

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Maíra Nunes Pereira

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana para liberação
prolongada de cetoconazol na mucosa vaginal

Brasília
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana para liberação
prolongada de cetoconazol na mucosa vaginal

Orientanda: Maíra Nunes Pereira

Matrícula: 11/0016505

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Co-orientador: MSc. Breno Noronha Matos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de Brasília como requisito parcial
para obtenção de grau Farmacêutico

Brasília

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maíra Nunes Pereira

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana para liberação prolongada de cetoconazol na mucosa vaginal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.



Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar diversos momentos e oportunidades fantásticas e sempre estar à frente dos meus caminhos.

A toda minha família, por todo o carinho e incentivo a mim dados para continuar a seguir a minha formação. Em especial aos meus pais, Francisco e Maria Goretti, e minha irmã, Marianna, que me deram todos os ensinamentos para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus primos, Nathália e Gabriel, que sempre torceram por mim.

À minha querida vizinha, por todo amor e carinho.

Às minhas amigas, Giselly, Larissa, Louise e Rayane, que estiveram presente todos esses anos durante a minha graduação. Muito obrigada por cada palavra, pelos incentivos, puxões de orelha, risadas, festinhas e por sempre estarem ao meu lado para me ajudar. Vocês foram uma parte muito importante de tudo isso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, por ter confiado na minha capacidade de realização desse trabalho, por sempre ser atencioso e prestativo, e por me proporcionar valiosas oportunidades durante todo esse tempo.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), por todo o aprendizado em conjunto e por sempre serem solícitos em me ajudar.

Ao Breno, que esteve comigo durante toda essa jornada me dando todo o suporte necessário, me incentivando e por todos os seus ensinamentos.

À minha amiga Pâmela, por sempre estar comigo nos momentos que eu mais precisava, me dando atenção necessária.

Às minhas amigas Karol e Natane, por toda amizade e companheirismo.

À Márcia, por toda a sua generosidade e apoio quando eu mais precisava.

A todos os professores da Universidade de Brasília, que estiveram comigo durante todo esse tempo por sua dedicação e todo o conhecimento.

Ao CNPq pelas bolsas concedidas.

A todos aqueles que eu não mencionei aqui, mas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica da vulva e da vagina, causada por várias espécies de *Candida* spp.; sendo que entre 80% e 90% dos casos reportados de CVV são causadas pela espécie *Candida albicans*. Levando-se em consideração que a terapia tópica traz inúmeras vantagens para o tratamento se comparado com à terapia oral, como redução de custos, de toxicidade e de efeitos adversos, e que os produtos tópicos existentes não favorecem a permanência de agentes antifúngicos no local por tempo suficiente para que eles atuem, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica baseada em nanopartículas de quitosana (NP-QS) contendo o cetoconazol (CET), na tentativa de melhorar o tratamento tópico de CVV. Um método analítico para a determinação de CET extraído de mucosa utilizando cromatografia líquida de alta eficiência foi inicialmente padronizado e validado, seguindo as orientações de agências reguladoras nacional e internacional. As NP-CET foram preparados seguindo-se a técnica de geleificação ionotrópica e foram caracterizadas avaliando-se seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta. As NP-CET apresentaram diâmetro de $351,5 \pm 32,88$, $IPD = 0,493 \pm 0,060$ e potencial zeta positivo ($+ 34,6 \pm 3,9$). A eficiência de encapsulação do fármaco (EE%) foi então calculada como sendo $77,8 \pm 6,1$ quando uma relação polímero/fármaco igual a 5:1 (p/p) foi usada no preparo. No que se refere à morfologia, as NP-CET apresentaram-se esféricas com distribuição de tamanho monodispersa. A capacidade mucoadesiva mostrada pelas NP-CET frente as dispersões de mucina deve garantir a permanência delas em contato com a mucosa vaginal por longos períodos após a aplicação. Os estudos *in vitro* de liberação do CET a partir das NP-CET em membranas de acetato de celulose mostraram que o sistema é capaz de controlar a liberação do fármaco durante pelo menos 12 h. A atividade antifúngica da formulação contendo NP-CET foi avaliada *in vitro* em comparação com a formulação de fármaco livre e NP-QS. Após 24 h de incubação das cepas de *Candida albicans* com as formulações, observou-se que as NP-CET apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM₉₀) de $0,58 \mu\text{g/mL}$, valor superior ao do fármaco livre ($0,07 \mu\text{g/mL}$), mas condizente com o fato de as NP-QS sustentarem a liberação do CET por mais de 24 h. Finalmente, estudos de permeação *ex vivo* realizados em células de difusão verticais montadas com mucosa de suínos revelaram que as NP-CET foram capazes de promover a retenção de $8,4 \pm 2,2 \mu\text{g/cm}^2$ do fármaco na mucosa após 2 horas de experimento. Tendo por base que $0,58 \mu\text{g/mL}$ de CET é capaz de eliminar 90% da carga fúngica, a quantidade de CET que penetrou a mucosa deve ser mais que suficiente para controlar o crescimento fúngico no local. Segue-se, portanto, que as NP-CET devem apresentar-se como uma alternativa promissora para o tratamento tópico de CVV.

Palavras-Chave: Candidíase vulvovaginal, Cetoconazol, Nanopartículas, Quitosana.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection of the vulva and vagina, caused by various species of Candida spp.; in which between 80% and 90% of VVC reported cases are caused by the species Candida albicans. Taking into consideration that the topical therapy brings numerous advantages to the treatment, with regards to reduction of cost, toxicity and adverse effects, and that existing topical products do not favor the persistence of antifungal agents in place long enough so that they perform its action, this study aimed to develop and characterize a topical formulation based on chitosan nanoparticles (CS-NP) entrapping ketoconazole (KET) in an attempt to improve the topical treatment of VVC. An analytical method for determination of KET extracted from mucosa using high-performance liquid chromatography was initially standardized and validated following guidelines of national and international regulatory agencies. KET-NP were prepared following the ionotropic gelation technique, and were characterized by assessing their hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential. KET-NP developed showed diameter of $351,5 \pm 32,88$, $PDI = 0,493 \pm 0,060$ and positive zeta potential ($+34,6 \pm 3,9$). The drug entrapment efficiency (%EE) was then calculated to be 77.78 ± 6.09 when a polymer/drug ratio of 5:1 (w/w) was used. Regarding morphology, all nanoparticles presented spherical shape and their size distribution appeared to be monodisperse. The mucoadhesive capacity shown by KET-NP in front of mucin dispersions should ensure the permanence of these in contact to the vaginal mucosa for extended periods after application. In vitro release studies of KET from KET-NP using cellulose acetate membranes showed that the system is capable of controlling the release of the drug for at least 12 h. The antifungal activity of the formulation containing KET-NP was evaluated in vitro compared to the free drug formulation and the CS-NP. After 24 h of Candida albicans strain incubation with the formulations, it was observed that the KET-NP had minimum inhibitory concentration (MIC_{90}) $0.58 \mu\text{g/mL}$, value higher than the free drug ($0.07 \mu\text{g/mL}$) but consistent with the fact that the KET-NP sustain KET release over 24 h. Finally, ex vivo permeation experiments performed in vertical diffusion cells mounted with porcine mucosa revealed that the KET-NP were able to retain $8.4 \pm 2.2 \mu\text{g/cm}^2$ of the drug in the mucosa after 2 hours of experiment. Taking into account the MIC_{90} value found for the drug, the amount of KET that penetrates the mucosa should be sufficient to control fungal growth on site. It follows; therefore, that the KET-NP developed with the chitosan polymer must be presented as a viable alternative for the topical treatment of VVC.

Keywords: *Vulvovaginal candidiasis, Ketoconazole, Nanoparticles, Chitosan.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da anatomia da vagina	4
Figura 2. Representação das três principais morfologias celulares da <i>C. albicans</i> : levedura, pseudo-hifas e hifas	6
Figura 3. Estrutura química do Cetoconazol. Peso molecular: 531,43 g/mol	9
Figura 4. Estrutura química da quitosana	10
Figura 5. Formação do complexo de quitosana-TPP	11
Figura 6. Representação do processo das fases de contato e consolidação da mucoadesão	12
Figura 7. Representação do processo de extração do CET da mucosa suína com 5 mL de metanol	20
Figura 8. Representação simplificada da técnica de geleificação ionotrópica	21
Figura 9. Representação da célula de difusão de Franz para o experimento <i>in vitro</i> de liberação	24
Figura 10. Tubo de ensaio contendo a cultura de <i>Candida albicans</i>	27
Figura 11. Esquema simplificado das diluições seriadas em placa de 96 poços para cultura de fungos	29
Figura 12. Células de difusão tipo Franz montadas com a mucosa suína separando os compartimentos doadores dos receptores	29

- Figura 13.** Cromatograma referente à injeção de uma solução de CET a 100 µg/mL em metanol. Vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de amostras igual a 20 µL e detecção em 205 nm 31
- Figura 14.** Cromatogramas referentes à injeção de (A) metanol, (B) solução de água Milli-Q:metanol (80:20), (C) solução quitosana (0,55µg/mL) + CET e (D) homogeneizado de mucosa após 3 horas de agitação magnética em metanol, para análise da seletividade do método analítico. Fase móvel: metanol/água Milli-Q (75:25, v/v), vazão 1,0 mL/min e detecção no UV em 205 nm 32
- Figura 15.** Representação da curva analítica obtida para o CET por análise em CLAE. Equação da reta: $y = 87870x + 22980$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,99922$ 33
- Figura 16.** Representação da opalescência na formação de nanopartículas: A) Solução de quitosana antes da adição do TPP e B) Nanopartículas formada após a adição do TPP..... 36
- Figura 17.** Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 25000 vezes B) e C) 30000 vezes, para as NP-CET 39
- Figura 18.** Representação gráfica do tamanho hidrodinâmico das NP-CET, NP-MCN e NP-CET + NP-MCN 41
- Figura 19.** Perfil de liberação do CET a partir da formulação contendo NP-CET, pH 4,5 41
- Figura 20.** Reação enzimática simplificada do MTT na formação de formazan pelas oxidoredutases 43
- Figura 21.** Quantidade de CET recuperado da mucosa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir da solução de CET e das NP-CET 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação de duas proporções de quitosana/cetoconazol para a obtenção da melhor EE%	21
Tabela 2. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético	25
Tabela 3. Análise dos valores obtidos para precisão e da exatidão do método de quantificação para o CET	34
Tabela 4. Valores de porcentagem obtidos para a recuperação do CET em metanol	35
Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial zeta das nanopartículas de quitosana contendo ou não CET encapsulado	37
Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico, IPD, potencial zeta e EE% das nanopartículas de quitosana contendo CET preparadas com diferentes proporções fármaco/polímero.....	38
Tabela 7. Valores dos fluxos de liberação do CET das NP-CET e seus coeficientes lineares obtidos	42
Tabela 8. Valores calculados de CIM ₉₀ para a solução de CET, NP-CET e NP-QS controle (sem o fármaco) frente a fungos da espécie <i>Candida albicans</i>	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CET	Cetoconazol
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	Coefficiente de variação
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
EE%	Eficiência de encapsulação
IPD	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCN	Mucina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NP	Nanopartículas
NP-CET	Nanopartículas de quitosana contendo o cetoconazol
NP-MCN	Nanopartículas de mucina
NP-QS	Nanopartículas de quitosana
QS	Quitosana
R	Coefficiente de correlação linear
TPP	Tripolifosfato
UV/VIS	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. Histologia, anatomia e fisiologia da vagina	4
3.2. Candidíase vulvovaginal	5
3.3. Tratamentos para a candidíase	7
3.4. Polímero quitosana	9
3.5. Mucoadesão	11
3.6. Sistema polimérico nanoestruturado	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Material	15
4.2. Mucosa	15
4.3. Padronização do método analítico	16
4.3.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CET	16
4.3.2. Condições cromatográficas para quantificação do CET por CLAE	16
4.4. Validação do método analítico para quantificação do CET	17
4.5. Obtenção das nanopartículas de quitosana	20
4.6. Caracterização das nanopartículas	22
4.6.1. Diâmetro, índice de polidispersividade e potencial zeta	22
4.6.2. Eficiência de encapsulação	22
4.6.3. Morfologia das nanopartículas	22
4.7. Avaliação da mucoadesividade das NP-CET	23
4.7.1. Desenvolvimento de NP de mucina (MCN)	23
4.7.2. Mucoadesividade das NP-CET frente às NP-MCN	23
4.8. Estudos <i>in vitro</i> de liberação do CET a partir das formulações desenvolvidas	24
4.9. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica das formulações frente à espécie <i>Candida albicans</i>	25
4.9.1. Higienização do material e medidas de segurança	26
4.9.2. Preparo do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	26
4.9.3. Preparo das soluções e meios de cultura	26
4.9.4. Cultivo das cepas de <i>Candida albicans</i>	27

4.10. Estudos <i>ex vivo</i> de permeação de CET através da mucosa de suínos	29
4.11. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Validação do método analítico para quantificação de CET por CLAE	31
5.1.1. Especificidade/Seletividade	31
5.1.2. Linearidade	33
5.1.3. Precisão e Exatidão	34
5.1.4. LD e LQ	34
5.1.5. Recuperação do CET da mucosa	35
5.2. Obtenção e caracterização das nanopartículas de quitosana contendo CET.....	35
5.2.1. Diâmetro de partícula e Potencial Zeta	35
5.2.2. Eficiência de Encapsulação	38
5.2.3. Morfologia das Nanopartículas	39
5.3. Avaliação da mucoadesidade das NP-CET frente às NP-MCN	40
5.4. Estudo de Liberação <i>in vitro</i> do CET a partir das NP-CET	41
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica das formulações frente à espécie <i>Candida albicans</i>	42
5.6. Estudo <i>ex vivo</i> de permeação do CET a partir das NP-CET	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica da vulva e da vagina, causada pelas várias espécies de *Candida* spp. Estes fungos comensais das mucosas vaginal e digestiva podem tornar-se patogênicos sob determinadas condições e, com isso, alterar o ambiente vaginal (FIDEL, 2002). Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de CVV em sua vida. Dessas, de 40% a 50% vivenciarão novos surtos ao longo de sua vida e 5% atingirão o caráter recorrente (CAVALCANTE et al., 2005; MARDH et al., 2002).

Atualmente há uma variedade de tratamentos para a CVV, que incluem o uso de antifúngicos orais ou tópicos (GONZÁLEZ et al., 2011). Notadamente, a via de administração tópica é mais vantajosa que a oral, principalmente, no que diz respeito a custo e redução de efeitos adversos e tóxicos. Uma desvantagem dessa via, no entanto, é representada pelos mecanismos fisiológicos de remoção, que são ativos no lúmen da vagina e são responsáveis por um tempo de residência de formulações convencionais escasso no local de ação/absorção, provocando uma distribuição irregular do fármaco para a mucosa (CARAMELLA et al., 2015). Várias alternativas vêm sendo estudadas para aperfeiçoar tratamentos através da via tópica vaginal, proporcionando uma liberação controlada de fármacos e hormônios nessa mucosa (BAUM et al., 2012; NAKAYAMA et al., 2009), tais como comprimidos antifúngicos mucoadesivos (HOMBACH et al., 2009; KARASULU et al., 2004), géis vaginais (CARAMELLA et al., 2015) e óvulos para liberação vaginal de agentes antifúngicos e hormônios (DELLENBACH et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2009).

Nanopartículas preparadas com quitosana (NP-QS) vêm sendo utilizadas como carreadores de fármacos pois demonstram ser estáveis, capazes de melhorar a estabilidade do fármaco encapsulado, são de fácil preparo, biodegradáveis, biocompatíveis e podem

resultar em um sistema de liberação prolongado. A quitosana (QS) tem chamado atenção de pesquisadores por seu potencial bioadesivo pois apresenta propriedades mucoadesivas e assim ela pode dar origem a partículas também mucoadesivas, ou seja, que após aplicação tópica permaneçam por mais tempo no local de ação (GELFUSO et al., 2011; KONG et al., 2010; NAGPAL et al., 2010).

Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica baseada em NP-QS contendo o fármaco antifúngico cetoconazol (CET), na tentativa de melhorar o tratamento tópico de CVV. Isto porque as NP-QS após serem aplicadas na mucosa vaginal deverão permanecer aderidas a ela por mais tempo que formulações tópicas convencionais, liberando o CET gradualmente no ambiente vaginal. Além de melhorar a biodisponibilidade tópica do medicamento, também é levantada a hipótese de que esta interação entre as nanopartículas de quitosana contendo o cetoconazol (NP-CET) e a mucosa reduziria o número de aplicação de doses do medicamento e aumentaria a comodidade deste tipo de tratamento para a paciente.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica baseada em nanopartículas de quitosana carreando o CET (NP-CET), e avaliar seu potencial mucoadesivo, sua capacidade de controlar a liberação do fármaco para a mucosa e a sua atividade no controle de crescimento de cepas de *Candida albicans*, na tentativa de melhorar o tratamento tópico de CVV.

2.1. Objetivos específicos

- Padronizar e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para doseamento do CET extraído da mucosa suína;
- Obter NP-QS encapsulando o CET;
- Caracterizar as NP-CET com relação ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IPD), potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação (EE%);
- Avaliar as propriedades mucoadesivas das NP-CET;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do CET nanoencapsulado;
- Avaliar a atividade antifúngica das formulações contendo CET frente as cepas de *Candida albicans*;
- Determinar a penetração *ex vivo* do CET nanoencapsulado na mucosa de suínos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Histologia, anatomia e fisiologia da vagina

A vagina é um tubo fibromuscular colapsado (7 - 10 cm) que se estende a partir do exterior do corpo para o útero. A morfologia do tecido vaginal varia no que diz respeito à região anatômica (Figura 1). Basicamente, o ectocérvix e a vagina são constituídos por um epitélio escamoso estratificado em camadas múltiplas, sendo que quatro camadas de células distintas são observadas no epitélio vaginal: basal, parabasal, intermediária e uma superficial (MALLIPEDDI e ROHAN, 2010; THOMPSON et al., 2001).

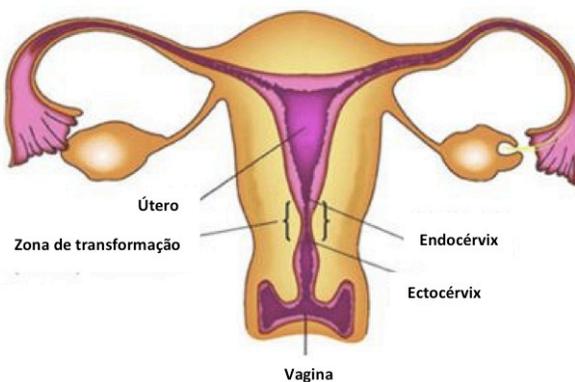


Figura 1. Representação da anatomia da vagina (Adaptado de <http://www.thinprep.com.au/info/cervical-cancer-hpv/what-you-should-know.cfm>).

Dentre as diversas secreções produzidas na vagina está o muco cervical. Os principais constituintes desse muco são glicoproteínas, lipídios, água e eletrólitos. A principal função do muco cervical é mediar as interações entre as células epiteliais do seu ambiente por meio de processos tais como: a lubrificação, a manutenção do equilíbrio de água e partículas de ligação, bactérias e vírus, além de desempenhar um papel na resposta imune. A composição, o volume e as propriedades reológicas de fluidos vaginais são afetados pela idade, a fase do ciclo menstrual e a excitação sexual, influenciando assim o

desempenho de um sistema de liberação de fármaco administrado à vagina (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005; VANIĆ e ŠKALKO-BASNET, 2013).

O lúmen vaginal é local de várias patologias, a maioria delas vaginites causadas por bactérias, fungos, protozoários ou vírus. Nesse lúmen, portanto, tem sido tradicionalmente administrados vários fármacos antimicrobianos e antivirais (CARAMELLA et al., 2015). A vagina é vantajosa como um local de distribuição do fármaco devido à sua grande área superficial e alta permeabilidade a muitos princípios ativos (DA SILVA et al., 2014).

3.2. Candidíase vulvovaginal

O gênero *Candida* inclui cerca de 300 espécies heterogêneas, com diferentes características morfológicas e funcionais, e atualmente é encontrado como parte da microbiota normal da pele, trato digestivo e das mucosas, incluindo o trato genito-urinário humano (FORNARI et al., 2016). A *Candida albicans* é a espécie fúngica mais comun presente na microbiota vaginal e as suas interações com células epiteliais vaginais atenuam a resposta imune do corpo a sua presença. Deficiências no reconhecimento de células epiteliais de porções da parede celular da *Candida* ou na elaboração da resposta imune inata pode causar uma hiperatividade ou, em contrapartida, uma resposta imunitária ineficaz para a presença desses organismos (POWELL e NYIRJESY, 2014).

O processo de colonização tem sido relacionado a *Candida* spp. pela sua aderência às células epiteliais, enquanto os fatores de virulência tais como a formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica (*switching*), variabilidade genotípica, capacidade de produzir enzimas proteolíticas, toxinas e fosfolipase e variabilidade antigênica, explicam a sua patogenicidade clínica. Portanto, o delicado balanço entre o hospedeiro e esse fungo comensal pode-se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases (ÁLVAREZ et al., 2007; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA

et al., 2015).

Segundo da Silva et al. (2014), estima-se que 80 a 90% dos casos de candidíase sejam causadas por *Candida albicans* e que aproximadamente 10% a 20% são devidos a outras espécies (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitaniae*).

C. albicans é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastocónidios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos (figura 2) (ÁLVAREZ et al., 2007).

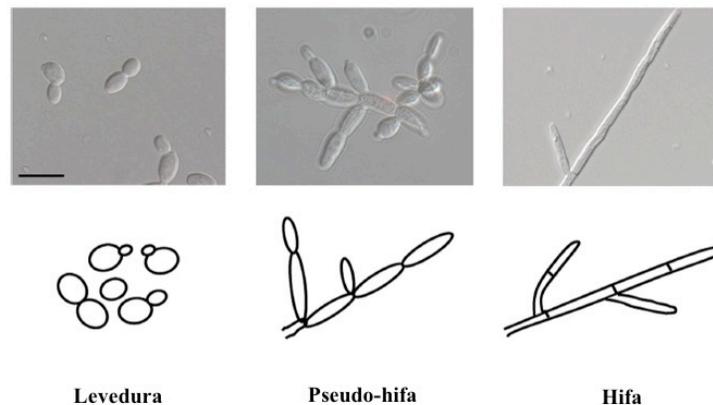


Figura 2. Representação das três principais morfologias celulares da *C. albicans*: levedura, pseudo-hifas e hifas (adaptado de Thompson et al., 2001).

A CVV é uma doença comum em mulheres (ELFEKY et al., 2015) e caracteriza-se pela inflamação da vulva e da vagina, normalmente secundária a condições fisiológicas alteradas que determinam uma imunidade local diminuída (GOMEZ-MOYANO et al., 2013). Setenta e cinco por cento das mulheres em idade reprodutiva terá pelo menos um episódio de CVV em sua vida, e 40% a 45% terão dois ou mais episódios (MASHBURN, 2006).

CVV é dividida em casos simples e complexos. Casos descomplicados são episódios esporádicos de infecções moderadas causadas por *C. albicans*, casos complicados são os casos de CVV causadas por outras espécies de *Candida*, que são os casos de infecção grave como CVV durante a gravidez, ou CVV associada a outras condições médicas, como imunossupressão ou diabetes. Candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) também é uma forma de infecção complicada (DOVNIK et al., 2015) sendo uma condição clínica muito mais grave devido às recorrências de sintomas (quatro ou mais episódios por ano) e pela sua refratariedade ao tratamento bem sucedido (DE BERNARDIS et al., 2015).

Sinais e sintomas clínicos incluem prurido intenso, corrimento vaginal, uma vulva eritematosa e dispareunia (CASSONE, 2015). A coceira é considerada o sintoma mais importante quando CVV é comparado com vulvovaginites (VV) de outras etiologias (MARTINS et al., 2012). Propostas de fatores de risco relacionados ao hospedeiro incluem: a gravidez, reposição hormonal, diabetes mellitus não controlada, a imunossupressão, uso de antibióticos e glicocorticóides, e predisposições genéticas. Fatores de risco comportamentais para CVV incluem o uso de contraceptivos orais, dispositivo intra-uterino, uso de espermicidas e preservativos, e também alguns hábitos sexuais, de higiene e de vestuário (GONÇALVES et al., 2015).

3.3. Tratamentos para a candidíase

Para o tratamento de CVV têm sido empregados os agentes imidazólicos e triazólicos, entre eles fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e o CET, com destaque para o fluconazol e o CET de uso oral (NYIRJESY, 2008), além dos agentes poliênicos (FERRAZZA et al., 2005).

Os tratamentos realizados por via oral, apesar da comodidade de administração, por normalmente serem de dose única, possuem como desvantagem a presença de efeitos colaterais importantes, como problemas gastrointestinais e dores de cabeça. A terapia tópica evita a ocorrência desses efeitos colaterais sistêmicos uma vez que limita a exposição do organismo ao fármaco à área aplicada e permite que se administrem menores doses do fármaco, resultando em menor exposição do paciente a doses tóxicas da substância (GONZÁLEZ et al., 2011; SEKHAVAT et al., 2011).

Eventualmente, algumas drogas antifúngicas não são eficazes para algumas espécies de fungos, particularmente contra *C. albicans*. A falta de resposta terapêutica antifúngica pode estar relacionada com a resistência intrínseca das cepas ou adquirida durante o tratamento (DE ABREU et al., 2016).

A ocorrência disseminada de candidíase na mucosa e o desenvolvimento da resistência contra agentes antifúngicos têm despertado o interesse na compreensão dos componentes da interação hospedeiro-fungo na mucosa e podem resultar na otimização de estratégias preventivas e terapêuticas antifúngicas (DE BERNARDIS et al., 2015). No entanto, o desenvolvimento de formulações para aplicação por via vaginal apresenta algumas dificuldades. Uma dessas dificuldades é que a histologia e a fisiologia da vagina variam com a idade, ciclo menstrual e alterações hormonais; a outra dificuldade é que a vagina segrega fluidos endometriais. Tais dificuldades contribuem para a remoção fácil da formulação, o que conduz a períodos mais curtos entre as aplicações e, por conseguinte, a um baixo cumprimento com o tratamento (FRANK et al., 2014).

CET (Figura 3) (designação química: cis-1-etanoil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina) é um agente antifúngico derivado de imidazol desenvolvido para o tratamento de infecções micóticas humanas e desempenha um papel essencial na quimioterapia antifúngica. É uma base fraca

com dois pKaS: 6,51 e 2,94, de largo espectro antifúngico, que atua através da inibição da biossíntese de ergosterol na célula fúngica e na parede celular, bem como a absorção de precursores de DNA e RNA para o aumento da permeabilidade celular dos micetos, além de inibir e provocar danos. CET é classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica como um fármaco de classe II, ou seja, que apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade. Possui também alguma atividade antibacteriana e é utilizado para prevenir e tratar infecções fúngicas da pele. É útil para o tratamento de caspa e dermatite seborreica (DAS et al., 2014; SKIBA et al., 2000; YAN et al., 2013; WANG e TANG, 2008).

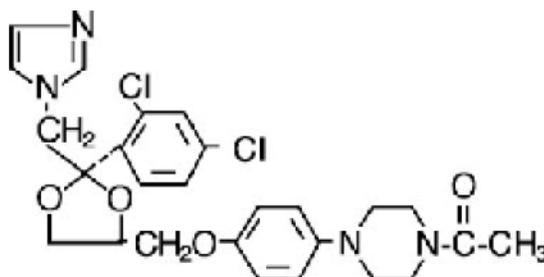


Figura 3. Estrutura química do Cetoconazol. Peso molecular: 531,43 g/mol (Fonte: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm362415.htm>).

Um dos desafios atuais é o desenvolvimento de um agente antifúngico que apresenta uma resistência reduzida ou nula para *Candida*, ou mesmo a criação de um sistema de liberação controlada capaz de aumentar a eficácia terapêutica de agentes antifúngicos por incorporação em nanoestruturas para administração do fármaco (DE ABREU et al., 2016).

3.4. Polímero quitosana

A quitosana (figura 4), que é obtida (dos crustáceos marinhos) através da

desacetilação da quitina, é um polissacarídeo que ocorre naturalmente e encontra-se muito disponível (FATHALLA et al., 2016). Excepcionalmente, a quitosana tem um grupo amino primário no resíduo glicosídico de repetição que confere uma carga positiva no polissacarídeo natural. Os grupos amino primários de quitosana são bastante ativos e podem fornecer sítios reativos para vários grupos, tornando assim a quitosana um polímero ideal para biofabricação (HU et al., 2013).

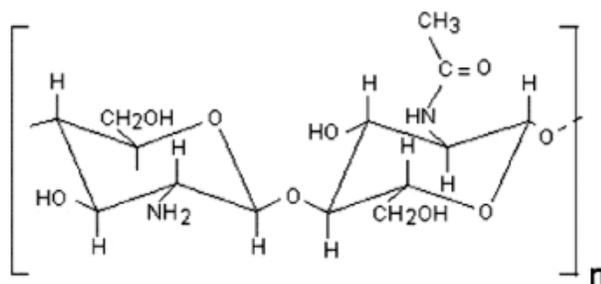


Figura 4. Estrutura química da quitosana (JANEGITZ et al., 2007).

A quitosana e seus derivados são biomateriais poliméricos úteis e tem sido encontrado em uma série de aplicações na liberação de fármacos. É não-tóxica, biodegradável, biocompatível e um polímero adequado para formulações de medicamentos mucoadesivos. A alta densidade de carga positiva confere suas propriedades mucoadesivas e torna-a atraente para a liberação de fármacos à mucosa. Além disso, a quitosana tem propriedades especiais, tais como a protonação dos seus grupos amino sob condições ácidas; que pode ser reticulada com outros polímeros, tais como tripolifosfato (TPP) (figura 5) e alginato de sódio para formar NP-QS (CHUAH et al., 2014; FATHALLA et al., 2016; YOUSEFPOUR et al., 2011). Provou ser um excipiente seguro em formulações medicamentosas nas últimas décadas, atraindo a atenção como um excelente polímero mucoadesivo no seu estado intumescido e que permite boa adesão em tecidos epiteliais e

nos tecidos de revestimento nas superfícies das mucosas (DASH et al., 2011).

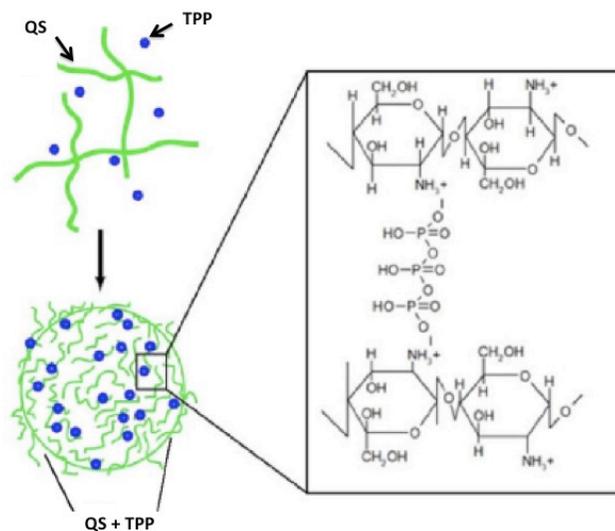


Figura 5. Formação do complexo de quitosana-TPP (adaptado de CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011).

Estudos comprovam que a quitosana possui propriedades antifúngicas (ING et al., 2012). Acredita-se que a interação entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da membrana celular dos microrganismos provoca o desprendimento de proteínas e outros constituintes intracelulares (SEVERINO et al., 2007). Dessa forma, podem agir de maneira sinérgica ao fármaco no combate à vaginite. Além disso, a utilização de um veículo bioadesivo, tal como a quitosana, pode prolongar o tempo de residência sobre a mucosa, que conduz à ação esperada, melhorando a aceitabilidade ao tratamento e aumento da penetração e absorção (FRANK et al., 2014).

3.5. Mucoadesão

O uso de mucoadesão como uma nova abordagem para melhorar a eficácia dos sistemas de distribuição de fármacos foi desenvolvido pela primeira vez no início de 1980 e têm sido, desde então, explorados sistemas de liberação de fármacos na via ocular, nasal,

vaginal e bucal (CHUAH et al., 2014). As formas farmacêuticas mucoadesivas oferecem contato prolongado no local da administração e também melhoram a adesão do paciente ao tratamento. A formulação mucoadesiva como um sistema de liberação do fármaco depende da seleção do polímero apropriado, com excelentes propriedades adesivas as mucosas e biocompatibilidade (SHAIKH et al., 2011). Exemplos típicos são os carbômeros, quitosana, alginato de sódio e os derivados de celulose (SMART, 2005).

Mucoadesão consiste em uma interação que envolve uma forma de dosagem farmacêutica e qualquer muco secretado ou uma membrana mucosa (BODDUPALLI et al., 2010). Os mecanismos de mucoadesão envolvem, primeiramente, um estágio de contato, no qual hidratação, molhamento e espalhamento são as etapas mais importantes e subsequentemente um estágio de consolidação, o qual envolve o fortalecimento da junção do tipo polímero-mucina, devido à interpenetração das cadeias poliméricas na camada de muco e a ocorrência da formação da ligação do polímero-mucina (principalmente forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas) (figura 6) (CARAMELLA et al., 2015).

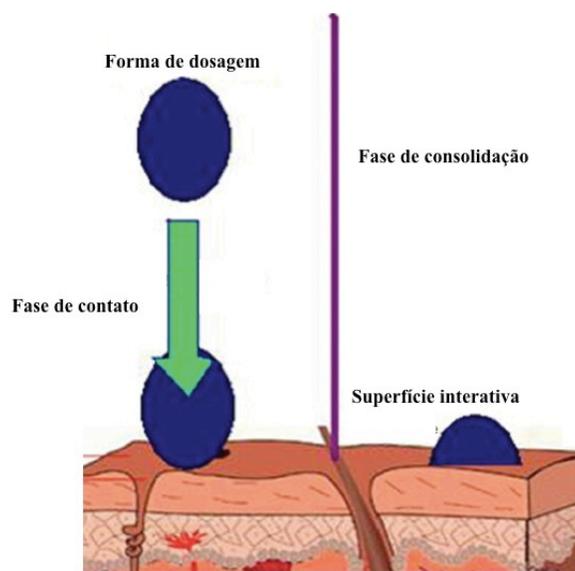


Figura 6. Representação do processo das fases de contato e consolidação da mucoadesão (adaptado de BODDUPALLI et al., 2010).

O uso potencial de sistemas mucoadesivos como transportadores de fármacos reside no prolongamento do tempo de residência no local de absorção, permitindo o contato intensificado com a barreira epitelial (CARVALHO et al., 2010).

3.6. Sistema polimérico nanoestruturado

A nanotecnologia é um campo de rápido crescimento com a sua vasta gama de aplicações em vários campos, como medicina, farmácia, engenharia e biotecnologia para a fabricação de novos materiais no nível de escala nanométrica (PARALIKAR, 2015).

As novas formulações para administração vaginal devem possuir algumas características; entre elas, boas propriedades mucoadesivas e alta resistência à remoção pelos mecanismos fisiológicos, de modo a permitir o contato íntimo e prolongado da formulação com a mucosa da paciente; propriedades de prolongamento de liberação do fármaco, a fim de reduzir a dosagem e também melhorar a adesão da paciente e por fim boas propriedades de penetração, visando permitir que o fármaco atinja as camadas da mucosa (SANDRI et al., 2004).

A fim de obter um novo sistema capaz de permear de forma eficiente as camadas mais superficiais da pele, formando um reservatório de fármaco com uma maior estabilidade, a utilização de nanopartículas poliméricas biodegradáveis surge como uma excelente alternativa para aumentar o efeito de medicamentos para o controle da candidíase, em particular para o tratamento de distúrbios ginecológicos. Os principais objetivos na concepção de nanopartículas como um sistema de liberação são para controlar o tamanho das partículas, as propriedades de superfície e a liberação de agentes farmacologicamente ativos, de forma que o fármaco alcance o sítio de ação específica com regime de taxa e dose terapêuticamente ótimos (FRANK et al., 2014; MOHANRAJ e

CHEN, 2006). Além disso, esse sistema controla rigidamente a liberação do fármaco para maximizar a eficiência terapêutica e minimizar o efeito colateral (KIM et al., 2009).

As NP são partículas coloidais sólidas, com diâmetros variando entre 1-1000 nm de diâmetro e são compostas de polímeros sintéticos, naturais ou semi-sintéticos que encapsulam a molécula do fármaco em que os agentes terapêuticos podem ser aprisionados, encapsulados ou quimicamente ligados à sua superfície. Elas são caracterizadas pela sua elevada estabilidade, capacidade de incorporar uma ampla gama de fármacos e a capacidade para modular a sua farmacocinética que permitem ainda a liberação prolongada, controlada ou direcionada do fármaco (NAGPAL et al., 2010; TIYABOONCHAI, 2003; VANÍĆ e ŠKALKO-BASNET, 2013).

Sistemas de liberação poliméricos nanoestruturados agem como compartimentos transportadores de substâncias ativas e apresentam vantagens que justificam sua aplicação, dentre elas, a boa estabilidade física, química e biológica, fácil preparo e boa reprodutibilidade, além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias visando melhorar suas propriedades químicas (SILVA et al., 2010).

Nanopartículas mucoadesivas são considerados como estruturas úteis para prolongar a retenção do fármaco e os efeitos terapêuticos no trato vaginal. Isto ocorre porque, quando os medicamentos são encapsulados em nanoestruturas, a sua liberação é controlada, são protegidos contra a degradação e a dose aplicada pode ser, eventualmente, reduzida. Além disso, deve considerar-se que alguns fármacos administrados por via vaginal podem causar efeitos secundários, tais como eritema, irritação, ulceração e dor; tais efeitos podem ser reduzidos usando a nanotecnologia (FRANK et al., 2014; WONG et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O CET (99% de pureza) utilizado foi gentilmente doado pela Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Campinas, Brasil). Ácido acético 99,9%, quitosana de baixo peso molecular, mucina suína do tipo III (MCN), tripolifosfato (TPP) e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Metanol grau HPLC foi obtido da Tedia Brazil Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). Correções de pH foram realizadas utilizando-se ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). Para preparação do tampão fosfato, pH 7,4, izotonizado foram utilizados fosfato de sódio monobásico e dibásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (NaCl) (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). A membrana hidrofílica de acetato de celulose utilizada nos experimentos de liberação (Dialysis Tubing MWCO 12000-14000, Fisherbrand) foi obtida da Fisher Scientific (Reino Unido). Os ensaios em cultura de fungos foram realizados utilizando-se os meios caldo de Sabouraud dextrose, Sabouraud dextrose agar (Neogen Corporation, Lansing, EUA), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 com L-glutamina e vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), glicerina P.A., cloreto de sódio e dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Todas as preparações e análises foram realizadas com água ultrapurificada tipo Milli-Q (Milli-Q Millipore Direct 8, Bedford, MA, USA).

4.2. Mucosa

Fragmentos da mucosa bucal de suínos foram retirados logo após o processo de abate dos animais no Frigorífico Bonasa localizado em São Sebastião - Distrito Federal, e transportados sob refrigeração umedecidos com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4. Esses pedaços foram limpos assim que chegaram ao laboratório com um auxílio de tesoura e bisturi, e mantidos hidratados até a realização dos experimentos, que ocorreu no mesmo dia do abate.

4.3. Padronização do método analítico

4.3.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CET

O comprimento de onda de absorção máxima para o CET foi determinado pela leitura em espectrofotômetro (entre 200 nm e 500 nm; Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800) de uma solução de CET a 100 µg/mL dissolvido em metanol. Para a leitura, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de máxima absorção no UV/Vis obtido da varredura foi selecionado para detecção do CET em CLAE.

4.3.2. Condições cromatográficas para quantificação do CET por CLAE

O CET foi dosado com o auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Para a fase estacionária utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão), que foi mantida à temperatura de 25°C em todas as análises. Como fase móvel, foi utilizada uma mistura de metanol/água Milli-Q (75:25, v/v), que correu a uma vazão de 1,0 mL/min.

O volume de injeção de amostras foi igual a 20 μL e a detecção no ultravioleta (UV) foi realizada no comprimento de onda de maior absorção do fármaco.

4.4. Validação do método analítico para quantificação do CET

A validação da metodologia foi realizada avaliando-se a especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), segundo legislação vigente (ANVISA, 2003), além do processo de extração do CET da mucosa suína. Para a validação, partiu-se de soluções estoque de CET preparadas com concentração igual a 100,0 $\mu\text{g/mL}$, em que pesou-se 10 mg do fármaco, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume do balão com o solvente metanol. A partir dessa solução estoque, foram feitas as outras diluição requeridas em metanol para a realização das análises que se seguem.

a) Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ARAGÃO et al., 2009). Desta forma, para atender aos objetivos do presente estudo, a validação foi feita considerando-se como interferentes do método o metanol, uma solução de água Milli-Q:metanol (80:20) (v/v), uma solução metanólica de mucosa após 3 horas de agitação magnética, e uma solução diluída e filtrada de quitosana + fármaco. Esses interferentes foram injetados no CLAE e os cromatogramas obtidos foram comparados a um cromatograma do CET diluído em metanol.

b) Linearidade

A partir de soluções estoque de CET a 100 µg/mL, foram realizadas seis diluições em metanol e essas diluições foram injetadas no CLAE para se verificar a linearidade do método. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração, que foram iguais a 2,0; 5,0; 7,5; 10; 15 e 20 µg/mL. As curvas analíticas foram construídas por meio da relação da concentração de CET com a área do pico obtido pelo CLAE.

As análises foram realizadas por meio de uma reta $y = ax + b$, em que a) representa o coeficiente angular e b) o coeficiente linear. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear (r), avaliando-o segundo o parâmetro mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

c) Precisão

A precisão foi avaliada conforme o estudo de repetitividade e precisão intermediária. A precisão intermediária e a repetitividade foram avaliadas considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos de três concentrações (2,0; 7,5; 20 µg/mL), que contemplaram o intervalo linear do método, em triplicata para cada concentração. Para a precisão intermediária os testes foram realizados em dois dias diferentes, com o mesmo analista e equipamento.

Os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV%), calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100 \quad \text{(Equação 1),}$$

onde: CV% é o coeficiente de variação, Desvio Padrão corresponde a estimativa do desvio padrão da média e Concentração Média são as médias das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

d) Exatidão

A exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais, aceitos como referência (CASSIANO et al., 2009). Para avaliação da exatidão do método foram utilizadas as seguintes concentrações: 2,0; 7,5; 20 µg/mL. Os resultados foram expressos em função da porcentagem do erro relativo, segundo a fórmula abaixo:

$$E\% = \frac{\text{Valor}_{\text{Obtido}} - \text{Valor}_{\text{Real}}}{\text{Valor}_{\text{Real}}} \times 100 \quad \text{(Equação 2),}$$

onde: E% corresponde à porcentagem de erro relativo; Valor_{obtido} corresponde à concentração obtida após a análise e Valor_{real} corresponde à concentração do padrão que deveria ser encontrada após a análise.

e) Limites de Detecção e Quantificação

O limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) consistem na menor concentração do analito a ser detectada e também quantificada com precisão pelo método analítico desenvolvido. Os limites foram calculados de acordo com as equações abaixo:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad \text{(Equação 3),}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{(Equação 4),}$$

onde: LD corresponde ao limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DP consiste no desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva de calibração.

f) Recuperação do fármaco

Primeiramente, pedaços de 1 cm² de mucosa foram cortados e colocados em recipientes de vidro. Diferentes volumes da solução estoque de CET (100, 250 e 750 µL,

respectivamente) contaminaram diferentes amostras de mucosa, em triplicata para cada concentração, e elas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 h até a total evaporação do solvente. Em seguida, foram adicionados 5 mL de metanol em cada recipiente, simulando um processo de extração, e os fragmentos de mucosa contaminados com CET foram mantidos em agitação magnética por 3 horas a 2000 rpm (Figura 7).



Figura 7. Representação do processo de extração do CET da mucosa suína com 5 mL de metanol.

Posteriormente, foram retirados 1 mL por meio de uma seringa acoplada a um filtro de porosidade de 0,45 μm e cada amostra foi quantificada em CLAE para cálculo da porcentagem recuperada de fármaco da mucosa como representado pela fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação\%} = \left(\frac{\text{Concentração}_{\text{obtida}}}{\text{Concentração}_{\text{real}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5}),$$

onde: “Concentração _{obtida}” se refere à concentração de CET analisada por CLAE e “Concentração _{real}” refere-se à concentração de CET que estaria presente no volume de metanol considerando-se toda a massa de fármaco que contaminou a amostra.

4.5. Obtenção das nanopartículas de quitosana

As NP-CET foram obtidas por meio da técnica de geleificação ionotrópica (Figura 8) proposta inicialmente por CALVO et al. (1997). A quitosana foi dissolvida em água Milli-Q previamente acidificada com 1% (v/v) de ácido acético, ficando sob agitação magnética *overnight*. Corrigiu-se então o pH para 4,5 com uma solução de NaOH 2 mol/L. Em 5 mL da solução de quitosana, adicionou-se diferentes proporções do fármaco (Tabela 1) mantendo-se o sistema sob agitação. Então, adicionou-se vagarosamente uma alíquota de 2 mL do agente reticulante TPP, preparado à concentração de 1,0 mg/mL, sobre a solução polimérica, sob agitação magnética constante (2000 rpm), para formação das NP-CET. A temperatura foi mantida a 30°C durante todo o preparo das partículas.

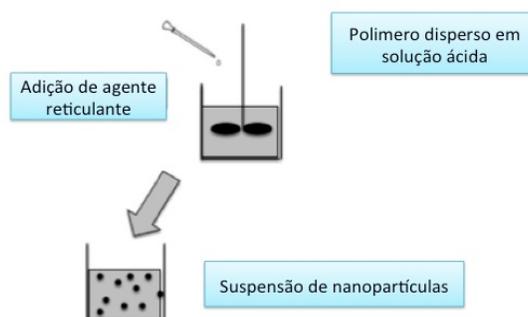


Figura 8. Representação simplificada da técnica de geleificação ionotrópica.

Nanopartículas de quitosana sem a presença do fármaco foram preparadas de maneira semelhante ao descrito anteriormente.

Tabela 1. Variação de duas proporções de quitosana/cetoconazol para a obtenção da melhor EE%.

Amostra	Quantidade de quitosana (mg)	Quantidade de CET (mg)	Proporção (Quitosana/CET)
NP1	17,5	17,5	1:1
NP2	75	15	5:1

4.6. Caracterização das nanopartículas

4.6.1. Diâmetro, índice de polidispersividade e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das NP-CET e NP-QS sem o fármaco, bem como seu índice de polidispersibilidade (IPD) foram analisados por espalhamento de luz dinâmica e o potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética pela análise de 1 mL das suspensões das partículas em um equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

4.6.2. Eficiência de encapsulação

A EE% foi determinada por método indireto avaliando-se a quantidade de CET não-associada às NP-CET. Amostras de 2 mL de suspensão de NP-CET foram centrifugadas (centrífuga CentriBio TDL80-2b) durante 45 min, a 3000 rpm. Após esse período, as NP-CET depositaram-se no fundo do tubo Falcon e o sobrenadante foi coletado, sendo filtrado em membrana de porosidade igual a 0,22 µm e quantificado em CLAE. A EE% foi calculada de acordo com a fórmula abaixo (SPÓSITO, 2008; TAGLIARI, 2012):

$$EE\% = \left(\frac{\text{Valor}_{\text{total}} - \text{Valor}_{\text{quantificado}}}{\text{Valor}_{\text{total}}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 6),}$$

onde: EE% representa a porcentagem de CET retido às NP; Valor_{total} representa a massa de CET adicionada inicialmente para se obter as NP e Valor_{quantificado} representa a quantidade não encapsulada, analisada por CLAE.

4.6.3. Morfologia das nanopartículas

A morfologia das NP-CET foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL modelo JSM-7001F). Foram pipetados 10 μ L das formulações em uma plataforma de metal deixando o solvente secar em temperatura ambiente. As amostras foram então metalizadas a vácuo com uma camada de ouro para proteger a formulação de possíveis degradações, e então levadas ao equipamento. Imagens foram capturadas com aumentos em magnitude de 25000 e 30000 vezes.

4.7. Avaliação da mucoadesividade das NP-CET

4.7.1. Desenvolvimento de NP de mucina (MCN)

Primeiramente, a MCN tipo III foi hidratada com água Milli-Q (proporção de 1:10 m/v), *overnight*, a uma temperatura de aproximadamente 4°C na geladeira. O pH da dispersão foi ajustado para 7,4 utilizando uma solução de NaOH 1 mol/L. Em seguida, para obtenção de uma concentração final de MCN igual a 1% (m/v), a solução foi diluída em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4. A amostra foi sonicada (Sonicador Thornton – T14) por 40 minutos para obtenção de NP-MCN com diâmetros inferiores a 800 nm. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado com uma seringa acoplada a um filtro de 0,22 μ m e analisado no aparelho Zetasizer Nano Series.

4.7.2. Mucoadesividade das NP-CET frente às NP-MCN

Uma mistura de NP-CET e NP-MCN foi preparada na proporção 1:1 (v/v) e em seguida foram agitadas em vortex (Daigger Vortex Genie 2TM) durante 2 min. Imediatamente após esse procedimento, as amostras foram analisadas quanto ao seu

diâmetro hidrodinâmico e IPD no aparelho Zetasizer Nano Series, assim como as amostras de NP-CET e NP-MCN isoladas.

4.8. Estudos *in vitro* de liberação do CET a partir das formulações desenvolvidas

O ensaio de liberação foi realizado em quadruplicata para determinação da cinética de liberação do CET nanoencapsulado. As células de difusão do tipo Franz (Figura 9) foram montadas com uma membrana de acetato de celulose, previamente lavada com água Milli-Q fervente para a retirada de impurezas, separando os compartimentos doadores dos receptores.

Sobre as membranas (compartimento doador) foram colocadas 1mL das NP-CET. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL da solução de água Milli-Q:metanol (80:20) (v/v), que foi mantida sob agitação por um período de 12 h. A cada hora, uma alíquota de 1 mL da solução receptora foi removida e igual volume de solução água Milli-Q:Metanol foi imediatamente reposto.

As alíquotas foram filtradas em seringas acopladas à membranas de porosidade de 0,45 μm . Posteriormente a quantidade de fármaco liberada foi determinada por CLAE-UV.



Figura 9. Representação da célula de difusão de Franz para o experimento *in vitro* de liberação.

A equação abaixo foi utilizado para determinação da quantidade de fármaco que foi liberado e se difundiu pela membrana de acetato de celulose:

$$Q_{\text{real}, t} = C_{\text{mensurada}, t} \cdot V_r + V_a \cdot \Sigma^{n-1} C_a \quad \text{(Equação 7),}$$

onde: $Q_{\text{real}, t}$ representa a quantidade real liberada acumulada no tempo t ; $C_{\text{mensurada}, t}$ é a concentração mensurada da amostra no tempo t ; V_r é o volume do receptor (15 mL); V_a sendo o volume de amostra coletada (1 mL) e C_a a concentração de amostra coletada.

A cinética de liberação do CET a partir das NP-CET foi analisada segundo os modelos matemáticos de ordem zero, modelo de Higuchi e modelo de primeira ordem, segundo as equações descritas na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético.

Modelo matemático	Fórmula
Ordem Zero	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Modelo de Higuchi	$f_t = K_H t^{1/2}$
Primeira Ordem	$\ln Q = \ln Q_0 - k_1 t$

Q_t é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco no tempo zero; K_0 é a constante de liberação de ordem zero; f_t é a quantidade de fármaco cedida no tempo t por unidade de superfície; K_H é a constante de liberação de Higuchi; K_1 é a constante de liberação de primeira ordem e t é o tempo do ensaio.

4.9. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica das formulações frente à espécie *Candida albicans*

Os fungos da espécie *Candida albicans*, cepa ATCC 40277, foram recebidos suspensos em glicerol em tubos de ensaio e armazenados em geladeira. As cepas utilizadas foram proliferadas em triplicata a cada utilização.

4.9.1. Higienização do material e medidas de segurança

A cultura das cepas bem como os testes para avaliar a atividade antifúngica das amostras de interesse foram realizados dentro de uma capela de fluxo laminar (FilterFluxo®, São Paulo, Brasil). A capela foi higienizada a cada utilização com álcool 70% e submetida a radiação UV durante 20 min antes e após cada passo do experimento. Todo o material utilizado para o teste foi autoclavado antes de ser colocado na capela de fluxo laminar. Todas as vidrarias e quaisquer materiais descartados utilizados durante o experimento foram autoclavados novamente antes de serem colocados em lixo biológico. A parte superior das vidrarias e a alça de platina utilizada para o cultivo do fungo foram flambadas antes e depois de serem manuseadas dentro da capela de fluxo laminar. Neste estudo, foram utilizados também os equipamentos de proteção individual, como máscara, luvas e jaleco.

4.9.2. Preparo do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 com vermelho de fenol sem bicarbonato de sódio. O meio em pó (10,4 g) foi reconstituído em água destilada em quantidade suficiente para produzir um litro de meio. Após isso, foi feito o tamponamento com o MOPS a 0,165 mol/L (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até alcançar pH 7. O meio produzido foi filtrado em sistema de filtração à vácuo utilizando membrana de 0,45 µm na capela de fluxo laminar. Para o controle de esterilidade, uma alíquota de 3 mL do meio foram armazenadas em estufa a 37 °C por 5 dias. Após esse período, foi feita a análise da turbidez, e somente o meio límpido foi liberado para uso.

4.9.3. Preparo das soluções e meios de cultura

O meio líquido foi preparado com 50 mL de caldo Saborraud dextrose a uma concentração de 30 g/L, em uma alíquota de 50 mL para crescimento do fungo. O meio sólido foi preparado com 50 mL de Saborraud agar a uma concentração de 65,0 g/L, e alíquota de 50 mL. A solução salina foi preparada com concentração correspondente a 0,85% (m/v).

4.9.4. Cultivo das cepas de *Candida albicans*

Em capela de fluxo laminar, verteu-se o meio sólido dentro de três tubos de ensaio vazios que foram mantidos em posição inclinada até total solidificação. Os tubos foram armazenados isoladamente na geladeira. Em seguida, o conteúdo de um tubo de ensaio com fungo proliferado (meio sólido com fungo e glicerol) foi vertido em 50 mL do meio líquido e deixado na estufa a temperatura de 35°C, durante 24 h, para crescimento do fungo nesse meio. A alça de platina foi inserida no meio líquido, cultivado no dia anterior, e passada levemente sobre o meio sólido. Este procedimento foi repetido três vezes.

Os tubos de ensaio foram vedados com algodão e levados à estufa a temperatura de 35°C, por mais 24 h. Os tubos de ensaio contendo a cultura do fungo já proliferado foram então retirados da estufa, colocou-se glicerol e foram armazenados na geladeira para uso posterior. O terceiro tubo foi levado à capela de fluxo laminar (Figura 10).

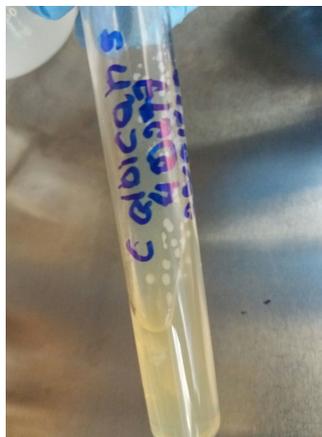


Figura 10. Tubo de ensaio contendo a cultura de *Candida albicans*.

Para preparo do inóculo, o fungo foi diluído em 5 mL da solução salina que foi padronizada com leituras no espectrofotômetro (Molecular devices, Sunnyvale, USA) em comprimento de onda selecionado em 530 nm e a adição de fungo no meio deu-se até a obtenção de valores de absorção padronizados entre 0,08 e 0,10. Esta absorbância, de acordo com a escala padrão de McFarland, equivale a uma quantidade de fungos de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL (NCCLS, 2002).. Em seguida, diluiu-se 1 mL da solução salina com o fungo em 50 mL da solução de RPMI 1640 (diluição 1:50). Depois desse procedimento, 1 mL da última diluição foi diluído em 20 mL também no meio RPMI 1640 (diluição 1:20). As diluições seriadas foram realizadas em placa de 96 poços conforme o esquema representado na Figura 11. Inicialmente, colocou-se 100 μ L do inóculo em todos os poços em que seriam realizadas as triplicatas. Em seguida, colocou-se 100 μ L das amostras listadas abaixo, somente nos poços da primeira coluna.

- solução de CET;
- NP-CET;
- NP-QS sem fármaco

O inóculo, somado à amostra foi homogeneizado e, então, transferiu-se 100 μ L para os poços da segunda coluna (Figura 11A e 11B). O procedimento foi realizado sucessivamente até a última coluna, onde 100 μ L foram descartados, de forma que a concentração em cada poço fosse sempre a metade da concentração do poço anterior (Figura 11C). Por fim, as amostras controle foram realizadas colocando-se 100 μ L do meio líquido e 100 μ L do inóculo em poços separadamente (Figura 11D). A placa de 96 poços foi colocada em estufa mantida a uma temperatura de 35°C por 24 h para posterior análise. Após esse período, 10 μ L de uma solução de 5 mg/mL de MTT foram colocados em cada um dos poços da placa. Após mais 4 h na estufa sob proteção da luz, os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 μ L de DMSO e a placa foi analisada por

meio de leituras espectrofotométricas em 570 nm e 630 nm utilizando-se o equipamento SpectraMax[®] Plus 384 Microplate Reader (Molecular devices, Sunnyvale, USA).

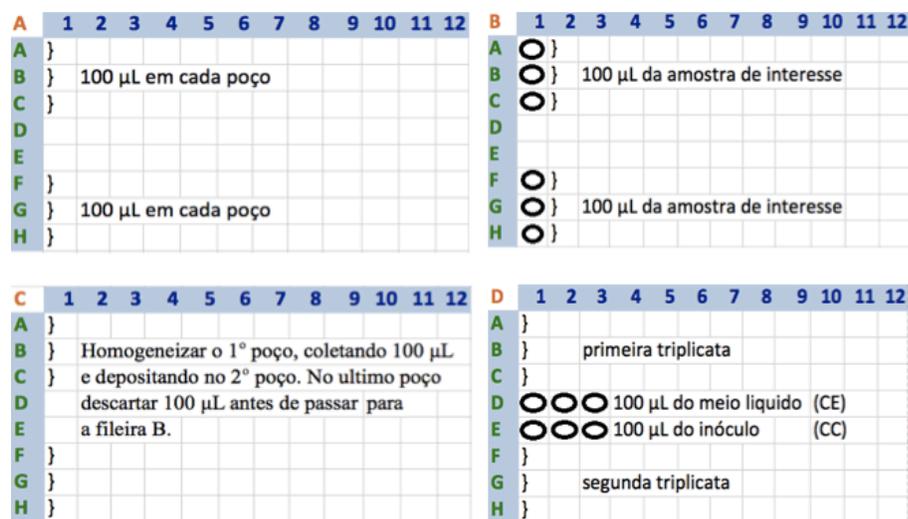


Figura 11. Esquema simplificado das diluições seriadas em placa de 96 poços para cultura de fungos.

4.10. Estudos *ex vivo* de permeação de CET através da mucosa de suínos

Células de difusão tipo Franz foram montadas com a mucosa suína separando os compartimentos doadores dos receptores (Figura 12). Este último compartimento foi preenchido com 15 mL de solução receptora de água Milli-Q:metanol (80:20) (v/v), mantida sob agitação. Ao compartimento doador, na metade superior da célula, foi adicionada 1 mL da suspensão aquosa das NP-CET. O experimento foi realizado por um período de 2 h, garantindo assim a viabilidade da mucosa recém retirada do animal.

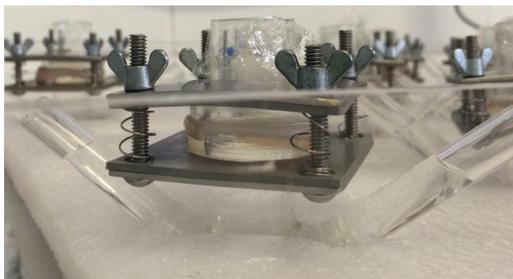


Figura 12. Células de difusão tipo Franz montadas com a mucosa suína separando os compartimentos doadores dos receptores.

As concentrações de fármaco permeadas através da mucosa foram determinadas pela análise da solução receptora ao final do experimento. A mucosa foi então retirada da célula de difusão, picotada e adicionada a 5 mL de metanol sob agitação magnética constante (2000 rpm) durante 3 horas para extração de CET da mucosa. Após filtração, a solução extratora foi analisada para se determinar a quantidade de CET retido na mucosa. O mesmo experimento foi realizado com uma solução aquosa de CET (controle) para fins de comparação.

4.11. Análises estatísticas

As diferenças significativas foram consideradas para $<0,05$. Nas Tabelas e Figuras, os dados quantitativos estão apresentados por meio da média \pm desvio padrão da média de pelo menos 3 replicatas. As análises estatísticas dos dados foram realizadas com a utilização do programa Origin 8 e as regressões lineares foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2010.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação do método analítico para quantificação de CET por CLAE

O comprimento de onda de absorção máxima encontrado para o fármaco em espectrofotômetro foi o de 205 nm. Esse comprimento de onda foi selecionado, portanto, para detecção do CET por CLAE.

Aplicadas as condições padronizadas para análise do CET por CLAE, descritas no item 4.3.2., obteve-se picos para o fármaco simétricos e com boa resolução. O tempo de retenção para o CET no equipamento foi de aproximadamente 7,3 minutos (Figura 13).

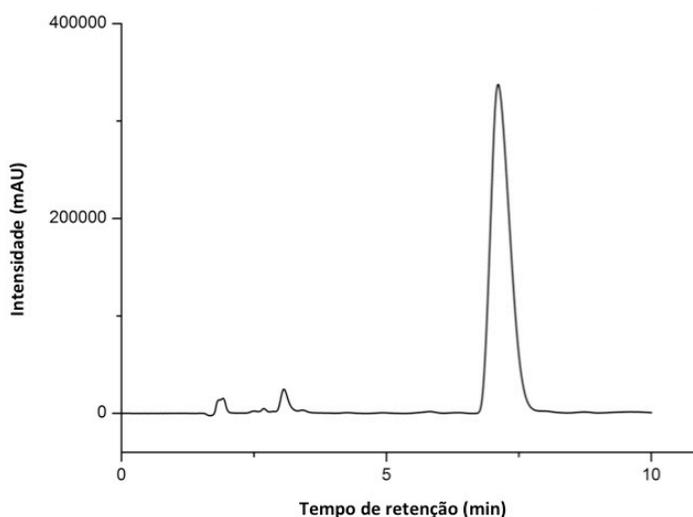


Figura 13. Cromatograma referente à injeção de uma solução de CET a 100 µg/mL em metanol. Vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de amostras igual a 20 µL e detecção em 205 nm.

5.1.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade e/ou especificidade de um método analítico garante que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação, fármacos co-administrados entre outros (CASSIANO et al., 2009).

A Figura 14 apresenta os cromatogramas de todos os interferentes utilizados nos experimentos que se seguem, ou seja, o metanol (Figura 14A), utilizado como solvente extrator do CET retido na mucosa; uma solução de água Milli-Q:metanol (80:20) (v/v) (Figura 14B), que será utilizada como meio receptor nos estudos de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo*; uma solução quitosana (0,55 µg/mL) contaminada com CET (Figura 14C), utilizadas no preparo das NP-CET; e, por fim, um homogeneizado de mucosa após 3 horas de agitação magnética em metanol (Figura 14D).

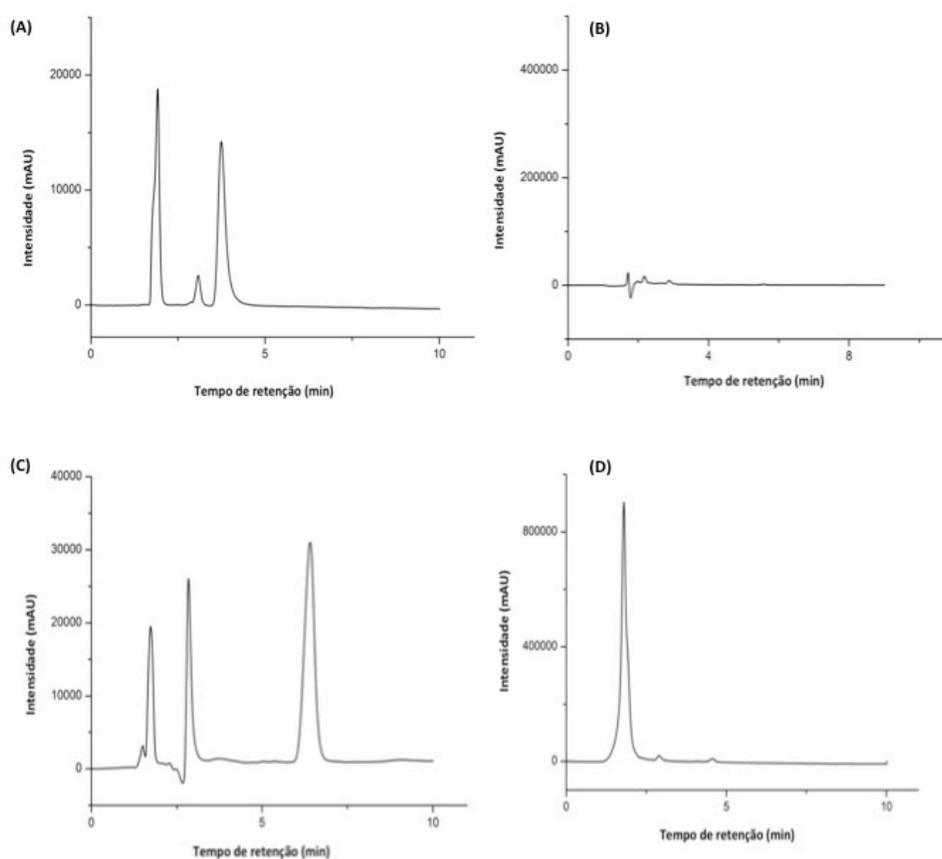


Figura 14. Cromatogramas referentes à injeção de (A) metanol, (B) solução de água Milli-Q:metanol (80:20), (C) solução quitosana (0,55 µg/mL) + CET e (D) homogeneizado de mucosa após 3 horas de agitação magnética em metanol, para análise da seletividade do método analítico. Fase móvel: metanol/água Milli-Q (75:25, v/v), vazão 1,0 mL/min e detecção no UV em 205 nm.

Comparando-se os cromatogramas acima apresentados com o cromatograma do CET isolado, apresentado na Figura 13, pode-se concluir que o método cromatográfico é seletivo para a dosagem do CET nos experimentos que se seguem, uma vez que nenhum pico dos contaminantes eluíram próximo ao tempo de retenção do CET.

5.1.2. Linearidade

A linearidade de um método corresponde à sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância que está sendo analisada, dentro de uma faixa de aplicação (ARAGÃO et al., 2009). A Figura 15 apresenta a curva analítica obtida para o CET numa faixa de concentração que vai de 2 µg/mL a 20 µg/mL. A regressão linear da reta obtida gerou um o coeficiente de correlação linear igual a 0,99922, o que demonstra a linearidade do método para a faixa de concentração de CET analisado, segundo parâmetro proposto pela ANVISA (ANVISA, 2003).

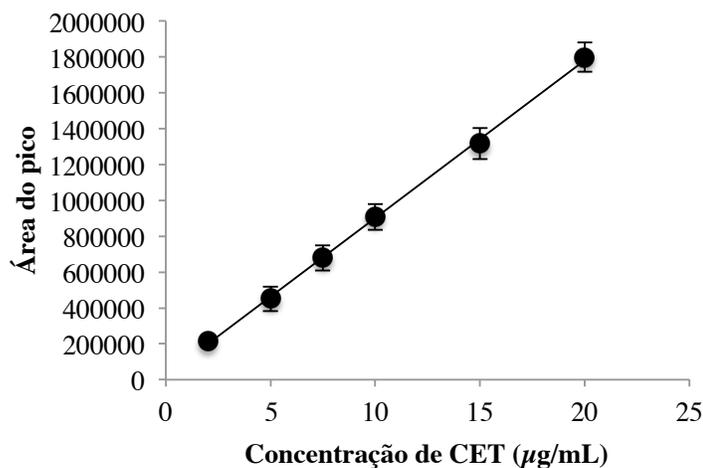


Figura 15. Representação da curva analítica obtida para o CET por análise em CLAE. Equação da reta: $y = 87870x + 22980$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,99922$.

5.1.3. Precisão e Exatidão

A precisão consiste em uma medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea (CASSIANO et al., 2009).

A Tabela abaixo apresenta os resultados de precisão referentes as três concentrações (2,0; 7,5; 20 µg/mL) que contemplaram o intervalo linear do método.

Tabela 3. Análise dos valores obtidos para precisão e da exatidão do método de quantificação para o CET.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Intra dia			
2,0	1,95 ± 0,05	2,40	-2,22
7,5	7,61 ± 0,14	1,84	1,56
20,0	20,15 ± 0,88	4,39	0,79
Inter dia			
2,0	1,99 ± 0,07	3,69	-0,26
7,5	7,28 ± 0,06	0,87	-2,90
20,0	20,47 ± 0,55	2,67	2,33

Os valores de CV obtidos para os ensaios intra dia e inter dia apresentados na Tabela 3 sugerem, portanto, que o método possui precisão, uma vez que os CV% não ultrapassam valores de 5% conforme regulamentado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

5.1.4. LD e LQ

Os valores obtidos para LD e LQ para o método de quantificação do CET foram iguais a 0,361 e 1,094 µg/mL e demonstram sua sensibilidade em dosar quantidades diminutas do fármaco nas amostras.

5.1.5. Recuperação do CET da mucosa

A recuperação representa a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (ANVISA, 2003). A Tabela 4 apresenta os resultados de recuperação do CET, em diferentes concentrações, que foram extraídos após 3 horas de agitação magnética (2000 rpm) em 5 mL de metanol.

Tabela 4. Valores de porcentagem obtidos para a recuperação do CET em metanol.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
2,0	92,98 \pm 11,54
5,0	90,79 \pm 3,71
20,0	103,61 \pm 2,19

Observa-se que o CET foi extraído eficientemente da mucosa com o metanol, seguindo-se o procedimento de extração proposto. Quantidades acima de 90% do fármaco foram recuperados, de acordo com os dados apresentados na Tabela acima. O método, portanto, é adequado para realização dos experimentos de permeação do CET através da mucosa suína, que deverão fornecer resultados quantitativos confiáveis.

5.2. Obtenção e caracterização das nanopartículas de quitosana contendo CET

5.2.1 Diâmetro de partícula e Potencial Zeta

As NP-QS como carreadores de fármacos oferecem muitas vantagens, como alta estabilidade e estabilização de fármacos lábeis, baixa toxicidade, biodegradabilidade e não-imunogenicidade. Além disso, a preparação dessas partículas é simples e sem a utilização de solventes orgânicos uma vez que são solúveis em solução aquosa ácida (GRILLO et al.,

2014; NAGPAL et al., 2010). A técnica de geleificação ionotrópica, utilizada para o preparo das NP-CET consiste na interação da porção aniônica, ou seja, grupos $-\text{PO}_4^{-2}$ do TPP, com grupamentos $-\text{NH}_2$ da quitosana que, no pH ácido da solução estão protonados para $-\text{NH}_3^+$. Essas interações eletrostáticas são responsáveis pelo enovelamento das cadeias poliméricas, formando NP-QS redondas e homogêneas (AMEEDUZZAFAR et al., 2014).

Macroscopicamente, Kazemzadeh-Narbat e colaboradores (2015) observaram que durante o preparo das NP-QS pela técnica de geleificação, a aparência da solução mudou de uma solução límpida a opalescente, quando TPP foi adicionado à solução polimérica. De fato, essa alteração física da solução foi observada, como mostra as imagens contidas na Figura 16.

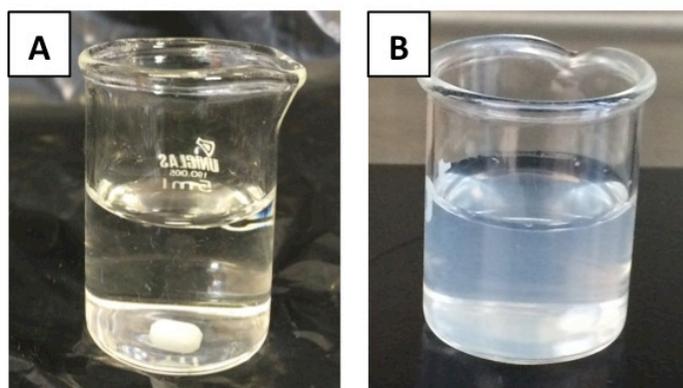


Figura 16. Representação da opalescência na formação de nanopartículas: A) Solução de quitosana antes da adição do TPP e B) Nanopartículas formada após a adição do TPP.

Na Tabela 5 estão apresentados valores de diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial zeta para as NP-CET em comparação a NP-QS preparadas sem o fármaco CET.

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial zeta das nanopartículas de quitosana contendo ou não CET encapsulado.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
NP-QS sem o fármaco	344,7 ± 10,06	0,462 ± 0,079	+21,8 ± 0,3
NP-CET	351,5 ± 32,88	0,493 ± 0,060	+34,6 ± 3,9

As NP-QS sem o CET apresentaram diâmetro de 344,7 nm e este diâmetro foi aumentado para 351,5 nm com a incorporação do fármaco nas partículas. Com isso, a presença de CET nas NP-QS não alterou de forma significativa as propriedades físicas das partículas, que apresentaram tamanho médio estatisticamente iguais.

O valor IPD reflete a distribuição do tamanho das nanopartículas (MASARUDIN et al., 2015). A distribuição de tamanho dos dois grupos de partículas analisados foram monomodais, ou seja, apenas uma população de partículas foram formadas em cada caso, e estas populações apresentaram IPD entre 0,462 e 0,493.

O potencial zeta reflete a presença ou não de grupamentos carregados na superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). Os valores positivos do potencial zeta são devidos à presença dos grupos catiônicos da quitosana na superfície das NP-QS. A alta magnitude dos potenciais zeta absolutos são indicativos de que as nanopartículas de quitosana desenvolvidas apresentam boa estabilidade de dispersão (ABUL KALAM et al., 2016).

O residual de cargas positivas (+ 34,6 ± 3,9) em torno das NP-CET também é um bom indicativo de que elas possuem propriedades de mucoadesão, uma vez que a mucina, que é o principal componente do muco vaginal, é uma proteína de carga negativa. Deverá

ser essa interação eletrostática entre as NP-QS positivas e o muco vaginal negativamente carregado que permitirá a bioadesão destes carreadores na mucosa vaginal, de modo a garantir uma boa penetração do fármaco na mucosa por períodos prolongados.

5.2.2. Eficiência de Encapsulação

A EE% mostra a concentração de fármaco associada às nanopartículas polimérica em relação ao total de fármaco adicionado inicialmente à preparação. Essa associação depende da afinidade entre o polímero e a substância a ser encapsulada. Duas proporções de fármaco em relação ao polímero foram então testadas na preparação de forma a se obter uma maior EE% (Tabela 6).

Tabela 6. Diâmetro hidrodinâmico, IPD, potencial zeta e EE% das nanopartículas de quitosana contendo CET preparadas com diferentes proporções fármaco/polímero.

Amostra	Proporção (Quitosana/CET)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
NP1	1:1	810,7 ± 49,95	+20,57 ± 0,95	54,10 ± 4,33
NP2	5:1	351,5 ± 32,88	+34,6 ± 3,9	77,78 ± 6,09

A melhor EE% das NP-CET foi igual a 77,78 ± 6,09 e foi conseguida quando uma menor proporção de fármaco foi utilizada. O resultado se explica por se estar trabalhando com um polímero hidrofílico, que interage de maneira limitada com um fármaco pouco solúvel em água, como o CET. Assim, quando se aumenta essa quantidade de fármaco no sistema, as nanopartículas não conseguem acomodar o CET em seu interior, reduzindo a taxa de encapsulação.

De qualquer forma, observa-se que a EE% obtido para as NP-CET apresentaram valores parecidos com alguns dos estudos descritos na literatura nos quais o método de geleificação ionotrópica foi empregado. Maruyama et al (2016), obtiveram nanopartículas

de quitosana com EE% de $58,6 \pm 4,5\%$ e $69,6 \pm 5,5\%$, para herbicidas imazapic e imazapyr, respectivamente. Grillo e colaboradores (2014), desenvolveram nanopartículas contendo paraquat com uma EE% de $62,66 \pm 0,77\%$, indicando uma boa afinidade entre seus componentes. Por fim, uma eficiência de $69,57 \pm 3,54\%$, foi demonstrada por Ameduzzafar e seus colaboradores (2014), para nanopartículas de quitosana encapsulando o carteolol, um antagonista beta-adrenérgico.

5.2.3. Morfologia das Nanopartículas

A morfologia das NP-CET foi analisada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise morfológica é feita para se determinar a forma e distribuição das NP-CET, bem como para se confirmar o diâmetro da população de partículas formadas, já encontrado nos estudos envolvendo espalhamento de luz dinâmico.

As fotomicrografias revelaram que as NP-CET apresentaram-se no formato arredondado e com uma distribuição de tamanho bastante homogênea. Além disso, a imagem de maior ampliação indica que a superfície da partícula é lisa e não rugosa (Figura 17).

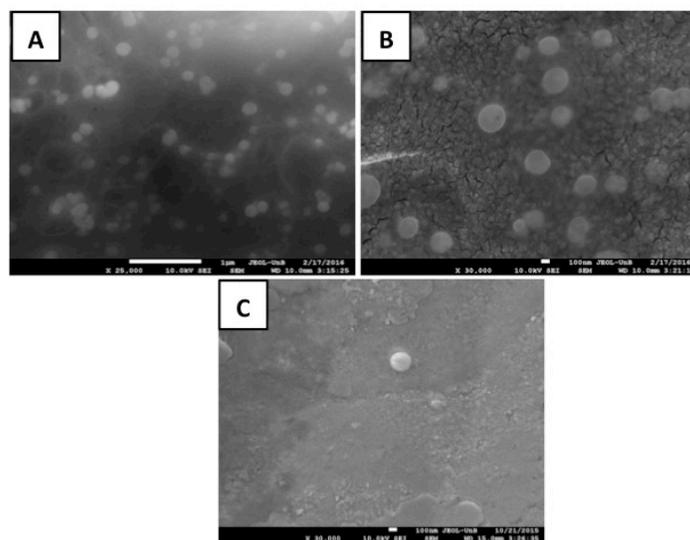


Figura 17. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 25000 vezes B) e C) 30000 vezes, para as NP-CET.

5.3. Avaliação da mucoadesividade das NP-CET frente às NP-MCN

A mucoadesão consiste em uma interação que envolve uma forma farmacêutica e qualquer muco secretado por uma membrana mucosa (BODDUPALLI et al., 2010). A quitosana tem sido amplamente investigada no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos com liberação controlada. Particularmente, ela tem propriedades mucoadesivas devido à sua carga positiva que lhe confere interação eletrostática com a superfície mucosa de carga negativa, fazendo com que fique mais fácil a absorção de fármacos. Além disso, ao se aderir à superfície da mucosa, ocorre uma abertura transitória das junções apertadas através de translocação das proteínas ZO-1 e oclusão da membrana do plasma para o citoplasma, e a redistribuição da F-actina. A natureza hidrofílica do revestimento de quitosana permite aumentar significativamente as ligações de hidrogênio entre as nanopartículas e as moléculas de mucina e, assim, melhorar a mucoadesão (JUNG e HAN, 2014; LUO et al., 2015; SHI et al., 2014).

Para a avaliação da mucoadesividade das NP-CET obtidas neste estudo, essas partículas foram colocadas em contato com a NP-MCN, que é o principal componente do muco vaginal, e analisadas em relação as alterações em seu diâmetro hidrodinâmico.

A Figura 18 mostra a distribuição de tamanho das NP-CET, que inicialmente apresentavam um diâmetro médio de $351,5 \pm 32,88$. Após serem misturadas a uma quantidade de NP-MCN de diâmetro médio igual a $406,1 \pm 12,5$, houve o surgimento de uma única população no sistema de partículas de diâmetro médio igual a $1649,0 \pm 34,7$. A presença exclusiva desses agregados no sistema, demonstra, dessa forma, o potencial mucoadesivo das NP-CET.

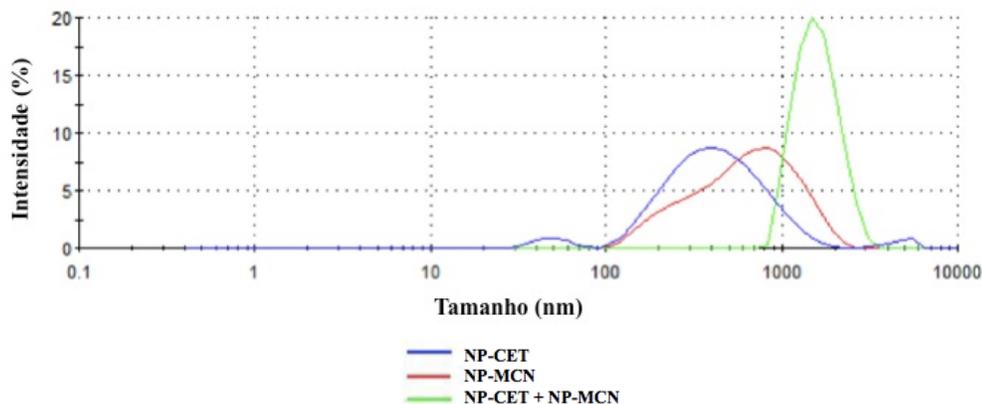


Figura 18. Representação gráfica do tamanho hidrodinâmico das NP-CET, NP-MCN e NP-CET + NP-MCN.

5.4. Estudo de Liberação *in vitro* do CET a partir das NP-CET

A Figura 19 mostra o perfil de liberação do CET a partir da formulação contendo as NP-CET, pH 4,5 por um período de 12 h.

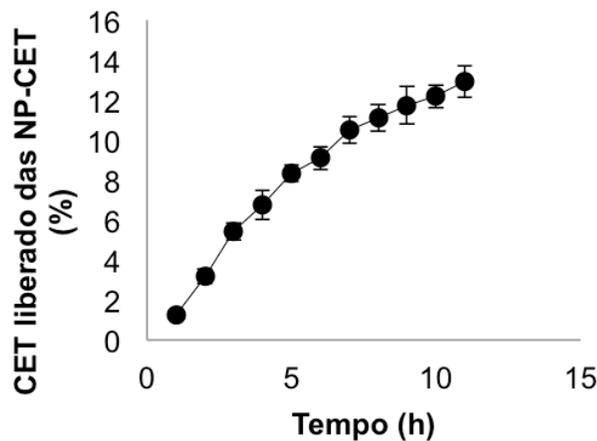


Figura 19. Perfil de liberação do CET a partir da formulação contendo NP-CET, pH 4,5.

Observa-se que as NP-CET liberaram apenas 14% do seu conteúdo de fármaco em um período de 12 h. A velocidade de permeação do fármaco a partir das NP-CET foi então analisada segundo os modelos de liberação de ordem zero, modelo de Higuchi e modelo de

liberação de primeira ordem. Por meio dos resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que as NP-CET apresentam um modelo de cinética que aproxima-se mais ao modelo de Higuchi, com valor de coeficiente de correlação linear (R) mais próximo da unidade um.

Tabela 7. Valores dos fluxos de liberação do CET das NP-CET e seus coeficientes lineares obtidos.

Modelo Cinético	Fluxo J	R
Ordem Zero	0,955 ± 0,113 µg/h	0,973
Modelo de Higuchi	4,756 ± 0,662 µg/h ^{1/2}	0,996
Primeira Ordem	0,137 ± 0,051 µg/h	0,873

De fato, o modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick podendo ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada (COSTA, 2002; VALENTE et al., 2013).

5.5. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica das formulações frente à espécie *Candida albicans*

A avaliação *in vitro* da atividade antifúngica foi baseada na Norma M27-A2— Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia Antifúngica Norma Aprovada — Segunda Edição do NCCLS que determina a concentração inibitória mínima (CMI) como sendo, “a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo”.

O revelador utilizado na avaliação da atividade antifúngica foi o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O ensaio de MTT é comumente utilizada para medir o número de células metabolicamente ativas em ensaios *in vitro* e consiste especificamente na avaliação da função enzimática, em que os sais tetrazólio de

$\mu\text{g/mL}$) está dentro da faixa encontrada na literatura. Já as NP-CET apresentaram um valor de CIM_{90} igual a $0,58 \mu\text{g/mL}$, ou seja, aproximadamente 8 vezes maior que para o fármaco livre. O resultado já era esperado, uma vez que a liberação do CET encapsulado para o meio de cultura dos fungos se dá de maneira muito sustentada, conforme os resultados de liberação apresentados na Figura 19. Ou seja, como em 24 h de incubação das NP-CET com as cepas de *Candida albicans*, somente uma porcentagem do fármaco está liberado das NP, esperava-se esse valor de CIM_{90} para as NP-CET.

É interessante notar que mesmo as NP-QS controle, em concentrações maiores que $34,38 \mu\text{g/mL}$ foram suficientes para eliminar 90% das cepas de *Candida albicans*. Muitos estudos, de fato, indicam que esse polímero possui efeito antifúngico (ING et al., 2012) e com isso pode agir de maneira sinérgica ao fármaco no combate à vaginite. Além disso, os dispositivos de liberação à base de quitosana podem prolongar a duração da atividade do agente ativo, melhorando sua eficiência e reduzindo os efeitos colaterais sob condições desejadas (CALDERÓN et al., 2013).

5.6. Estudo *ex vivo* de permeação do CET a partir das NP-CET

O experimento de permeação *ex vivo* do CET através de mucosa suína foi realizado a partir de duas formulações: uma simples solução de CET e as NP-CET, que foram colocadas em contato com a mucosa durante duas horas, período que garante a viabilidade do tecido.

Recentemente Gratieri e Kalia (2014), utilizaram a mucosa bucal de suínos para o desenvolvimento de um novo método para a terapia local dos cânceres de cabeça e pescoço usando a técnica de iontoforese tópica. O objetivo desse estudo era utilizar condições que favorecem a deposição dos fármacos 5-fluorouracil e leucovorina na membrana através da permeação de forma a limitar o risco de exposição sistêmica *in vivo*.

O CET a partir de ambas as formulações testadas, atravessaram a mucosa e se dissolveram na solução receptora das células de difusão em concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico. Com relação aos estudos de retenção do fármaco na mucosa, no entanto, observou-se que a quantidade de CET recuperada da mucosa para a solução controle foi aproximadamente 10 vezes maior que a quantidade para as NP-CET (Figura 21). A análise estatística dos dados demonstrou que houve diferenças significativas entre as quantidades de CET que penetrou a mucosa modificando-se as formulações.

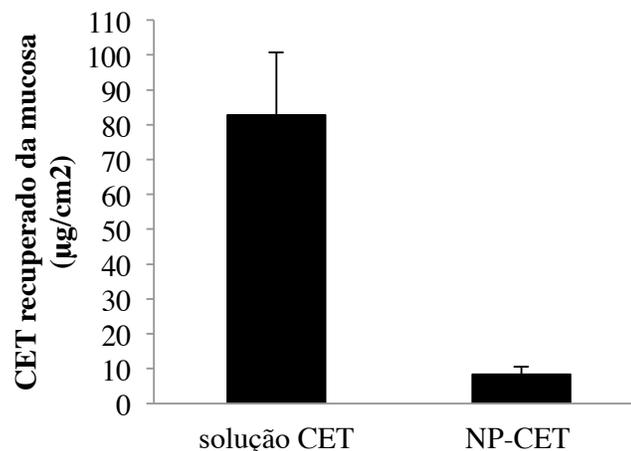


Figura 21. Quantidade de CET recuperado da mucosa ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir da solução de CET e das NP-CET.

Esse resultado de redução da penetração do fármaco no tecido era esperado, uma vez que a formulação das NP-CET retardam a liberação do fármaco. Do estudo de liberação *in vitro*, tem-se que em 2 horas somente 3,18% de CET é liberado das NP-CET. No entanto, considerando-se que o CIM₉₀ calculado para as NP-CET foi de 0,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e do fármaco livre é de 0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, percebe-se que a concentração de CET que penetra a mucosa em apenas 2 horas ($8,37 \pm 2,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) já seria suficiente para promover a eliminação do fungo no local.

Os resultados deste estudo indicam, portanto, que as NP-CET presentes na formulação desenvolvida, por serem mucoadesivas, ficarão aderidas à mucosa vaginal após aplicação por um tempo superior ao de solução convencional do fármaco. Além disso, a liberação dos fármaco a partir das NP-CET deverá ocorrer de forma controlada, permitindo que quantidades suficientes para eliminação do fungo penetre na mucosa. A formulação desenvolvida, portanto, deverá melhorar a efetividade da terapia tópica da CVV.

6. CONCLUSÕES

As NP-CET desenvolvidas com o polímero quitosana apresentaram-se como um sistema interessante para o tratamento tópico de infecções vaginais causadas por *C. albicans*. O potencial zeta positivo das partículas obtido com o polímero quitosana demonstrou conferir propriedades mucoadesivas para essas nanopartículas, indicando que após serem aplicadas elas permanecerão por um período prolongado em contato com a mucosa vaginal. Uma vez aplicadas, elas deverão liberar o fármaco progressivamente, mas em quantidade suficiente para que ele penetre a mucosa em concentrações suficientes para a eliminação da espécie *Candida albicans*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL KALAM, M.; KHAN, A. A.; KHAN, S.; ALMALIK, A.; ALSHAMSAN, A. Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size, encapsulation, and release using Box-Behnken experimental design. *Int J Biol Macromol*, v. 87, p. 329-340, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RE N° 899, 2003.

ÁLVAREZ, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, p. 319-327, 2007.

AMEEDUZZAFAR.; ALI, J.; BHATNAGAR, A.; KUMAR, N.; ALI, A. Chitosan nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of cateolol in rabbits. *Int J Biol Macromol*, v. 65, p. 479-91, 2014.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

BAUM, M. M.; BUTKYAVICHENE, I.; GILMAN, J.; KENNEDY, S.; KOPIN, E.; MALONE, A. M.; NGUYEN, C.; SMITH, T. J.; FRIEND, D. R.; CLARK, M. R.; MOSS, J. A. An intravaginal ring for the simultaneous delivery of multiple drugs. *J Pharm Sci*, v. 101, n. 8, p. 2833-2843, 2012.

BODDUPALLI, B. M.; MOHAMMED, Z. N. K.; NATH, R. A.; BANJI, D. Mucoadhesive

drug delivery system: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol*, v. 1, p. 381–387, 2010.

CALDERÓN, L.; HARRIS, R.; CORDOBA-DIAZ, M.; ELORZA, M.; ELORZA, B.; LENOIR, J.; ADRIAENS, E.; REMON, J. P.; HERAS, A.; CORDOBA-DIAZ, D. Nano and microparticulate chitosan-based systems for antiviral topical delivery. *Eur J Pharm Sci*, v. 48, n. 1-2, p. 216-22, 2013.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, v. 63, p. 125-132, 1997.

CARAMELLA, C. M.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 92, p. 39-52, 2015.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz. J. Pharm. Sci*, v. 46, n. 1, 2010.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*, v. 122, n. 6, p. 785-94, 2015.

CAVALCANTE, V. L. N.; MIRANDA, A. T.; PORTUGAL, G. M. P. Rastreamento de candidose vaginal durante a prevenção do câncer cérvico-uterino. *DST – J Bras Doenças Sex Transm*, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2005.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E.; RESIN, A.; HOWARD, K. A.; SUTHERLAND, D. S.; WEJSE, P. L. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, n. 11, p. 3892-5, 2011.

CHUAH, L. H.; ROBERTS, C. J.; BILLA, N.; ABDULLAH, S.; ROSLI, R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 116, p. 228-36, 2014.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 38, n. 2, 2002.

DA SILVA, P. B.; RAMOS, M. A.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs--a review. *J Biomed Nanotechnol*, v. 10, n. 9, p. 2218-43, 2014.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Sucrose ester stabilized solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: II. Evaluation of the imidazole antifungal drug-loaded nanoparticle dispersions and their gel formulations. *Nanotechnology*, v. 25, n. 10, p. 105102, 2014.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – A versatile semisynthetic polymer in biomedical. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE ABREU, L. C.; TODARO, V.; SATHLER, P. C.; DA SILVA, L. C.; DO CARMO, F. A.; COSTA, C. M.; TOMA, H. K.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; DE SOUSA, V. P.; CABRAL, L. M. Development and Characterization of Nisin Nanoparticles as Potential

Alternative for the Recurrent Vaginal Candidiasis Treatment. *AAPS PharmSciTech*, p. 1-7, 2016.

DE BERNARDIS, F.; ARANCIA, S.; SANDINI, S.; GRAZIANI, S.; NORELLI, S. Studies of Immune Responses in *Candida* vaginitis. *Pathogens*, v. 4, n. 4, p. 697-707, 2015.

DELLENBACH, P.; THOMAS, J. L.; GUERIN, V.; OCHSENBEIN, E.; CONTET-AUDONNEAU, N. Topical treatment of vaginal candidiasis with sertaconazole and econazole sustained-release suppositories. *Int J Gynecol Obstet*, v. 71, n. 1, p. 47-52, 2000.

DOVNIK, A.; GOLLE, A.; NOVAK, D.; ARKO, D.; TAKAČ, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, v. 24, n. 1, p. 5-7, 2015.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J Pharm Pharmacol*, v. 57, n. 1, p. 3-22, 2005.

ELFEKY, D. S.; GOHAR, N. M.; EL-SEIDI, E. A.; EZZAT, M. M.; ABOELEW, S. H. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. *Alex J Med*, 2015.

FATHALLA, Z. M.; KHALED, K. A.; HUSSEIN, A. K.; ALANY, R. G.; VANGALA, A. Formulation and corneal permeation of ketorolac tromethamine-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 42, n. 4, p. 514-24, 2016.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e

sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do Sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FIDEL, P. L. Jr. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol*, v. 40, n. 4, p. 359-75, 2002.

FORNARI, G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERT, P. F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. *Braz J Microbiol*, v. 47, n. 2, p. 373–380, 2016.

FRANK, L. A.; SANDRI, G.; D'AUTILIA, F.; CONTRI, R. V.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C.; FRANK, A. G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *Int J Nanomedicine*, v. 28, n. 9, p. 3151-61, 2014.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; DE FREITAS, L. A.; LOPEZ, R. F. Chitosan microparticules for sustaining the topical delivery of minoxidilsulphate. *J Microencapsul*, v. 28, n. 7, p. 650-658, 2011.

GOMEZ-MOYANO, E.; LAMA, A. C.; BALLESTEROS, M. D. F.; NAVARRO, M. L.; CASAÑO, A. V.; ERCHIGA, V. C. Eficacia terapéutica del voriconazol en candidiasis vulvovaginal crónica por *Candida glabrata*. *Rev. iberoamer. micol.*, v. 30, n. 1, p. 61–63, 2013.

GONÇALVES, B.; FERREIRA, C.; ALVES, C. T.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit*

Rev Microbiol, p. 1-23, 2015.

GONZÁLEZ, I. D. C. et al. Patient preferences and treatment safety for uncomplicated vulvovaginal candidiasis in primary health care – Study Protocol. *BMC Public Health*, v. 11, n. 1, p. 63, 2011.

GRATIERI, T.; KALIA, Y. N. Targeted local simultaneous iontophoresis of chemotherapeutics for topical therapy of head and neck cancers. *Int J Pharm*, v. 460, n. 1-2, p. 24-7, 2014.

GRILLO, R.; PEREIRA, A. E.; NISHISAKA, C. S.; DE LIMA, R.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L. F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *J Hazard Mater*, v. 278, p. 163-71, 2014.

HOMBACH, J.; PALMBERGER, T. F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and *in vitro* evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for nystatin. *J Pharm Sci*, v. 98, n. 2, p. 555-64, 2009.

HU, L.; SUN, Y.; WU, Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, v. 5, n. 8, p. 3103-11, 2013.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int J Biomater*, 2012.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.

JUNG, W.; HAN, H. K. Effective mucoadhesive liposomal delivery system for risedronate: preparation and in vitro/in vivo characterization. *Int J Nanomedicine*, v. 12, n. 9, p. 2299-306, 2014.

KARASULU, H. Y.; HILMIOGLU, S.; METIN, D. Y.; GÜNERI, T. Efficacy of a new ketoconazole bioadhesive vaginal tablet on *Candida albicans*. *Il Farmaco*, v. 59, n. 2, p. 163-167, 2004.

KAZEMZADEH-NARBAT, M.; REID, M.; BROOKS, M. S.; GHANEM, A. Chitosan nanoparticles as adenosine carriers. *J Microencapsul*, v. 32, n. 5, p. 460-6, 2015.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 71, n. 3, p. 420-30, 2009.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

LUO, Y.; TENG, Z.; LI, Y.; WANG, Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydr Polym*, v. 20, n. 122, p. 221-9, 2015.

MALLIPEDDI, R.; ROHAN, L. C. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *Informa healthcare*, v. 7, n. 1, p. 37-48, 2010.

MARDH, P. A.; RODRIGUES, A. G.; GENÇ, M.; NOVIKOVA, N.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; GUASCHINO, S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a

review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS*, v. 13, n. 8, p. 522-39, 2002.

MARTINS, H. P.; DA SILVA, M. C.; PAIVA, L. C.; SVIDZINSKI, T. I.; CONSOLARO, M. E. Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. *Acta Derm Venereol*, v. 92, n. 1, p. 78-82, 2012.

MARUYAMA, C. R.; GUILGER, M.; PASCOLI, M.; BILESHY-JOSÉ, N.; ABHILASH P. C.; FRACETO, L. F.; DE LIMA, R. Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. *Sci Rep*, v. 6, p. 23854, 2016.

MASARUDIN, M.J.; CUTTS, S. M.; EVISON, B. J.; PHILLIPS, D. R.; PIGRAM, P. J. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. *Nanotechnol Sci Appl*, v. 11, n. 8, p. 67-80, 2015.

MASHBURN, J. Etiology, Diagnosis, and Management of Vaginitis. *J Midwifery Womens Health*, v. 51, n. 6, p. 423-430, 2006.

Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, Pensilvânia, 2002.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res*, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan Nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull*, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NAKAYAMA, A.; SUNADA, H.; OKAMOTO, H.; FURUHASHI, K.; OHNO, Y.; ITO, M. Sustained-release progesterone vaginal suppositories 1 – development of sustained-release granule. *Biol Pharm Bull*, v. 32, n. 2, p. 276-282, 2009.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Infect Dis Clin N Am*, v. 22, n. 4, p. 637-652, 2008.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 92, p. 105-22, 2015.

PARALIKAR, P. Fabrication of ketoconazole nanoparticles and their activity against *Malassezia furfur*. *Nusantara Bioscience*, v. 7, n. 1, p. 43-47, 2015.

PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A. J.; TUTIDA, L. A.; FAVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. *J Bras Nefrol*, v. 30, n. 1, p. 48-53, 2008.

POWELL, A. M.; NYIRJESY, P. Recurrent vulvovaginitis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v. 28, n. 7, p. 967-76, 2014.

RODRIGUES, S.; DIONÍSIO, M.; LÓPEZ, C. R.; GRENHA, A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.*, v. 3, n. 3, p. 615-641, 2012.

SANDRI, G.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; MUZZARELLI, C.; CARAMELLA, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration

enhancers. *Eur J Pharm Sci*, v. 21, n. 2-3, p. 351-9, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEKHAVAT, L.; TABATABAII, A.; TEZERJANI, F. Z. Oral fluconazole 150 mg single dose versus intravaginal clotrimazol and treatment of acute vulvagenital candidiasis. *J Infect Public Health*, v. 4, n. 4, p. 195-199, 2011.

SEVERINO, P.; VASCONCELLOS, F. C.; FIGUEIREDO, E. S. Uso tópico de quitosana em oftalmologia. *Rev. Bras. Farm.*, v. 88, n. 4, p. 155-158, 2007.

SHAIKH, R.; SINGH, T. R. R.; GARLAND, M. J.; WOOLFSON, A. D.; DONNELLY, R. F. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci*, v. 3, n. 1, p. 89-100, 2011.

SHI, Y.; WAN, A.; SHI, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Experimental and mathematical studies on the drug release properties of aspirin loaded chitosan nanoparticles. *Biomed Res Int*, v. 2014, 2014.

SILVA, M. S.; COCENZA, D. S.; DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SKIBA, M.; SKIBA-LAHIANI, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int J Pharm*, v. 198, n. 1, p. 1-6, 2000.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, n. 11, p. 1556-68, 2005.

SPÓSITO, P. A. Nanocápsulas e nanoemulsões contendo antifúngicos: desenvolvimento farmacotécnico, caracterização e avaliação biológica em modelo de candidíase sistêmica. 2008. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. 2008.

TAGLIARI, M. P. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica. 2012. Tese (Doutorado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

THOMPSON, I. O.; VAN DER BIJL, P.; VAN WYK, C. W.; VAN EYK, A. D. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol*, v. 46, n. 12, p. 1091-8, 2001.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal*, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.

VALENTE, B. R.; MURAKAMI, F. S.; TAGLIARI, M. P.; PEREIRA, R. N.; SILVA, M. A. S. Estudo comparativo dos perfis de dissolução de cápsulas de cloridrato de fluoxetina. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 10, n. 3, p. 01-10, 2013.

VANIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver?. *Eur J Pharm Sci*, v. 50, n. 1, p. 29-41, 2013.

WANG, L.; TANG, X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: Design, in vitro and 'in vivo' evaluation, *Int J Pharma*, v. 350, n. 1-2, p. 181–

187, 2008.

WONG, T. W.; DHANAWAT, M.; RATHBONE, M. J. Vaginal drug delivery: strategies and concerns in polymeric nanoparticle development. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 11, n. 9, p. 1419-34, 2014.

YAN, J. Y.; NIE, X. L.; TAO, Q. M.; ZHAN, S. Y.; ZHANG, Y. D. Ketoconazole associated hepatotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Environ Sci*, v. 26, n. 7, p. 605-10, 2013.

YOUNG, F. M.; PHUNGTAMDET, W.; SANDERSON, B. J. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro*, v. 19, n. 8, p. 1051-9, 2005.

YOUSEFPOUR, P.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation. *Daru*, v. 19, n. 5, p. 367-75, 2011.