

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

GABRIEL PEDROSO VIÇOZZI

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA DE
NANOCÁPSULAS DE ATORVASTATINA CO-ENCAPSULADAS COM ÓLEO
DE GENGIBRE OU SEMENTE DE UVA

URUGUAIANA

2020

GABRIEL PEDROSO VIÇOZZI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA DE
NANOCÁPSULAS DE ATORVASTATINA CO-ENCAPSULADAS COM ÓLEO
DE GENGIBRE OU SEMENTE DE UVA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo André Bender

Uruguaiana

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

V118d Viçozzi, Gabriel Pedroso

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA DE
NANOCÁPSULAS DE ATORVASTATINA CO-ENCAPSULADAS COM ÓLEO DE
GENGIBRE OU SEMENTE DE UVA / Gabriel Pedroso Viçozzi.

78 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2020.

"Orientação: Eduardo André Bender".

1. Nanotecnologia. 2. Atorvastatina. 3. Biocompatibilidade.
4. C.elegans. 5. Óleo vegetal. I. Título.

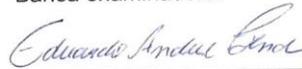
GABRIEL PEDROSO VIÇOZZI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA DE
NANOCÁPSULAS DE ATORVASTATINA CO-ENCAPSULADAS COM ÓLEO DE
GENGIBRE OU SEMENTE DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 09 de março de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Eduardo André Bender
Orientador
UNIPAMPA



Prof.^a. Dr.^a. Leticia Marques Colomé
UNIPAMPA



Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a deus. Também agradeço a minha família principalmente a minha mãe e meus avós por sempre estarem a meu lado em minhas decisões. O meu falecido pai que infelizmente não está mais entre nós, mas mesmo assim acredito de onde estiver está sempre torcendo e me guiando pelo caminho.

Agradeço também a professora Letícia Colomé por ser a minha primeira orientadora nesta caminhada acadêmica e me introduzir ao mundo da “nano”.

Ao meu orientador Eduardo só tenho a agradecer, pois sempre esteve presente quando precisei de aconselhamentos ou simplesmente para tomar um café e compartilhar as novidades. E pela oportunidade de ser seu aluno, eu me inspiro no senhor como pesquisador e como pessoa e espero chegar um dia a ser a pessoa que você é hoje.

Não menos importante agradeço também ao pessoal do LABNANO desde aos que já se foram como o Luiz nosso “guru”, e aos companheiros que ainda se encontram Pedro, Luiza e a Ricieli. Aos colegas do LABFAR também a Tamara, Renata e Kelly que foram as que mais tive convívio.

Agradeço também ao pessoal do GBToxCe que nesta reta final do mestrado me acolheram de braços abertos e a professora Daiana por permitir que participasse ativamente do grupo.

A Flávia agradeço por seu carinho, companheirismo, e por compartilhar suas experiências e sentimentos.

Por fim agradeço a CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver nanocápsulas co-encapsuladas com Atorvastatina (ATV) e óleo de gengibre (NCA_tG) ou de semente de uva (NCA_tU). As formulações propostas demonstraram tamanho médio de partículas entre 200 e 300 nm. Apresentam parâmetros físico químicos adequados e com adequada dispersão quando avaliadas por técnicas de difratometria a laser (DL) e espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Uma metodologia analítica para determinação da ATV nas nanocápsulas foi adequadamente validada por HPLC mostrando-se precisa, exata, específica e robusta para quantificação da ATV. Verificamos que a eficiência de encapsulação da ATV foi de 97% para ambas formulações. Os perfis de liberação da ATV em meio de diálise foram sustentados até 82% ao final de 8h para NCA_tG e NCA_tU. Quanto à hemocompatibilidade, NCA_tG e NCA_tU foram adicionadas em amostras de sangue nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL. NCA_tG causou aumento significativo de hemoglobina livre na maior concentração e a NCA_tU nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Além disso, NCA_tU gerou maior liberação de LDH eritrocitária quando comparada a NCA_tG. Por outro lado, não houve alteração nos parâmetros da cascata da coagulação sanguínea tanto pela via extrínseca (TP) quanto pela via intrínseca (TTP). Não foram observadas alterações na integridade do DNA ou citotoxicidade em linhagens de células 3T3. Além disso, não se alteraram parâmetros de mortalidade, tamanho e área corporal ou tamanho da ninhada quando aplicadas sobre o modelo biológico experimental *C. elegans*. não demonstrando assim toxicidade. Por fim, as formulações demonstraram significativos efeitos sobre a redução dos níveis lipídicos de nematoides com dislipidemia. Este efeito não era dose dependente. Quando utilizada as concentrações de 50 e 100µg/mL NCA_tU não melhoram o efeito sobre a dislipidemia e podem gerar complicações quanto a biocompatibilidade.

ABSTRACT

This study aimed to develop nanocapsules co-encapsulated with Atorvastatin (ATV) and ginger oil (NCA_tG) or grape seed (NCA_tU). The proposed formulations showed an average particle size between 200 and 300 nm. They are stable and with adequate dispersion when evaluated by laser diffractometry (DL) and photon correlation spectroscopy (PCS) techniques. An analytical methodology for determining ATV in nanocapsules has been properly validated by HPLC. We found that the ATV encapsulation efficiency was 97% for both formulations. The release profiles of ATV in dialysis medium were sustained and 82% at the end of 8h for NCA_tG and NCA_tU. As for biological safety, NCA_tG and NCA_tU were added to blood samples at concentrations of 10, 50 and 100 µg / mL. NCA_tG caused a significant increase in free hemoglobin at the highest concentration and NCA_tU at concentrations of 50 and 100 µg / mL. In addition, NCA_tU generated greater erythrocyte LDH release when compared to NCA_tG. On the other hand, there was no change in the parameters of the blood coagulation cascade either by the extrinsic (TP) or by the intrinsic (TTP) route. No changes in DNA integrity or cytotoxicity were observed in 3T3 cell lines. In addition, mortality, size and body area or litter size parameters were not changed when applied to the *C. elegans* experimental biological model. Finally, the formulations demonstrated significant effects on the reduction of lipid levels of nematodes with dyslipidemia. This effect was not dose dependent. Higher doses of NCA_tU do not improve the effect on dyslipidemia and can lead to complications regarding biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica:

Fig 1 Estrutura química da atorvastatina.....17

Figura 2 Representação esquemática de nanopartículas do tipo nanocápsulas (NC) (Mancini *et al.*) e nanoesferas (NE). (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)20

Capítulo I

Fig. 1 Atorvastatin chemical structure.....27

Fig 2. Typical chromatogram obtained for ATV by utilizing the selected experimental conditions.....31

Fig 3. Chromatograms of formulations with ATV: NCA_tU and NCA_tG (A and C) and without ATV: NCU_v e NCG_e (B and D)31

Capítulo II:

Fig 1: Perfil de liberação das nanopartículas em relação a ATV livre. Tempo em horas (h).....58

Fig 2: A. Dosagem de hemoglobina frente ao tratamento com as partículas. B Dosagem de LDH eritrocitário frente ao tratamento com as nanopartículas. Onde $p < 0,05$ foi considerado “*”. Análise estatística por ANOVA de uma via com post-hoc de Tuckey.....59

Fig 3: A. Ensaio do tempo de protrombina medidos após a exposição as nanocápsulas. B. Ensaio referente ao tempo de tromboplastina parcial ativada na medidos após a exposição as nanocápsulas.....60

Fig 4: A. Avaliação da porcentagem de dano citotóxico em célula da linhagem 3 T3. B. Teste cometa realizado para avaliação do dano ao DNA em célula da linhagem 3 T3. Análise estatística por ANOVA de uma via com post-hoc de Tuckey, * indicam diferença em relação ao grupo controle com dano, onde $****p < 0,0001$61

Fig 5: A. Taxa de sobrevivência dos vermes em relação ao controle tratados com as nanocápsulas. B. Taxa de sobrevivência dos vermes em relação ao controle tratado com nanoesferas de PCL. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via com post-hoc de Tuckey onde $p < 0,05$ “*”62

Fig 6: A. Tamanho dos vermes em relação ao controle. B. Área dos vermes em relação ao controle. Análises estatísticas realizadas por ANOVA de uma via com post-hoc de Tuckey.....63

Fig 7: Número de larvas da ninhada nas concentrações 10 (A), 20 (B) e 30 (7.C) $\mu\text{g/mL}$63

Fig.8 Dosagens de TAG em *C. elegans* em relação ao grupo sem indução de colesterol (CSC). Análises estatísticas realizadas por ANOVA de uma via com post-hoc de Tuckey.....65

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica:

Tabela 1. Características Físico-químicas da atorvastatina (fonte PUBCHEN®).....18

Capítulo I:

Table 1. Experimental proportions of mobile phase for better quantification of ATV..30

Table 2: Results concerning methodology linearity by the ANOVA analysis for ATV in NCA_TG and NCA_TU.....31

Table 3: Content values for NCA_TG and NCA_TU, expressed as % and RSD, representing repeatability and intermediate precision.....32

Table 4: Percentage (%) content values and RSD for atorvastatin quantification in polymeric nanocapsules, at the three evaluated concentrations, representing the method accuracy.....32

Table 5: ATV content and their respective RSD values obtained by the chromatographic condition variation in the nanocapsules systems.....33

Capítulo II

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das formulações de nanocápsulas.....47

Tabela 2. Parâmetros relacionadas ao tamanho médio de partículas, dispersibilidade e carga superficial para as formulações de nanocápsulas.....56

Tabela 3. Dados do Teor das Formulações e Taxa de Encapsulação.....57

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

µL: microlitros

ATV: Atorvastatina

AVC: Acidente Vascular Cerebral

CSC: Controle sem colesterol

CT: Controle Tratamento

ECA: Inibidores da Enzima conversora de Angiotensina

ERO: Espécie reativa de Oxigênio

g: grama

GC: Guanilil ciclase solúvel

HB: Hemoglobina

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

LDH: Lactado desidrogenase

mg: Miligrama

NC: Nanocápsulas

NCA_tG: Nanocápsula com Atorvastatina e óleo de Gengibre

NCA_tU: Nanocápsula com Atorvastatina e óleo de Semente de Uva

NCG_e: Nanocápsula com óleo de Gengibre

NCU_v: Nanocápsula com óleo de semente de Uva

NE: Nanoesferas

NGM: Meio de crescimento para nematoides

NOS: Oxido Nítrico Sintase

NPs: Nanopartículas

PCL: poli-epsilon caprolactona

TAG: triacilglicerol

TP: Tempo de Protrombina

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>Dislipidemias</i>	16
3.2 Terapêutica	16
3.2 Estatinas.....	17
3.3 Atorvastatina	18
3.4 Plantas medicinais como terapia complementar em patologias cardiovasculares	19
3.5 Nanotecnologia: Sistema de nanopartículas poliméricas	20
3.6 Aplicações da nanotecnologia em terapias de combate ao colesterol	22
3.7 Biocompatibilidade de nanopartículas em meios biológicos.....	23
3.8 Testes toxicológicos em cultura celular	23
3.9 Modelo alternativo para ensaios biológicos utilizando o <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
Capítulo I.....	Error! Bookmark not defined.
5. Capítulo II.....	Error! Bookmark not defined.
6 DISCUSSÃO GERAL	25
7 CONCLUSÃO.....	27
8 REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão cada dia mais frequentes na vida da população mundial. Diversos são os fatores desencadeantes destas patologias, como o stress, alimentação incorreta, consumo do tabaco e o álcool. De acordo com pesquisas e dados epidemiológicos de diversos países, as doenças cardiovasculares são classificadas como capazes de gerar alta morbidade/mortalidade. É inevitável então que cada vez mais se faz necessário pensar em novos métodos terapêuticos para reduzir a incidência destas patologias (Gomez-Gerique *et al.*, 2003)(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015)

Os distúrbios endógenos relacionados com o aumento dos níveis de colesterol na corrente sanguínea estão na maioria das vezes associados ao surgimento das doenças cardiovasculares (Mozaffari, Namazi, Larijani, Bellissimo, & Azadbakht, 2019) Os fármacos da classe das estatinas como agentes para tratamentos dos distúrbios do colesterol tem sido pesquisados desde o final dos anos 70 e suas aplicações clínicas possuem resultados bastante útil (Kazi, Penko, & Bibbins-Domingo, 2017).

Entre os diferentes tipos de estatinas, a atorvastatina é um fármaco muito utilizado. Seu lançamento na década de noventa foi uma importante ferramenta terapêutica no combate a doenças cardiovasculares e dislipidemias. Essa eficácia se dá por causa de seu mecanismo de ação que impede os primeiros passos da biossíntese do colesterol. Desta forma, ocorre a inibição da enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase) em converter o substrato HMG-CoA em ácido mevalônico. Através disso, ocorrerá o impedindo da produção endógena de colesterol (Arrigoni *et al.*, 2017).

Entre a formas alternativas de tratamento dos distúrbios do colesterol, o uso de plantas medicinais a muito tempo tem sido uma prática bastante comum. Muitas vezes seu uso é impírico e associado à terapia medicamentosa como um complemento (Sedighi, Bahmani, Asgary, Beyranvand, & Rafieian-Kopaei, 2017). Além disso, o uso de óleos vegetais extraídos e purificados como terapia auxiliar tem sido marcadamente mais presentes na terapêutica por melhorarem a capacidade de controlar os níveis séricos de colesterol (Akinyemi, Oboh, Ademiluyi, Boligon, & Athayde, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Entre estes, o gengibre (*Zingiber officinale*) é utilizado no tratamento de dislipidemias e como hipoglicemiante á muito tempo. Da mesma forma, o óleo de

semente de uva (*Vitis vinífera*) também possui importantes efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes.

De acordo com as pesquisas, o óleo de semente de uva é rica em um componente conhecido como resveratrol. Este é uma substância que tem relatos de vários efeitos benéficos no tratamento de doenças cardiovasculares (Ma & Zhang, 2017).

Tendo como objetivo o aperfeiçoamento cada vez maior de sistemas terapêuticos para o tratamento dos distúrbios do colesterol, destaca-se a nanotecnologia. Esta vem sendo aplicada na área farmacêutica já alguns anos para melhorar a eficácia de diversos fármacos e formulações farmacêuticas (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010). Muitos destes possíveis benefícios associados a nanotecnologia estão ligados ao tamanho reduzido dessas formulações e sua capacidade de incorporar fármacos tanto lipossolúveis como hidrossolúveis (Gaumet, Vargas, Gurny, & Delie, 2008). Além disso, estudos mais recentes procuram desenvolver nanopartículas capazes de direcionar ativamente fármacos para os locais específicos no organismo e desta forma ampliar as possibilidades de sucesso terapêutico e diminuir possíveis efeitos adversos (Gholipourmalekabadi et al., 2017).

Apesar de toda a expectativa quanto as vantagens que a nanotecnologia pode trazer no aperfeiçoamento de métodos terapêuticos e diagnósticos de patologias, estudos recentes tem sido desenvolvido com o objetivo de avaliar a segurança na aplicação destes sistemas nanoparticulados (Bender et al., 2012; de la Harpe et al., 2019; Frohlich, 2017; Jesus et al., 2020). Desta forma, avaliações quanto a biocompatibilidade destes sistemas nanoparticulados desenvolvidos é um assunto a ser explorado. Entre os possíveis métodos para determinação destes parâmetros, se destacam técnicas que avaliam situações como a lesão na integridade da membrana de células ou de seu material genético e ensaios de hemocompatibilidade (Bender *et al.*, 2012, Le Roux, 2017). Além disso, a avaliação em modelos biológicos *in vivo* são um importante fator a se destacar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e determinar a biocompatibilidade e eficácia através de ensaios *in vitro* e *in vivo* de nanocápsulas poliméricas co-encapsuladas com atorvastatina e óleo de gengibre (NCA_tG) ou semente de uva (NCA_tU).

2.2 Objetivos específicos

- Preparar nanocápsulas poliméricas co-encapsuladas com atorvastatina e óleo de gengibre (*Zingiber officinale*) ou semente de uva (*Vitis vinifera* L.);
- Caracterizar as formulações NCA_tG e NCA_tU em termos de parâmetros físico-químicos como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, potencial Zeta, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulação;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* da atorvastatina a partir da NCA_tG e NCA_tU e compará-los à dissolução do fármaco livre;
- Validar metodologia analítica por CLAE para detecção do fármaco Atorvastatina livre e na forma de nanocápsulas;
- Realizar testes de hemocompatibilidade *in vitro* para NCA_tG e NCA_tU em amostras de sangue humano por meio da determinação dos parâmetros de coagulação sanguínea, dosagem de LDH eritrocitária e níveis de hemoglobina livre;
- Avaliar a possibilidade de efeitos genotóxicos da NCA_tG e NCA_tU em células da linhagem 3T3 por meio do ensaio cometa.
- Avaliar possíveis efeitos de toxicidade das nanocápsulas em modelo experimental *in vivo* do tipo *Ceanoharbithis elegans*, por meio de ensaios de sobrevivência, tamanho e área corporal e tamanho da ninhada (*Brood size*);
- Dosear níveis de triglicerídeos em *C.elegans* após tratamentos com os sistemas NCA_tG e NCA_tU.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Dislipidemias

Segundo a OMS estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em nível global. Desses óbitos, estima-se que 7,4 milhões ocorrem devido a complicações devido a dislipidemias. Além disso, a Sociedade Brasileira de Cardiologia estimou que 349.938 milhões de brasileiros morreram por alguma doença cardiovascular nos anos de 2004 a 2016. Estes números só tendem a aumentar devido aos riscos que a sociedade moderna se sujeita. Tais como: dietas ricas em gordura e produtos industrializados, sedentarismo e *stress* são fatores agravantes para o aumento destes valores assim como a falta de orientação quanto aos agravos da patologia e também o risco genético.

O diagnóstico precoce da hipertensão e outros distúrbios cardiovasculares é um importante fator para uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Apesar da hipertensão não ter cura definitiva e a terapia medicamentosa ser contínua, isso não significa que medidas preventivas não possam ser feitas para melhorar a qualidade de vida. Exercícios físicos, boa alimentação, evitar *stress* contínuo, são medidas complementares ao tratamento farmacológico.

É de conhecimento geral que a maioria dos pacientes que sofrem de qualquer distúrbio cardiovascular também não seguem recomendações indicadas na tentativa de evitar agravos. Levando em consideração estes fatores, a tentativa de descoberta de medicamentos cada vez mais eficazes e com menores efeitos adversos tem sido uma prioridade.

3.2 Terapêutica

As terapias usualmente utilizadas no tratamento de patologias como a hipertensão engloba fármacos que de alguma forma diminuem a pressão arterial diretamente ou indiretamente. Alguns exemplos de classes farmacológicas são os diuréticos como a Hidroclorotiazida e Furozemida. Estes atuam na excreção de íons e líquidos via renal diminuindo assim indiretamente a pressão arterial. Geralmente a terapêutica usual para tratamento da hipertensão engloba estes tipos de fármacos associados a outros, como por exemplo os Inibidores da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) ou ainda beta bloqueadores.

Os inibidores da ECA atuam diminuindo a produção endógena de angiotensina II, fazendo assim com que a mesma não cause seus efeitos no organismo, como

vasoconstrição e aumento de liberação de noraepinefrina. Por sua vez, os beta bloqueadores atuam diretamente nos receptores beta-adrenérgicos do epitélio cardíaco. São exemplos desta classe o Atenolol e Propanolol (Rang *et al.*, 2011).

As estatinas tem seu efeito não diretamente na diminuição da pressão arterial. Mas, neste caso o foco principal de ação é no tratamento de dislipidemias. Estas acabam levando a distúrbios cardiovasculares devido à formação de ateromas, trombos e embolias. Estes fatores aumentam bastante o risco de acidentes vasculares como: isquemia e infartos (AVCs) ou relacionados ao miocárdio (IAM) (Berger, Raman, Vishwanathan, Jacques, & Johnson, 2015).

3.3 Estatinas

O avanço da vida moderna tem muitas vezes influenciado negativamente na capacidade das pessoas de manter hábitos de vida saudável. Isso, cada vez mais torna estes indivíduos sujeitos a sofrerem de doenças cardiovasculares, como é o caso dos distúrbios do colesterol (Melkani & Panda, 2017). A classe dos fármacos estatinas são amplamente utilizadas para o tratamento de hipertensão arterial e dislipidemias (Briasoulis, Agarwal, Valachis, & Messerli, 2013).

Seus mecanismos de ação se dá por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase) em converter o substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, diminuindo assim a produção hepática de colesterol (Arrigoni *et al.*, 2017). As estatinas também podem reduzir a produção de triglicerídeos (Paoletti, Fahmy, Mahla, Mizan, & Southworth, 2001).

A primeira estatina a ser desenvolvida foi a mevastatina durante a década de 70, e depois de seu lançamento e sucesso terapêutico, outros fármacos da classe foram desenvolvidos, tais como: sinvastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina e rosuvastatina. Levando em consideração seu grande sucesso comercial e uso relativamente seguro, essa classe de fármacos tem sido cada vez mais utilizada por pessoas do mundo todo.

Porém, as estatinas não estão livres da ocorrência de efeitos adversos. Os principais problemas são dores musculares,(Joy & Hegele, 2009) e aumento do risco de diabetes *mellitus* (Rahal, ElMallah, Poushaju, & Itani, 2016) e (Mancini *et al.*, 2013). Apesar destes efeitos adversos começarem a surgir a longo prazo (Arrigoni *et al.*, 2017)

as estatinas são medicamentos de uso crônico e desta forma acabam invariavelmente gerando tais efeitos.

Outro problema comum das estatinas está relacionado às suas características físico-químicas. De acordo com estudos, baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade são problemas frequentes nesta classe. Formas farmacêuticas modificadas envolvendo as estatinas tem sido uma das vias pelas quais tem se tentado maior otimização do efeito farmacológico (Ahmadi, Madrakian, & Ghavami, 2018; Lorenzoni *et al.*, 2019)

3.4 Atorvastatina

A atorvastatina (Fig.1) é um fármaco muito utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares tais como aterosclerose (Ferreira & Marques da Silva, 2016). Seu uso mostra-se bastante efetivo e sua aceitação pelo público geral é bem tolerada (Gomez-Gerique *et al.*, 2003). Porém, assim como outras estatinas, têm efeitos adversos importantes a longo prazo principalmente os caso de mialgias (Joy and Hegele 2009) e problemas gastrointestinais.

Apesar de não estar livres de eventos adversos, a atorvastatina foi um sucesso de vendas desde o seu lançamento na década de 90 pela Pfizer®, através do nome comercial Lipitor®. De modo geral, a atorvastatina é vendida na forma de comprimidos revestidos nas concentrações de 10mg, 20mg, 40mg e 80mg. Suas características físico-químicas (Tabela 1) são relevantes quando se pretende fazer o preparo de novas formulações ou em experimentações que levem em conta os parâmetros físico-químicos do fármaco, como: solubilidade, pH, Pka, Coeficiente de partição (LogP) e peso molecular. Entre as possíveis experimentações, destaca-se ensaios de liberação, dissolução e doseamento do fármaco

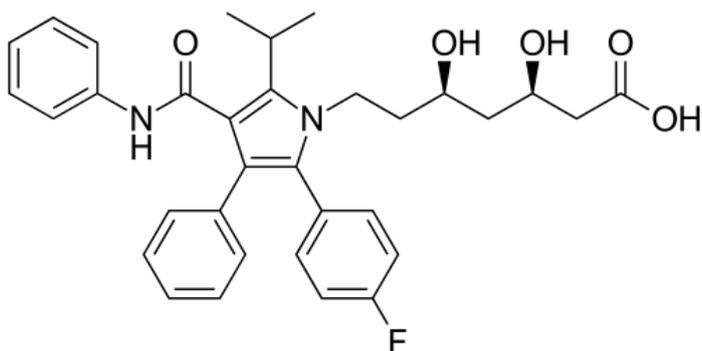


Fig 1 Estrutura química da atorvastatina.

Tabela 1. Características Físico-químicas da atorvastatina (fonte PUBCHEN®)

Parâmetro	Valor
Peso Molecular	558.65 g/mol
Formula Molecular	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅
pH	+/-4,5
Pka	4,3
Log P	5.7
Ponto de Fusão	159,2-160,7 °C
Solubilidade Aquosa	Em água, 20,4 µg / mL (pH 2,1), 1,23 mg / mL (pH 6,0)
Absorbância	245nm

3.5 Plantas medicinais como terapia complementar em patologias cardiovasculares

Não é recente o uso de plantas medicinais para o tratamento de patologias crônicas .(Friedman, Yaniv, Dafni, & Palewitch, 1986).Normalmente seu uso se dá pela transmissão de conhecimento empírico. Levando em conta este fator, estudos de farmacognosia e identificação de compostos vegetais são amplamente realizados para diversas terapêuticas inclusive aquelas relacionadas a distúrbios cardiovasculares (Seck *et al.*, 2017).

O uso de plantas como terapia alternativa e/ou complementar a medicamentosa é muito frequente. Este uso se dá pela crença popular de que produtos de origem natural apresentam menos efeitos adversos do que os sintéticos. Além da facilidade maior de obter produtos naturais.

O uso sinérgico de fármacos e produtos naturais pode ser uma importante ferramenta para o tratamento de diversas patologias. Obter um efeito sinérgico ao tratamento medicamentoso é excelente, já que melhora a eficácia do tratamento (Cui *et al.*, 2018).

O gengibre (*Zingiber officinale*) é utilizado no tratamento de dislipidemias e como hipoglicemiante devido principalmente à presença de agentes antioxidantes e compostos fenólicos. De acordo com estudos, isso se dá principalmente pela ação da inibição da

enzima arginase e desta forma resultando na diminuição de ácido nítrico (NO) com consequente melhora na circulação vascular (Akinyemi *et al.*, 2016).

Outra planta bastante utilizada a nível mundial para tratar diversos tipos de patologia é a uva (*Vitis vinífera*). De acordo com alguns estudos a semente da uva contém maior quantidade do antioxidante resveratrol. Este é uma substância que tem vários estudos relatando seus efeitos benéficos em doenças cardiovasculares (Ma & Zhang, 2017). O efeito terapêutico do resveratrol ocorre por distintos mecanismos de ação: atua como quelante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ferro, além de aumento da expressão de importantes proteínas envolvidas na via do NO, especificamente a eNOS e a guanilil ciclase solúvel (sGC) (Albertoni & Schor, 2015).

3.6 Nanotecnologia: Sistema de nanopartículas poliméricas

Em aspectos gerais, nanopartículas poliméricas são definidas como partículas coloidais sólidas, que incluem tanto nanocápsulas como nanoesferas (Fig. 2). Possuem um tamanho máximo de 1000nm. Mas, de modo geral o tamanho médio relatado para estas partículas poliméricas em diversos estudos com aplicações biológicas tem sido entre 100 a 500nm (Quintanar-Guerrero, Allemann, Doelker, & Fessi, 1998). Segundo alguns autores, os sistemas nanoparticulados podem ser usados como sistemas de liberações de substancias ou como vetores em diversas terapias (Cruz *et al.*, 2006; Elhesaisy & Swidan, 2020; Nankali, Shaabanzadeh, & Torbati, 2020). E dependendo da composição dos mesmos essa vetorização é ainda mais otimizada (ANTONOW, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2010). As nanoesferas são assim chamadas quando a substancia encapsulada está retida ou adsorvida em uma matriz polimérica sem a presença de nucleo lipídico. Já as nanocápsulas apresentam um núcleo oleoso que está envolto por uma matriz polimérica podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo ou adsorvido a parede da matriz (Schaffazick, Pohlmann, Dalla-Costa, & Guterres, 2003)

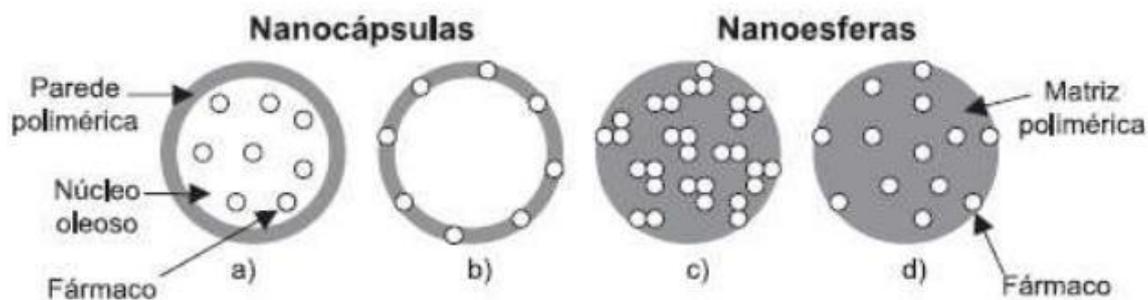


Figura 2 Representação esquemática de nanopartículas do tipo nanocápsulas (NC) (Mancini *et al.*) e nanoesferas (NE). (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas destacam-se em relação às nanoesferas devido ao fato de possuírem elevada capacidade de encapsular substâncias lipofílicas. Mas, tanto NC quanto NE tendem a proporcionar um aumento do índice terapêutico, e conseqüentemente, reduzir a toxicidade do fármaco (Guterres, Alves, & Pohlmann, 2007). É inegável as diversas vantagens do uso da nanotecnologia na área farmacêutica, devido principalmente ao grande poder de modulação de doses e vetorização que essa tecnologia apresenta.

Assim sendo estes sistemas nanoparticulados podem ser infinitamente otimizados e modelados de acordo com à necessidade do fármaco encapsulado ou a terapia empregada (Mora-Huertas *et al.*, 2010), Pode-se fazer modificações em seu tamanho (Gaumet *et al.*, 2008), carga superficial, e também fazer a vetorização passiva ou ativa da formulação para que os efeitos adversos sejam diminuídos e a eficácia terapêutica otimizada (Gholipourmalekabadi *et al.*, 2017).

Com o passar dos anos a nanotecnologia voltada para a área farmacêutica tem evoluído de forma significativa e é provável que em um futuro próximo essa tecnologia seja amplamente aprimorada e transferida para a produção industrial. Um dos principais empecilhos ainda é a restrição de se fazer o escalonamento entre a pesquisa e a produção e utilização clínica (*scale-up*). Isso tem muito a haver também com as dificuldades na metodologia de fabricação e no custo de produção. Porém já apresentam-se no mercado formulações contendo nanotecnologia, como: Myocet® e DaunoXome® (fármacos utilizados no tratamento de câncer) que reduziram significativamente a toxidez cardíaca da droga; Anfotericina B (medicamento para tratamento de micoses e leishmaniose visceral), que reduziram sensivelmente sua toxidez renal.

3.6 Aplicações da nanotecnologia em terapias de combate ao colesterol

O uso da nanotecnologia aplicada na terapia cardiovascular e no tratamento das dislipidemias não é algo recente (Lee, Cho, Lee, Jeong, & Yuk, 2003). Estudos demonstram que a nanoencapsulação das estatinas tem grande impacto terapêutico, principalmente no quesito de controle de liberação do fármaco descrito por Lee Cho *et al.* (2003), onde a liberação do fármaco lovastatina encapsulado demonstrou-se mais eficaz que em comparação com o fármaco livre.

Outro exemplo promissor envolvendo estatinas foi descrito por (Suresh, Manjunath, Venkateswarlu, & Satyanarayana, 2007) onde o fármaco lovastatina foi utilizado como ativo e se avaliou a biodisponibilidade deste quando encapsulado em relação a uma suspensão padrão de referência. Neste estudo a nanopartícula demonstrou maior biodisponibilidade que a suspensão referência.

Estudos com a atorvastatina também foram realizados por (Kumar *et al.*, 2017), onde foi avaliado a biodisponibilidade da nanopartículas, segurança e eficácia. Além disso, (Rohilla, Garg, Bariwal, Goyal, & Rath, 2016) utilizaram nanopartículas de atorvastatina e um complexo de quitosana/ácido glicirretínico modificada para a vetorização da nanopartícula ao fígado, e também para avaliar a diminuição da hepatotoxicidade da mesma.

Um estudo realizado por (Eftekhari, Karkhaneh, & Alizadeh, 2017) avaliou a aplicação intravenosa de partículas de atorvastatina contendo o polímero poliuretano, em diferentes concentrações do fármaco e duas diferentes metodologias de fabricação das nanopartículas: emulsão-difusão e emulsão espontânea. Com isso foi avaliado a liberação *in vitro* das formulações e feito um estudo comparativo para avaliar qual dos métodos era mais eficaz ou se havia diferença na liberação. No final do estudo o método de emulsão-difusão mostrou-se mais adequado.

Em um recente estudo realizado por (Dudhipala & Veerabrahma, 2017), foi avaliado a melhora na farmacocinética e farmacodinâmica da rosuvastatina com o encapsulamento do fármaco em nanopartículas de lipídio sólido. As nanopartículas tiveram tamanho e PDI médio aproximado de $67.21 \pm 1.71 \text{ nm}$ e 0.25 ± 0.01 , respectivamente. Já o seu potencial zeta era de $-28.93 \pm 0.84 \text{ mV}$, demonstrando assim valores adequados para prosseguir com os estudos de *in vivo*, além de apresentarem uma eficiência de encapsulamento de $93.51 \pm 0.34\%$. Por fim, em seu estudo com modelos de ratos com hipercolesterolemia, foi relatado que as nanopartículas conseguiram diminuir os níveis lipídicos por até 36 horas e a suspensão livre apenas por 24 horas.

Em outro estudo realizado por (Padhye & Nagarsenker, 2013) nanopartículas de lipídio sólido contendo sinvastatina foram preparadas e avaliadas quanto a absorção oral *in vivo* em comparação com o fármaco livre. Neste estudo foi relatado que as nanopartículas apresentaram tamanhos médios abaixo de 200 nm. Ainda, sua morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica onde as partículas tem formado esférico em sua maioria. Além disso, a eficiência de encapsulação foi de 96% e a calorimetria demonstrou a formação de nanocristais.

3.7 Biocompatibilidade de nanopartículas em meios biológicos.

Ainda são raros os estudos avaliando a real biocompatibilidade dos sistemas nanoparticulados e seus diferentes ativos vinculados. Na maioria das vezes, os estudos focam no desenvolvimento da estrutura e suas características físico-químicas. Outras vezes, aplicam as nanoestruturações em ensaios biológicos sem antes fazer uma avaliação mais aprofundada da real compatibilidade no meio. Uma das possíveis razões para a aplicação direta do sistema desenvolvido já em sistemas biológicos tem sido justificada pelos autores por estarem utilizando materiais conhecidamente biocompatíveis na estruturação das nanopartículas.

Porém, estudos que avaliem segurança de nanopartículas em meios biológicos devem sempre ser levados em conta. Isso se torna ainda mais evidente quando o objetivo é a utilização por uma via intravenosa (Bender et al., 2012; de la Harpe et al., 2019; Frohlich, 2017).

De modo geral os ensaios mais corriqueiramente empregados para avaliar biocompatibilidade são a incidência ou não de danos a diferentes linhagens celulares e eritrócitos. Testes demonstrando lesões as células, como por exemplo lesões ao DNA sempre são preocupantes, pois uma partícula tóxica não justifica seu efeito terapêutico inovador.

3.8 Testes toxicológicos em cultura celular

A avaliação da toxicidade de fármacos, compostos bioativos e excipientes de formulações é uma prática amplamente utilizada e rotineira na indústria farmacêutica e em centros de pesquisa (Arbo *et al.*, 2019; Giordani *et al.*, 2019). Apesar de serem testes *in vitro* os mesmos demonstram resultados interessantes para a continuidade de

experimentos mais refinados. Outra vantagem a ser destacada é a não necessidade de aprovação de comitês de ética, já que os mesmos se tratam de testes *in vitro*.

Outro ponto a se considerar é a redução de custos, pois, se algo se demonstrar tóxico *in vitro* não existe a necessidade de se dar continuidade a outros ensaios mais complexos.

Hoje em dia o avanço da bioengenharia e da engenharia genética nos proporciona uma gama muito ampla de tipos de células que podem ser utilizadas para testes de diversos tipos de patologias (Baratta *et al.*, 2019; Baust *et al.*, 2017). Com isso, alguns ensaios toxicológicos em células podem ser amplamente explorados como o teste cometa (Da Silva, 2007) e teste de viabilidade celular .

3.9 Modelo alternativo para ensaios biológicos utilizando o *Caenorhabditis elegans*

O nematoide *Caenorhabditis elegans* é amplamente utilizado nos dias atuais devido a suas características únicas que permitem a realização de diversos testes *in vivo* (Wood, 1988). Algumas destas características são: curto ciclo de vida e reprodutivo, baixo custo de manutenção, o mesmo ser transparente a luz, ter aproximadamente 60-80% de homologia genética com humanos e ainda diversas cepas transgênicas (Girard *et al.*, 2006). Pelo fato deste verme ser um organismo com rotas bioquímicas amplamente estudadas e as mesmas apresentarem homologia com as de nós humanos, diversos testes bioquímicos podem ser realizados utilizando o nematoide.

Testes toxicológicos também são amplamente realizados em *C. elegans* para avaliação da segurança de substâncias ativas ou de constituintes de formulações (Charao *et al.*, 2015; Velasques *et al.*, 2018). Por outro lado, experimentos utilizando o nematoide para avaliação de níveis de colesterol precisam de uma adaptação. Isso porque o verme não produz colesterol endogenamente (Rauthan & Pilon, 2015; Rauthan, Ranji, Pradenas, Pitot, & Pilon, 2013). Entretanto, isso não descarta a utilização do verme como modelo válido para tal. Pois, alternativas metabólicas envolvendo lipídeos são exploradas como a dos triglicerídeos produzidos neste caso de modo endógeno pelo nematoide.

6 DISCUSSÃO GERAL

As doenças cardiovasculares representam uma das principais patologias causadoras de morbidade/mortalidade ao redor do mundo. As origens destas patologias podem ser muito variadas, mas, a principal causa ainda tem sido os distúrbios do colesterol (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). As opções terapêuticas atuais para tratamento dos distúrbios lipídicos são variadas.

As estatinas são as principais classe de fármacos com este intuito. Desde seu surgimento na década de 70, novos fármacos vêm surgindo na tentativa de promoverem um efeito mais eficaz e com menores efeitos adversos.(Huang, Wang, Huang, & Huang, 2020) Porém, outras formas de tratamento das dislipidemias também têm sido associadas. Entre estas, podemos citar o desenvolvimento da nanotecnologia como um dos mais promissores. As nanocápsulas NCA_TG e NCA_TU para tratamento da aterosclerose representam um importante passo neste desenvolvimento.

Os métodos de obtenção por deposição interfacial do polímero pré-formado mostraram-se adequado ao objetivo de formar a NCA_TG e NCA_TU. Seus tamanhos médio de partículas foram entre 200 e 300 nm. A polidispersão bastante estreita e potencial de carga favorável a uma boa estabilidade dos sistemas.

Com o intuito de quantificar a ATV presente nas formulações foi previamente validado uma metodologia analítica em HPLC seguindo os critérios estabelecidos pelo ICH. O método analítico proposto demonstrou ser adequado, uma vez que, foi sensível, específico e robusto para a determinação de ATV.

A partir disso verificamos que o teor médio de ATV nas formulações era de 90%, sendo que a porcentagem de encapsulação deste ativo esteve em média a 97%, sendo este resultado considerado bastante satisfatório para os objetivos seguintes propostos no estudo.

As formulações NCA_TG e NCA_TU demonstraram perfis de liberação bastante semelhantes. Demonstraram uma liberação mais rápida da ATV dentro de 30 min e posteriormente controlaram a liberação durante às 8h propostas.

Em uma segunda etapa do estudo, realizou-se experimentos a fim de determinar critérios que pudessem comprovar a biossegurança das formulações. Para isso,

realizou-se testes em sangue humano, cultura de células de fibroblastos de camundongo 3T3 e também no modelo biológico experimental *C. elegans*.

A partir dos ensaios *in vitro* utilizando amostras de sangue humano, verificamos que NCA_TG e NCA_TU possuem uma hemocompatibilidade relacionada principalmente com a dosagem aplicada no sangue. Os ensaios de hemólise evidenciaram que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL as duas formulações começam a gerar incidência de hemólise mais significativa. Isso ficou ainda mais evidente na NCA_TU. Estes resultados foram reafirmados quando da dosagem da enzima LDH eritrocitária. O aumento plasmático da LDH em uma amostra já coletada de sangue pode indicar desestruturação da membrana dos eritrócitos (Bender *et al.*, 2012).

Na avaliação da cascata da coagulação sanguínea observamos que não ocorreram interações significativas com as proteínas plasmáticas a ponto de afetar a formação do coágulo sanguíneo tanto pelas vias intrínsecas (TTP) ou extrínsecas (TP) da coagulação.

Em relação aos ensaios de genotoxicidade, através do ensaio cometa observamos que as formulações não ocasionaram alterações na integridade do DNA. Também não houve citotoxicidade em linhagens de cultura de células 3T3.

Outro ponto positivo sobre as formulações NCA_TG e NCA_TU é o fato delas não alteraram parâmetros de mortalidade, tamanho e área corporal ou tamanho da ninhada quando aplicadas sobre um modelo biológico experimental do tipo *C. elegans*.

Além dos experimentos a cerca da avaliação das formulações propostas sobre a biocompatibilidade em diferentes meios biológicos, como sangue, cultura de células e o modelo biológico experimental *C. elegans*. Queríamos também avaliar se NCA_TG e NCA_TU poderiam de modo satisfatório diminuir os níveis de lipídeos no modelo *C. elegans* após indução de dislipidemia.

Os resultados obtidos neste caso demonstram que as formulações propostas diminuiriam significativamente os níveis lipídico dos nematoides com dislipidemia nas concentrações testadas para NCA_TG e NCA_TU. Este efeito não é maior significativamente pelo aumento da dose. Neste caso, a NCA_TU poderia gerar ainda outras complicações relacionadas a biocompatibilidade.

Acreditamos que o potencial destas formulações contendo ATV são grandes e podem realmente aperfeiçoar a terapêutica das dislipidemias. Porém, durante o desenvolvimento destes novos sistemas terapêuticos se deve sempre levar em consideração a biossegurança da própria constituição da formulação. Muitos compostos

possuem um comportamento bastante diferente quando estão em escala nanométrica e isso de maneira alguma deve ser desconsiderado.

A segurança biológica é peça chave no sucesso da terapêutica. Compostos promissores mas que muitas vezes estão relacionados a diversos efeitos adversos ou até mesmo de toxicidade podem ser incorporados em novos transportadores e terem sua aplicação bastante aperfeiçoada. Acreditamos que com a ATV isso não foi diferente. A associação dela com óleos vegetais ainda carece de mais esclarecimentos, principalmente sobre o papel dos óleos vegetais incorporados e seus efeitos coadjuvantes em processos anti-inflamatórios e antioxidantes relacionados ao desenvolvimento e progressão das placas de aterosclerose.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho foi realizado com intuito de desenvolver nanopartículas co-encapsuladas com atorvastatina e óleos de gengibre ou semente de uva capazes de reduzir níveis lipídeos e ainda demonstrarem segurança biológica. Ao final do estudo observamos formulações estáveis, com teores adequados e seguras para uso em meios fisiológicos e organismos vivos.. Acreditamos que futuramente estes resultados podem habilitar esta formulações a testes em organismos mais complexos. A aterosclerose por ser um evento fisiopatológico amplo, necessita de várias medidas para um efetivo tratamento. A associação de uma agente capaz de diminuir níveis de colesterol, como a ATV, e diferentes óleos vegetais com ações antioxidantes e anti-inflamatórias em um sistema nanotecnológico nos permite acreditar em um tratamento mais eficaz contra a aterosclerose e suas consequências fisiopatológicas ao organismo.

8 REFERÊNCIAS

- Ahmadi, M., Madrakian, T., & Ghavami, S. (2018). Preparation and Characterization of Simvastatin Nanocapsules: Encapsulation of Hydrophobic Drugs in Calcium Alginate. *Methods Mol Biol*. doi: 10.1007/7651_2018_191
- Akinyemi, A. J., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2016). Effect of Two Ginger Varieties on Arginase Activity in Hypercholesterolemic Rats. *J Acupunct Meridian Stud*, 9(2), 80-87. doi: 10.1016/j.jams.2015.03.003
- Albertoni, G., & Schor, N. (2015). Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease--mini-review. *J Bras Nefrol*, 37(1), 106-114. doi: 10.5935/0101-2800.20150015
- Arbo, M. D., Altknecht, L. F., Cattani, S., Braga, W. V., Peruzzi, C. P., Cestonaro, L. V., . . . Garcia, S. C. (2019). In vitro cardiotoxicity evaluation of graphene oxide. *Mutat Res*, 841, 8-13. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.03.004
- Arrigoni, E., Del Re, M., Fidilio, L., Fogli, S., Danesi, R., & Di Paolo, A. (2017). Pharmacogenetic Foundations of Therapeutic Efficacy and Adverse Events of Statins. *Int J Mol Sci*, 18(1). doi: 10.3390/ijms18010104
- Baratta, V., Own, J., Di Renzo, C., Olloard, J., Geibel, J. P., & Barahona, M. (2019). In Pursuit of the Parietal Cell - An Evolution of Scientific Methodology and Techniques. *Front Physiol*, 10, 1497. doi: 10.3389/fphys.2019.01497
- Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., . . . Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 53(8), 669-672. doi: 10.1007/s11626-017-0177-7
- Bender, E. A., Adorne, M. D., Colome, L. M., Abdalla, D. S. P., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2012). Hemocompatibility of poly(varepsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int J Pharm*, 426(1-2), 271-279. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.051
- Berger, S., Raman, G., Vishwanathan, R., Jacques, P. F., & Johnson, E. J. (2015). Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 102(2), 276-294. doi: 10.3945/ajcn.114.100305
- Briasoulis, A., Agarwal, V., Valachis, A., & Messerli, F. H. (2013). Antihypertensive effects of statins: a meta-analysis of prospective controlled studies. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 15(5), 310-320. doi: 10.1111/jch.12081
- Charao, M. F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jornada, D. S., Fagundez, D., . . . Pohlmann, A. R. (2015). *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *International journal of nanomedicine*, 10, 5093.
- Cruz, L., Soares, L. U., Costa, T. D., Mezzalira, G., da Silveira, N. P., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm*, 313(1-2), 198-205. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.035
- Cui, C., Shi, A., Bai, S., Yan, P., Li, Q., & Bi, K. (2018). Novel Antihypertensive Prodrug from Grape Seed Proanthocyanidin Extract via Acid-Mediated Depolymerization in the Presence of Captopril: Synthesis, Process Optimization, and Metabolism in Rats. *J Agric Food Chem*, 66(14), 3700-3707. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00373

- Da Silva, J. (2007). O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. *Genética na escola*, 2, 30-37.
- de la Harpe, K. M., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., Marimuthu, T., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2019). The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell-Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*, 8(10). doi: 10.3390/cells8101209
- Dudhipala, N., & Veerabrahma, K. (2017). Improved anti-hyperlipidemic activity of Rosuvastatin Calcium via lipid nanoparticles: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Eur J Pharm Biopharm*, 110, 47-57. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.10.022
- Eftekhari, B. S., Karkhaneh, A., & Alizadeh, A. (2017). Physically Targeted Intravenous Polyurethane Nanoparticles for Controlled Release of Atorvastatin Calcium. *Iran Biomed J*.
- Elhesaisy, N., & Swidan, S. (2020). Trazodone Loaded Lipid Core Poly (epsilon-caprolactone) Nanocapsules: Development, Characterization and in Vivo Antidepressant Effect Evaluation. *Sci Rep*, 10(1), 1964. doi: 10.1038/s41598-020-58803-z
- Ferreira, A. M., & Marques da Silva, P. (2016). Defining the Place of Ezetimibe/Atorvastatin in the Management of Hyperlipidemia. *Am J Cardiovasc Drugs*. doi: 10.1007/s40256-016-0205-0
- Friedman, J., Yaniv, Z., Dafni, A., & Palewitch, D. (1986). A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev desert, Israel. *J Ethnopharmacol*, 16(2-3), 275-287.
- Frohlich, E. (2017). Hemocompatibility of inhaled environmental nanoparticles: Potential use of in vitro testing. *J Hazard Mater*, 336, 158-167. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.04.041
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 69(1), 1-9. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.001
- Gholipourmalekabadi, M., Mobaraki, M., Ghaffari, M., Zarebkohan, A., Omrani, V. F., Urbanska, A. M., & Seifalian, A. (2017). Targeted drug delivery based on gold nanoparticle derivatives. *Curr Pharm Des*. doi: 10.2174/1381612823666170419105413
- Giordani, C. F., Campanharo, S., Wingert, N. R., Bueno, L. M., Manoel, J. W., Costa, B., . . . Garcia, C. V. (2019). In vitro toxic evaluation of two gliptins and their main impurities of synthesis. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 20(1), 1-9.
- Girard, L. R., Fiedler, T. J., Harris, T. W., Carvalho, F., Antoshechkin, I., Han, M., . . . Chalfie, M. (2006). WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D472-D475.
- Gomez-Gerique, J. A., Alvarez-Sala, L. A., Armada, B., Fernandez-Arias, I., Martinez, J., Hernandez, G., & Group, C. S. (2003). A six-month, multicenter, open-label, noncomparative, prospective, observational study of the efficacy and tolerability of atorvastatin in the primary care setting (estudio del control de las hiperlipidemias en atención primaria): the cheap study. *Curr Ther Res Clin Exp*, 64(6), 338-354. doi: 10.1016/S0011-393X(03)00090-0
- Guterres, S. S., Alves, M. P., & Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, 2, 147-157.

- Huang, J., Wang, D., Huang, L. H., & Huang, H. (2020). Roles of Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Disease: A New Paradigm for Drug Discovery. *Int J Mol Sci*, *21*(3). doi: 10.3390/ijms21030739
- Jesus, S., Marques, A. P., Duarte, A., Soares, E., Costa, J. P., Colaco, M., . . . Borges, O. (2020). Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol*, *8*, 100. doi: 10.3389/fbioe.2020.00100
- Joy, T. R., & Hegele, R. A. (2009). Narrative review: statin-related myopathy. *Ann Intern Med*, *150*(12), 858-868. doi: 10.7326/0003-4819-150-12-200906160-00009
- Kazi, D. S., Penko, J. M., & Bibbins-Domingo, K. (2017). Statins for Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Review of Evidence and Recommendations for Clinical Practice. *Med Clin North Am*, *101*(4), 689-699. doi: 10.1016/j.mcna.2017.03.001
- Kumar, N., Chaurasia, S., Patel, R. R., Khan, G., Kumar, V., & Mishra, B. (2017). Atorvastatin calcium encapsulated eudragit nanoparticles with enhanced oral bioavailability, safety and efficacy profile. *Pharm Dev Technol*, *22*(2), 156-167. doi: 10.3109/10837450.2015.1108983
- Lee, K. E., Cho, S. H., Lee, H. B., Jeong, S. Y., & Yuk, S. H. (2003). Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug. *J Microencapsul*, *20*(4), 489-496. doi: 10.1080/0265204031000093032
- Lorenzoni, R., Cordenonsi, L. M., Davies, S., Antonow, M. B., Medina Diedrich, A. S., Santos, C. G., . . . Raffin, R. P. (2019). Lipid-core nanocapsules are an alternative to the pulmonary delivery and to increase the stability of statins. *J Microencapsul*, *36*(4), 317-326. doi: 10.1080/02652048.2019.1624849
- Ma, Z. F., & Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants (Basel)*, *6*(3). doi: 10.3390/antiox6030071
- Mancini, G. B., Tashakkor, A. Y., Baker, S., Bergeron, J., Fitchett, D., Frohlich, J., . . . Pope, J. (2013). Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian Working Group Consensus update. *Can J Cardiol*, *29*(12), 1553-1568. doi: 10.1016/j.cjca.2013.09.023
- Melkani, G. C., & Panda, S. (2017). Time restricted feeding for prevention and treatment of cardiometabolic disorders. *J Physiol*. doi: 10.1113/JP273094
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, *385*(1-2), 113-142. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
- Mozaffari, H., Namazi, N., Larijani, B., Bellissimo, N., & Azadbakht, L. (2019). Association of dietary acid load with cardiovascular risk factors and the prevalence of metabolic syndrome in Iranian women: A cross-sectional study. *Nutrition*, *67-68*, 110570. doi: 10.1016/j.nut.2019.110570
- Nankali, E., Shaabanzadeh, M., & Torbati, M. B. (2020). Fluorescent tamoxifen-encapsulated nanocapsules functionalized with folic acid for enhanced drug delivery toward breast cancer cell line MCF-7 and cancer cell imaging. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. doi: 10.1007/s00210-020-01825-1
- Padhye, S. G., & Nagarsenker, M. S. (2013). Simvastatin Solid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery: Formulation Development and In vivo Evaluation. *Indian J Pharm Sci*, *75*(5), 591-598.
- Paoletti, R., Fahmy, M., Mahla, G., Mizan, J., & Southworth, H. (2001). Rosuvastatin demonstrates greater reduction of low-density lipoprotein cholesterol compared with pravastatin and simvastatin in hypercholesterolaemic patients: a randomized,

- double-blind study. *J Cardiovasc Risk*, 8(6), 383-390. doi: 10.1177/174182670100800608
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res*, 15(7), 1056-1062. doi: 10.1023/a:1011934328471
- Rahal, A. J., ElMallah, A. I., Poushaju, R. J., & Itani, R. (2016). Do statins really cause diabetes? A meta-analysis of major randomized controlled clinical trials. *Saudi Med J*, 37(10), 1051-1060. doi: 10.15537/smj.2016.10.16078
- Rauthan, M., & Pilon, M. (2015). *A chemical screen to identify inducers of the mitochondrial unfolded protein response in C. elegans*. Paper presented at the Worm.
- Rauthan, M., Ranji, P., Pradenas, N. A., Pitot, C., & Pilon, M. (2013). The mitochondrial unfolded protein response activator ATFS-1 protects cells from inhibition of the mevalonate pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5981-5986.
- Rohilla, R., Garg, T., Bariwal, J., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Development, optimization and characterization of glycyrrhetic acid-chitosan nanoparticles of atorvastatin for liver targeting. *Drug Deliv*, 23(7), 2290-2297. doi: 10.3109/10717544.2014.977460
- Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla-Costa, T., & Guterres, S. S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur J Pharm Biopharm*, 56(3), 501-505. doi: 10.1016/s0939-6411(03)00139-5
- Seck, S. M., Doupa, D., Dia, D. G., Diop, E. A., Ardiet, D. L., Nogueira, R. C., . . . Diouf, B. (2017). Clinical efficacy of African traditional medicines in hypertension: A randomized controlled trial with Combretum micranthum and Hibiscus sabdariffa. *J Hum Hypertens*, 32(1), 75-81. doi: 10.1038/s41371-017-0001-6
- Sedighi, M., Bahmani, M., Asgary, S., Beyranvand, F., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. *J Res Med Sci*, 22, 30. doi: 10.4103/1735-1995.202151
- Suresh, G., Manjunath, K., Venkateswarlu, V., & Satyanarayana, V. (2007). Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), 24. doi: 10.1208/pt0801024
- Velasques, K., Maciel, T. R., de Castro Dal Forno, A. H., Teixeira, F. E. G., da Fonseca, A. L., Varotti, F. P., . . . Haas, S. E. (2018). Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against Plasmodium falciparum and decreases their toxicity to Caenorhabditis elegans. *Eur J Pharm Sci*, 118, 1-12. doi: 10.1016/j.ejps.2018.03.014
- Wang, Y., Wei, X., Wang, F., Xu, J., Tang, X., & Li, N. (2018). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from ginger. *Int J Biol Macromol*, 111, 862-869. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.087
- Wood, W. B. (1988). *The Nematode Caenorhabditis Elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory.
- World Health Organization, „Cardiovascular diseases (CVDs),” 17 May 2017.