates for enhanced oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 1-11, 2019.

PLAZA-OLIVER, M., SANTANDER-ORTEGA, M. J., & LOZANO, M. V. Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, 11, 471-497, 2021.

POUTON, Colin W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 1997.

POUTON, Colin W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, p. S93-S98, 2000.

POUTON, Colin W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 278-287, 2006.

PRAJAPATI, Hetal N. *et al.* Effect of difference in fatty acid chain lengths of medium-chain lipids on lipid-surfactant-water phase diagrams and drug solubility. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 2, n. 3, p. 73-88, 2011.

QU, Junyan; LV, Xiaoju. Cryptococcal meningitis in apparently immunocompetent patients. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-11, 2022.

RAHMAN, Md Akhlaquer *et al.* Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 1, p. 1-19, 2013.

RANI, Sarita *et al.* Self-emulsifying oral lipid drug delivery systems: advances and challenges. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 3, p. 1-12, 2019.

RATHORE, Sudarshan Singh, *et al.* A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial pathogenesis**, v.166, p. 105521, 2022.

RICH, Jason T. *et al.* A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. **Otolaryngology—Head and Neck Surgery**, v. 143, n. 3, p. 331-336, 2010.

RIZWANULLAH, Md; AMIN, Saima; AHMAD, Javed. Improved pharmacokinetics and antihyperlipidemic efficacy of rosuvastatin-loaded nanostructured lipid carriers. **Journal of drug targeting**, v. 25, n. 1, p. 58-74, 2017.

ROBERTS, Michael S. *et al.* Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. **Clinical pharmacokinetics**, v. 41, p. 751-790, 2002.

SÁ, Nívea Pereira de. *et al.* A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. **Future science OA**, v.4, n.6, p.FSO305, 2018.

SÁ, Nívea Pereira de *et al.* Heterocycle Thiazole Compounds Exhibit Antifungal Activity through Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in the *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* Species Complex. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, 2017.

SÁ, Nívea Pereira de. *et al.* Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 102, p. 233-242, 2015.

SALAWI, Ahmad. Self-emulsifying drug delivery systems: a novel approach to deliver drugs. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 1811-1823, 2022.

SANTIAGO-TIRADO, Felipe H. *et al.* Trojan horse transit contributes to blood-brain barrier crossing of a eukaryotic pathogen. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e02183-16, 2017.

SARANGI, Babita *et al.* Solid lipid nanoparticles: a potential approach for drug delivery system. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**, v. 9, n. 2, p. 142-156, 2019.

SCHULMAN, J. H., STOECKENIUS, W., & PRINCE, L. M.. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of physical chemistry**, 63(10), 1677-1680, 1959.

SHAH, Nirmal V. *et al.* Nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement of raloxifene: Design and *in vivo* study. **Journal of advanced research**, v. 7, n. 3, p. 423-434, 2016.

SHAIENDRAKUMAR, Ashay Manisha *et al.* Improved oral pharmacokinetics of pentoxifylline with palm oil and capmul<sup>®</sup> mcm containing self-nano-emulsifying drug delivery system. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, p. 1-12, 2020.

SHANGGUAN, Mingzhu *et al.* Binary lipids-based nanostructured lipid carriers for improved oral bioavailability of silymarin. **Journal of biomaterials applications**, v. 28, n. 6, p. 887-896, 2014.

SHARMA, Teenu *et al.* Supersaturated LFCS type III self-emulsifying delivery systems of sorafenib tosylate with improved biopharmaceutical performance: QbD-enabled development and evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 839-861, 2020.

SHIRURE, Parikshit Dhanu *et al.* A review on solid lipid nanoparticles: as a promising approach for targeted drug delivery system. **World J Pharm Pharm Sci**, v. 8, p. 433-449, 2019.

SILVA, Iara Rinco. *et al.* Improving the solubility of an antifungal thiazolyl hydrazone derivative by cyclodextrin complexation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 156, p. 105575, 2021.

SILVA, Iara Rinco. *Estudos de estabilidade e farmacocinética de composto hidrazino-tiazólico com atividade antifúngica*. 2019. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2019.

SILVA, Iara Rinco *et al.* Preclinical pharmacokinetic study of a new thiazolyl hydrazone derivative with antifungal activity in mice plasma by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1149, p. 122180, 2020.

SILVA, Iara Rinco *et al.* Stability Indicating Method for a Thiazolyhydrazone Derivative with Antifungal Activity and Experimental/Theoretical Elucidation of Its Degradation Products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022 (ahead of print).

SILVA, Maria Sebastiana *et al.* Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 571-576, 2006.

SINGH, Bhupinder *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 5, 2009.

SINGH, R. Preparation of solid lipid nanoparticles through various methods using different precursors. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 415-419, 2019.

SLOW, Carin Ru Shan; WAN SIA HENG, Paul; CHAN, Lai Wah. Application of freeze-drying in the development of oral drug delivery systems. **Expert opinion on drug delivery**, v. 13, n. 11, p. 1595-1608, 2016.

SORRELL, Tania C. *et al.* Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes and infection**, v. 18, n. 1, p. 57-67, 2016.

SPADARI, Cristina de Castro *et al.* New approaches for cryptococcosis treatment. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 613, 2020.

STORPIRTIS, S. *et al.* **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

TALEGAONKAR, Sushama; BHATTACHARYYA, Arundhati. Potential of lipid nanoparticles (SLNs and NLCs) in enhancing oral bioavailability of drugs with poor intestinal permeability. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 3, p. 1-15, 2019.

TENEVA, O., & DIMCHEVA, N., 2016. Electrochemical assay of the antioxidant ascorbyl palmitate in mixed medium. *Food Chem.*, 203, 35-40.

TIAN, Cihui *et al.* Improving intestinal absorption and oral bioavailability of curcumin via taurocholic acid-modified nanostructured lipid carriers. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 7897, 2017.

TRAN, Phuong; PARK, Jeong-Sook. Recent trends of self-emulsifying drug delivery system for enhancing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 51, p. 439-463, 2021.

TONHOLO, D. R. *et al.* Preclinical toxicity of innovative molecules: In vitro, in vivo and metabolism prediction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 108896, 2020.

TSENG, Hsiang-Kuang *et al.* How Cryptococcus interacts with the blood–brain barrier. **Future microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1669-1682, 2015.

UJHELYI, Zoltán *et al.* Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 27, p. 81-86, 2018.

VERBEECK, Johan; SAAD, Everardo D. Rethinking survival analysis: advancing beyond the hazard ratio?. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, v. 13, n. 3, p. 313-315, 2024.

WISSING, S. A.; KAYSER, Oliver; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

World Health Organization. (2022). Guidelines for diagnosing, preventing and managing cryptococcal disease among adults, adolescents and children living with HIV.

ZAKY, Mohamed F. *et al.* Tailoring apixaban in nanostructured lipid carrier enhancing its oral bioavailability and anticoagulant activity. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 80, 2022.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of Cryptococcus. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.

ZHANG, Rui Xue *et al.* Nanoparticulate drug delivery strategies to address intestinal cytochrome P450 CYP3A4 metabolism towards personalized medicine. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1261, 2021.

ZHUANG, Chun-Yang *et al.* Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International journal of pharmaceutics**, v. 394, n. 1-2, p. 179-185, 2010.

ZHU, Yujin; YE, Jing; ZHANG, Quan. Self-emulsifying drug delivery system improve oral bioavailability: role of excipients and physico-chemical characterization. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 290-301, 2020.

ZÖLLER, Katrin *et al.* Digestion of lipid excipients and lipid-based nanocarriers by pancreatic lipase and pancreatin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2022.

## ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo farmacocinético pré-clínico de composto tiazolihidrazona com atividade antifúngica inserido em carreador lipídico nanoestruturado", protocolo do CEUA: 46/2021 sob a responsabilidade de Isabela da Costa Cesar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/03/2021.

Vigência da Autorização	29/03/2021 a 28/03/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	25g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	25g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	40
Peso/Idade	25g / 40(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia

## Considerações posteriores:

29/03/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 29/03/2021. Validade: 29/03/2021 à 28/03/2026
------------	---

Belo Horizonte, 30/03/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade antifúngica de composto tiazolihidrazona inserido em sistema lipídico autoemulsionável sobre *Cryptococcus* spp", protocolo do CEUA: 79/2024 sob a responsabilidade de Isabela da Costa Cesar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 11/04/2024.

Vigência da Autorização	11/04/2024 a 10/04/2029
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6



Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	23g / 42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	120
Idade	42(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

11/04/2024	Aprovado no dia 11/04/2024. Validade: 11/04/2024 à 10/04/2029 Aprovação será homologada na reunião de 22/04/2024
------------	--

Belo Horizonte, 11/04/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha



# Certificate

We certify that the work "DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOSYSTEMS CONTAINING A NEW ANTIFUNGAL THIAZOLHYDRAZONE COMPOUND," by Isabela Costa César, Iara Rinco Silva, Renata Barbosa de Oliveira, Elaine Amaral Leite, was presented as a poster at the 6<sup>th</sup> Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress, held in Brasilia, Brazil, on November 4<sup>th</sup> - 6<sup>th</sup>, 2022..

*Guilherme Martins Gelfuso*

**Guilherme Martins Gelfuso**  
President of the Congress

*Sandra Helena Poliselli Farsky*

**Sandra Helena Poliselli Farsky**  
President of ABCF



Verifique o código de autenticidade 77929204.5598405.118578.7.865653477624370027828 em <https://www.even3.com.br/documentos>

## V Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas

23, 24 e 25 de agosto de 2023



### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO AO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA AUTOEMULSIONÁVEL (SEDDS) CONTENDO COMPOSTO ANTIFÚNGICO TIAZOLIHDRAZONA** dos autores **Iara Rinco Silva, Elaine Amaral Leite, Renata Barbosa de Oliveira e Isabela da Costa César** foi apresentado na modalidade **Apresentação de Pôster** na área temática de **Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica**, durante o evento **V Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (V SINCIFAR)** realizado nos dias 23, 24 e 25 de agosto de 2023, na cidade de Belo Horizonte – MG.

Belo Horizonte, 25 de agosto de 2023.

*Isabela da Costa César*

**Isabela da Costa César**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia – UFMG

*Gabriel Corrêa Veríssimo*

**Gabriel Corrêa Veríssimo**  
Membro da Comissão Organizadora  
V SINCIFAR





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Enhancing oral bioavailability of an antifungal thiazolyhydrazone derivative: Development and characterization of a self-emulsifying drug delivery system

Iara Rincó Silva, Mateus Araújo Castro e Souza, Renes Resende Machado, Renata Barbosa de Oliveira, Elaine Amaral Leite, Isabela da Costa César\*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
RN104  
Drug delivery  
SEDDS  
Bioavailability  
Antifungal  
LC-MS/MS

### ABSTRACT

RN104 (2-[2-(cyclohexylmethylene)hydrazinyl]-4-phenylthiazole) is a thiazolyhydrazone derivative with prominent antifungal activity. This work aimed to develop a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) loaded with RN104 to improve its biopharmaceutical properties and enhance its oral bioavailability. Medium chain triglycerides, sorbitan monooleate, and polysorbate 80 were selected as components for the SEDDS formulation based on solubility determination and a pseudo-ternary phase diagram. The formulation was optimized using the central composite design in response surface methodology. The optimized condition consisted of medium chain triglycerides, sorbitan monooleate, and polysorbate 80 in a mass ratio of 65.5:23.0:11.5, achieving maximum drug loading (10 mg/mL) and minimum particle size ( $118.4 \pm 0.7$  nm). The developed RN104-SEDDS was fully characterized using dynamic light scattering, *in vitro* release studies, stability assessments, polarized light microscopy, and transmission electron microscopy. *In vivo* pharmacokinetic studies in mice demonstrated that RN104-SEDDS significantly improved oral bioavailability compared to free RN104 (the relative bioavailability was 2133 %). These results clearly indicated the successful application of SEDDS to improve the pharmacokinetic profile and to enhance the oral bioavailability of RN104, substantiating its potential as a promising antifungal drug candidate.

### 1. Introduction

Cryptococcosis is a global fungal systemic infection caused by the yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, affecting mainly immunocompromised patients (Gushiken et al., 2021, Spadari et al., 2020, Zavala and Baddley, 2020). Pulmonary and central nervous system infections are the most common disease manifestations, and meningitis is the primary clinical complication (Howard-Jones et al., 2022, Spec and Powderly, 2018).

The current therapeutic arsenal for cryptococcosis treatment is restricted to amphotericin B, fluconazole, and 5-flucytosine. In addition, the incidence of fungal resistance to these conventional drugs has become a worldwide challenge for the health system. Therefore, developing new antifungal drugs that are more effective, safe, and active against resistant strains is highly relevant for treating current fungal infections (Spadari et al., 2020).

In this context, our research group developed a series of thiazolyhydrazone derivatives, among which 2-[2-(cyclohexylmethylene)hydrazinyl]-4-phenylthiazole (RN104) (Fig. 1) stands out for its relevant activity against *Cryptococcus* genus (de Sá et al., 2015) and low toxicity (Tonholo et al., 2020). RN104 minimum inhibitory concentration (MIC) for *Cryptococcus* was 0.90  $\mu$ M, demonstrating an antifungal activity greater than fluconazole (MIC = 26  $\mu$ M), a standard drug employed for cryptococcosis treatment (de Sá et al., 2015).

RN104 presents both acidic (NH of the hydrazone moiety: pKa 12.2) and basic groups (C=N of the hydrazone moiety: pKa 5.0 and C=N of the thiazole ring: pKa 2.9) (Pan et al., 2021). Despite its good stability in acidic environments (Silva et al., 2023), the oral bioavailability of RN104 poses challenges due to the high lipophilicity ( $\log P = 5.84$ ) and low aqueous solubility at physiological pH. RN104 was predicted to exhibit high gastrointestinal permeability using the Brain or Intestinal Estimated Permeation method (BOILED-Egg) (Daina & Zoete, 2016).

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [isacesar@gmail.com](mailto:isacesar@gmail.com), [isabelacesar@ufmg.br](mailto:isabelacesar@ufmg.br) (I.C. César).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124011>

Received 6 February 2024; Received in revised form 14 March 2024; Accepted 14 March 2024

Available online 16 March 2024

0378-5173/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.