

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

THAIENE AVILA REIS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA
CONTENDO FLUCONAZOL NANOENCAPSULADO PARA O
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

BRASÍLIA

2014

THAIENE AVILA REIS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA
CONTENDO FLUCONAZOL NANOENCAPSULADO PARA O
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaiene Avila Reis

Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo fluconazol nanoencapsulado para o tratamento de candidíase vulvovaginal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

*Aos meus pais,
por sempre acreditarem que investir nos meus estudos seria o
melhor para eu trilhar um caminho com sabedoria e sucesso.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre guiar meus caminhos, me concedendo saúde e força para conquistar meus objetivos.

À **Universidade de Brasília** pela oportunidade de aperfeiçoamento e continuidade nos estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade de Brasília, especialmente a Íris Carvalho e Kyrila Nakayama, por toda paciência e atenção, resolvendo com muita competência os problemas burocráticos.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Prof^a. Dr^a. **Maria de Fátima Borin** por sua dedicação ao curso, atenção, disponibilidade e carinho com todos os alunos.

Aos **professores** que ministraram as disciplinas essenciais para meu crescimento como profissional. Especialmente a professora Prof^a. Dr^a. **Taís Gratieri** por toda apoio durante estes dois anos.

Aos **técnicos dos laboratórios** de Ensino, Controle de Qualidade e Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde e Microscopia Eletrônica e Genética e Morfologia do Instituto de Biologia, pelo apoio durante a realização dos experimentos que não eram possíveis de ser realizados em nosso laboratório.

Aos **meus familiares**, especialmente minha avó Sonia, minhas tias Rita e Aurita, meu tio Rubens, meu padrinho Paulo, meus primos Caio e Clara e minha sogra Gisela por sempre acreditarem em mim. As palavras de incentivo, torcida e carinho de vocês são fundamentais na minha vida.

Às **minhas amigas** Raquel, Juliana, Paula, Sabrina, Jéssica e Amanda por me fazerem conhecer o significado da palavra amizade. Vocês já demonstraram diversas vezes o quanto gostam de mim e me querem bem e por mais que não estejamos juntas diariamente, porque precisamos seguir nossas vidas com as diferentes escolhas que fizemos na faculdade, nossa sintonia permanece intacta.

Aos **amigos da dança** por fazerem os meus momentos de descanso mais felizes. A paixão que compartilhamos pela dança nos uniu e minha vida se tornou muito mais agradável com a presença de vocês. Nós sabemos que quando queremos alguma coisa, por mais que pareça um objetivo inatingível, basta nos dedicarmos muito que iremos conseguir.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. **Guilherme Martins Gelfuso** por toda competência e paciência para me orientar, me dando a oportunidade de me aprofundar na área farmacêutica que eu sempre desejei e iniciar minha carreira acadêmica. Muito obrigada pela confiança, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos. Graças a professores como você, com perfeccionismo e ética, que continuo acreditando e querendo contribuir com a educação.

Ao **Breno**, meu querido colega de laboratório, que me ajudou desde os primeiros dias, me apresentando o mundo farmacêutico. Nós, mais do que ninguém, sabemos o quão difícil foi esta etapa das nossas vidas, mas você tornou meus dias mais alegres na bancada do laboratório. Muito obrigado pela disponibilidade em me ajudar, por sempre me ouvir e respeitar minhas opiniões. Tenho certeza que você foi o melhor parceiro de mestrado que eu poderia ter.

Ao **Kim Mileski** por todo companheirismo, amor, carinho, conversas e incentivo. Muito obrigado por cuidar de mim, se preocupar com o meu bem estar e fazer com que eu seja, acima de tudo, feliz. Com o seu caráter e sua ética, você tem o dom de iluminar todos que estão ao seu redor. Você foi fundamental neste processo de crescimento e amadurecimento e agradeço muito a Deus por você fazer parte da minha vida.

Aos **meus pais, Ricardo Luiz de Figueiredo Reis e Maria da Gloria Avila Reis**, por toda dedicação durante toda minha vida. Vocês sempre priorizaram minha educação, abdicando suas próprias vontades. Muito obrigada pela compreensão nos momentos de estresse, por me ensinarem a ser ética, a ter responsabilidades, a lutar pelos meus objetivos, por me apoiar em todas as minhas decisões e por me amar incondicionalmente. Este trabalho é, sem dúvidas, um reconhecimento que todo esforço de vocês não foi em vão.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

REIS, T. A. **Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo fluconazol nanoencapsulado para o tratamento de candidíase vulvovaginal**. Brasília, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção causada por fungos da espécie *Candida sp.* Os tratamentos são comumente realizados através da administração oral, sendo o fluconazol (FLU) o mais utilizado. Notadamente, a via de administração tópica é mais vantajosa que a oral, por reduzir os efeitos adversos sistêmicos. No entanto, as formulações convencionais proporcionam a absorção incompleta ou em baixas concentrações do fármaco, comprometendo o sucesso deste tipo de terapia. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação contendo nanopartículas de quitosana (NP-QS) encapsulando o FLU (NP-FLU) e avaliar a capacidade dessa formulação em aderir-se à mucosa e sustentar a liberação do fármaco para esse tecido. Métodos analíticos para doseamento do FLU em solução ou extraído da mucosa utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram validados. A solubilidade do FLU em meio aquoso foi determinada como sendo igual a 5,8 mg/mL em temperatura ambiente. As NP-QS e NP-FLU foram obtidas utilizando a técnica de geleificação ionotrópica e caracterizadas pelo tamanho, índice de polidispersividade (IPD), potencial zeta e morfologia. As NP-QS apresentaram forma esférica, tamanho de $271,72 \pm 59,46$ nm, IPD de $0,345 \pm 0,060$ e potencial zeta igual a $+46,16 \pm 6,72$ mV. As NP-FLU encapsularam 40% do fármaco e não diferiram significativamente ($p < 0,05$) das NP-QS quanto aos parâmetros de caracterização. As NP-FLU apresentaram estabilidade física durante 90 dias. A incubação das NP-FLU com NP de mucina e posterior análise de tamanho de partículas indicou que as NP-QS apresentam propriedades mucoadesivas. Os estudos de liberação e permeação *in vitro*, utilizando membrana de acetato e mucosa bucal de suínos, respectivamente, foram realizados em células de Franz comparando-se quatro formulações: uma solução de FLU (SOL-FLU), as NP-FLU, gel contendo FLU (G-FLU) e gel contendo as NP-FLU (G-NP-FLU). As formulações contendo as NP sustentaram pelo menos 2 vezes a liberação do FLU em comparação à SOL-FLU. Não foi possível quantificar o FLU que permeou a mucosa durante as 2 h de experimento a partir de nenhuma das formulações avaliadas. No entanto, o FLU penetrou a mucosa a partir da formulação NP-FLU em quantidade 1,5 vezes menor se comparado à SOL-FLU. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas quantidades recuperadas da mucosa a partir das NP-FLU e G-NP-FLU, indicando que as NP conseguem sustentar melhor a liberação de FLU para a mucosa do que o gel somente. A formulação desenvolvida contendo NP-FLU, portanto, mostrou-se capaz de (i) permanecer por mais tempo em contato com a mucosa e (ii) promover a liberação sustentada do FLU para a mucosa, mostrando-se como uma alternativa eficiente para o tratamento tópico da CVV.

Palavras-chave: Nanopartículas, Quitosana, Fluconazol, Candidíase, Liberação Tópica.

REIS, T. A. **Development of a topical formulation with cationic nanoparticles encapsulating fluconazole for improving the topical treatment of vulvovaginal candidiasis.** Brasília, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection attributed to an overgrowth of *Candida* species, mainly *C. albicans*. The treatments are often carried out by the oral administration, like fluconazole (FLU). It is known that topical treatment is more advantageous than oral, because it reduces systemic side effects. However, conventional formulations provide incomplete or low concentrations of drug into the mucous, reducing the success of this kind of therapy. The purpose of this work was to develop and characterize a hydrophilic formulation containing chitosan nanoparticles (CS-NP) loading FLU (FLU-NP) and evaluate its ability to adhere to mucous and sustain drug delivery to this tissue. Analytical HPLC methods were properly validated for determination and recovery of FLU from mucous. FLU solubility was determined as being 5.8 mg/mL at room temperature. CS-NP and FLU-NP were prepared by the ionotropic gelation technique and characterized according to their size, polydispersity index (PDI), zeta potential and morphology. CS-NP presented spherical shape, 271.72 ± 59.46 nm of size, PDI equal to 0.345 ± 0.060 , zeta potential of $+46.16 \pm 6.72$ mV and were physically stable for 90 days. FLU-NP were very similar to CS-NP, with encapsulation efficiency of 40%. FLU-NP incubation with mucine NP following by particle size determination indicated they possess mucoadhesive properties. Release and permeation studies were carried out *in vitro* in diffusion Franz cells using cellulose acetate membrane and porcine mucous respectively, from four different formulations: a FLU solution (FLU-SOL), FLU-NP, a FLU gel (FLU-G) and a gel containing the FLU-NP (G-FLU-NP). All the tested formulations sustained at least 2-fold FLU release in comparison to the FLU-SOL. FLU did not permeate the mucous membrane in detectable amounts during the 2 h of experiments from any evaluated formulations. However, FLU penetrated the mucous membrane in amount 1.5-fold less from the FLU-NP formulation if compared with FLU-SOL. There was no significant quantities recovered from the mucous membrane from FLU-NP and G-FLU-NP, indicating that the NP are able to sustain FLU delivery to the mucous membrane, better than the formulation FLU-G. In conclusion, the developed formulation containing NP was capable of (i) remaining for longer periods in contact to the mucous membrane and (ii) performing a sustained delivery of FLU to the mucous membrane, indicating to be efficient for the treatment of VVC.

Keywords: Nanoparticles, Chitosan, Fluconazole, Candidiasis, Topical Delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Candida albicans</i> : (A) Esquema da micromorfologia do fungo (adaptado de LACAZ, 1980); (B) Microscopia do fungo da cepa ATCC 10231 (adaptado de TAMBE, 2005); (C) Cultivo de <i>Candida albicans</i> da cepa ATCC 10231	5
Figura 2 – Estrutura química do FLU (MM = 306,27 Da).....	7
Figura 3 – Representação e comparação da liberação controlada de um fármaco contido em um gel convencional e em NP (adaptado de ENSIGN et al., 2012)	9
Figura 4 – Representação do panorama referente ao início da nanotecnologia e a prospectiva de crescimento (VENTURA-LIMA, 2013)	10
Figura 5 – Representação das NP poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo da nanocápsula; b) fármaco retido na membrana polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco distribuído uniformemente pela matriz polimérica (adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003)	12
Figura 6 – Estrutura química da QS	13
Figura 7 – Mucosa bucal de suínos: (A) mucosa retirada do suíno após o abate do animal e antes do processo de escalda; (B) mucosa de suíno limpa; (C) mucosa de suíno – parte interna com o lado anteriormente ligado aos tecidos musculares e gordura	14
Figura 8 – Mucosas contaminadas com FLU imersas em 5,0 mL de uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1 v/v) para avaliação da recuperação do fármaco	18
Figura 9 – Esquema ilustrando a formação das NP-QS com FLU pelo método de geleificação ionotrópica (adaptada de CALVO et al., 1997)	20
Figura 10 – Foto de uma célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização de testes <i>in vitro</i> de liberação de FLU através de membrana de acetato de celulose	23
Figura 11 – Foto de uma célula de difusão do tipo Franz modificada montada para a realização de estudos <i>in vitro</i> de permeação de FLU através da mucosa bucal de suínos .	24
Figura 12 – Mucosa de suínos: (A) área difusional esférica a ser cortada após o experimento <i>in vitro</i> de permeação; (B) mucosa cortada e imersa em 5 mL de solução de água Milli-Q:metanol 1:1 (v/v)	25
Figura 13 – Espectro de absorção em UV/Vis de uma solução aquosa de FLU a 100 µg/mL. Varredura realizada entre os comprimentos de onda 190 e 700 nm.....	26
Figura 14 – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra controle contendo somente o solvente água Milli-Q:metanol (1:1, v/v)	27
Figura 15 – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra de FLU com concentração igual a 2,0 µg/mL diluída em água Milli-Q:metanol (1:1, v/v)	27
Figura 16 – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra controle, composta somente por tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4	28

- Figura 17** – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra de FLU com concentração igual a 2,0 µg/mL diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 28
- Figura 18** – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra de homogenato de mucosa filtrada, diluída em águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v) .. 28
- Figura 19** – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente à injeção de uma solução de QS diluída em águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v) 29
- Figura 20** – Curva analítica obtida pela análise do FLU por CLAE, utilizando como solvente uma mistura de águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v), comprovando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 51311x - 2513,9$ e $R = 0,999$ 29
- Figura 21** – Curva analítica obtida pela análise do FLU por CLAE, utilizando como solvente tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, confirmando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 48250x + 1259$ e $R = 0,999$ 30
- Figura 22** – Preparo das NP-QS antes (A) e após (B) a adição da solução de TPP à 1,0 mg/mL evidenciadas pela turvação da solução 34
- Figura 23** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM-7001F) das NP-QS com imagem aumentada 1700 vezes (A) e 40000 vezes (B), confirmando o tamanho aproximado de 250 a 300 nm 36
- Figura 24** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM-7001F) das NP-FLU com aumento de 800 vezes (A) e 3500 vezes (B) 39
- Figura 25** – Distribuição de tamanho hidrodinâmico obtidos no Zetasizer Nano Series referente às amostras de NP-FLU, NP-MCN e NP-FLU + NP-MCN 40
- Figura 26** – Fotografia demonstrando o aspecto dos géis de carbopol formados pela adição de 0,5% (A), 1,0% (B) e 1,5% (C) (m/v) à suspensão de NP-FLU..... 41
- Figura 27** – Perfil de liberação *in vitro* do FLU através de membrana de acetato de celulose a partir de quatro formulações: SOL-FLU, NP-FLU, G-FLU e G-NP-FLU. Todas as formulações com concentração de FLU igual a 1,75 µg/mL e pH 4,5. O símbolo * representa o momento em que se inicia uma diferença estatística significativa entre as suspensões ($p < 0,05$). Cada valor corresponde a média \pm desvio padrão de cinco replicatas ($n = 5$) 43
- Figura 28** – FLU recuperado da mucosa suína após 2 h de experimento de permeação *in vitro* a partir de quatro formulações: SOL-FLU, NP-FLU, G-FLU e G-NP-FLU. Todas as formulações continham concentração de FLU igual a 1,75 mg/mL ($n = 5$), pH 4,5. O símbolo * representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de precisão e exatidão intra- e inter-dia para validação de método analítico por CLAE para o FLU utilizando como solvente uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v)	30
Tabela 2 – Parâmetros de precisão e exatidão intra- e inter-dia para validação de método analítico por CLAE para o FLU utilizando como solvente tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4	31
Tabela 3 – Dados para determinação do limite de quantificação do método analítico por CLAE para o FLU, utilizando como solvente uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v)	31
Tabela 4 – Dados para determinação do limite de quantificação do método analítico por CLAE para o FLU, utilizando como solvente um tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4	32
Tabela 5 – Porcentagem de recuperação do FLU da mucosa bucal de suínos utilizando água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) como solvente extrator (n = 3).....	32
Tabela 6 – Concentração de FLU obtida após filtração das dispersões aquosas do fármaco em diferentes concentrações, a temperatura de 30°C (n = 3)..	33
Tabela 7 – Análise da formação das NP-QS utilizando diferentes proporções (v:v) das soluções de QS e TPP com concentração igual a 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente..	35
Tabela 8 – Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-QS preparadas com concentração de QS e TPP igual a 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente, utilizando a proporção volumétrica de 5:2 (v/v) das soluções de QS e TPP (n = 5)	35
Tabela 9 – Estabilidade de uma amostra de NP-QS utilizando a proporção de QS:TPP 5:2 (v/v), concentrações iniciais de 1,75 mg/mL de QS e 1,0 mg/mL de TPP (n = 3).....	37
Tabela 10 – Comparação entre as EE das NP-FLU preparadas com diferentes proporções de QS:FLU (m/m) (n = 5).....	38
Tabela 11 – Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-FLU obtidas com a proporção de QS:FLU 1:1 (m/m) (n = 12).....	39
Tabela 12 – Comparação entre o tamanho médio e IPD das NP-FLU e NP-MCN e depois de misturadas em proporção 1:1 (v/v) (n = 3)	40

LISTA DE ABREVIATURASE SIGLAS

(m/m)	massa/massa
(m/v)	massa/volume
(v/v)	volume/volume
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
CVV	candidíase vulvovaginal
CVVR	candidíase vulvovaginal recorrente
EE	eficiência de encapsulação
FLU	fluconazol
G-NP-FLU	gel das nanopartículas de quitosana com fluconazol encapsulado
G-FLU	gel da solução de fluconazol
LQ	limite de quantificação
MCN	mucina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MM	massa molecular
CMI	concentração mínima inibitória
NP	nanopartículas
NP-FLU	nanopartículas de quitosana com fluconazol nanoencapsulado
NP-MCN	nanopartículas de mucina
NP-QS	nanopartículas de quitosana
IPD	índice de polidispersão
QS	quitosana
R	coeficiente de correlação linear
SOL-FLU	solução aquosa de fluconazol
TPP	tripolifosfato
UV/VIS	ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Revisão da literatura	4
3.1. Candidíase Vulvovaginal	4
3.2. Tratamentos para a CVV	6
3.3. Liberação de fármacos na mucosa vaginal	8
3.4. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de medicamentos	9
3.4.1. Contexto histórico da nanotecnologia	9
3.4.2. NP poliméricas	11
4. Material e Métodos	14
4.1. Material	14
4.1.1. Mucosa	14
4.2. Métodos	15
4.2.1. Padronização de métodos analíticos para quantificação do FLU por CLAE com detecção no ultravioleta (UV)	15
4.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do FLU	15
4.2.1.2. Condições cromatográficas para quantificação do FLU por CLAE.....	15
4.2.1.3. Validação dos métodos analíticos.....	15
4.3. Determinação do coeficiente de solubilidade	18
4.4. Obtenção de NP	19
4.4.1. Obtenção NP-FLU.....	19
4.5. Caracterização das NP	20
4.5.1. Tamanho de Partícula e Potencial Zeta	20
4.5.2. Morfologia das NP	20
4.5.3. Estabilidade da suspensão de NP	21
4.5.4. Eficiência de encapsulação.....	21
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial mucoadesivo das NP	21
4.6.1. Preparo das NP-MCN.....	21
4.6.2. Capacidade mucoadesiva das NP-QS frente às NP-MCN	22
4.7. Obtenção de formulações hidrofílicas de NP-FLU encapsulado	22

4.8. Estudos <i>in vitro</i> de liberação do FLU a partir das formulações desenvolvidas	22
4.9. Estudos <i>in vitro</i> de permeação de FLU através da mucosa de suínos	24
4.10. Análises estatísticas	25
5. Resultados e Discussão	26
5.1. Validação de métodos analíticos para quantificação de FLU por CLAE	26
5.1.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção para o FLU por espectrofotometria.....	26
5.1.2. Validação dos métodos analíticos	26
5.2. Determinação do coeficiente de solubilidade em meio aquoso	33
5.3. Obtenção e caracterização das NP-QS.....	34
5.3.1. Tamanho de partículas e Potencial Zeta.....	34
5.3.2. Morfologia das NP-QS.....	36
5.3.3. Estabilidade da suspensão aquosa de NP-QS.....	37
5.3.4. Eficiência de encapsulação.....	37
5.3.5. Morfologia das NP-FLU	39
5.4. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial mucoadesivo das NP-FLU.....	39
5.5. Obtenção de formulações hidrofílicas com as NP-FLU	41
5.6. Estudos <i>in vitro</i> de liberação do FLU a partir da formulação desenvolvida.....	41
5.7. Estudos <i>in vitro</i> de permeação de FLU através da mucosa de suínos	44
6. Conclusão	47
6.1. Resultados parciais	47
7. Perspectivas futuras	48
7.1. Atividade antifúngica.....	48
7.2. Estudos <i>in vivo</i>	48
8. Referências Bibliográficas	49
9. Anexos.....	58

1. Introdução

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença com alta incidência clínica, cujos agentes etiológicos são fungos do gênero *Candida sp*, principalmente os da espécie *C. albicans*. Ela é caracterizada pelo corrimento vaginal de um fluido esbranquiçado, com odor desagradável, acompanhado de coceiras locais, eritemas, inchaço, escoriações e desconforto, que causa incômodo à paciente para exercer suas atividades rotineiras, seja ela de trabalho ou lazer, além de comprometer sua vida sexual (FAN e LIU, 2010; KENNEDY e SOBEL, 2010; HURLEY, 1979; NYIRJESY, 2008). Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres terão pelo menos um episódio de CVV até os 25 anos de idade (RAD et al., 2012). Além disso, muitas mulheres apresentam quadros recorrentes de CVV. A candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) é caracterizada por, no mínimo, quatro episódios de CVV durante o período de um ano (RODRIGUES, 2003). Os estudos sobre as causas dessa recorrência ainda mostram-se inconclusivos, mas acredita-se que esteja relacionado a não eliminação completa do fungo da região vaginal.

Os antifúngicos utilizados no tratamento da CVV pertencem ao grupo azol, sendo o fluconazol (FLU) o mais prescrito para este fim por ser estável e apresentar baixa toxicidade (SODHI et al., 2003; FAN e LIU, 2010; MARTINS et al., 2012). Existem no mercado diversas formulações de uso tópico e oral para tratar a CVV e a prescrição varia de acordo com o grau da infecção e recorrência da vaginite.

Na administração de fármacos, a via tópica apresenta várias vantagens em relação à via oral, como a utilização de menores doses do fármaco, com consequente diminuição da toxicidade e a eliminação dos efeitos colaterais provocados pela administração sistêmica. No caso do FLU, seriam evitados efeitos colaterais gastrointestinais, hepáticos, dores de cabeça e tonturas (SEKHAVAT et al., 2011; MEDLEY, 2012). No entanto, o baixo tempo de residência das formulações convencionais em contato com a mucosa vaginal dificulta a absorção do fármaco nesse tecido, muitas vezes comprometendo a efetividade do tratamento e requerendo da paciente o incômodo da reaplicação do produto diversas vezes.

Várias alternativas vêm sendo estudadas para aperfeiçoar tratamentos através da via tópica, proporcionando uma liberação controlada de fármacos e hormônios na mucosa vaginal (BAUM et al., 2012; NAKAYAMA et al., 2009). A utilização de nanopartículas (NP) de quitosana (QS) como carreadores de fármaco apresenta-se como uma opção viável ao tratamento de CVV. Este polímero apresenta propriedades mucoadesivas, excelente

biodegradabilidade, biocompatibilidade (NAGPAL et al., 2010) e baixa toxicidade. As formulações preparadas com QS (NP-QS) deverão permanecer aderidas à mucosa vaginal por mais tempo, liberando o antifúngico FLU gradualmente para esse tecido. Além disso, estudos comprovam que a QS possui propriedades antifúngicas (ING et al., 2012), podendo agir de maneira sinérgica ao fármaco no combate à vaginite.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo a elaboração e caracterização de uma formulação inovadora contendo NP-QS para carrear o fármaco FLU. Busca-se um sistema que seja capaz de (i) sustentar a liberação do fármaco e (ii) aumentar o tempo de residência da formulação em contato com a mucosa, o que deve garantir melhor eficiência do tratamento local da CVV.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação tópica contendo NP-QS carreando o FLU, capaz de se aderir à mucosa vaginal e de sustentar a liberação do fármaco neste tecido, tornando mais eficiente o tratamento tópico para a candidíase fúngica.

Objetivos específicos do trabalho:

- Padronizar e validar os métodos analíticos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para doseamento do FLU nos sistemas desenvolvidos;
- Determinar o coeficiente de solubilidade do FLU;
- Obter NP-QS para carrear o FLU;
- Obter NP-QS com FLU encapsulado (NP-FLU);
- Caracterizar as NP-QS e NP-FLU quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia, estabilidade física e eficiência de encapsulação (EE);
- Obter uma formulação na forma de gel contendo as NP-FLU;
- Avaliar as propriedades mucoadesivas das NP-FLU frente às NP de mucina (NP-MCN);
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do FLU nanoencapsulado;
- Avaliar a estabilidade do FLU em contato com mucosa de suínos;
- Determinar o perfil de permeação *in vitro* do FLU nanoencapsulado através da mucosa de suínos

3. Revisão da literatura

3.1. Candidíase Vulvovaginal

A CVV é uma doença infecciosa de origem fúngica, causada por fungos da espécie *Candida sp.* De acordo com HOLANDA et al. (2007), a CVV pode ser considerada uma doença de saúde pública por sua alta incidência, que pode atingir até 75% das mulheres. Entretanto, sabe-se que de 25% a 50% das pessoas saudáveis apresentam esse fungo em diferentes regiões do corpo como boca, intestino e/ou vagina (DRAKE e MAIBACH, 1974), orofaringe, dobras de pele, bem como pode ser detectado em secreção brônquica, urina e fezes (NYIRJESY, 2008; ROSA e RUMEL, 2004). Além disso, o fungo já foi isolado do solo, de vegetais em decomposição, de águas poluídas e areia de praia (PURCHIO, 1978). Os sinais mais comuns da CVV são corrimentos vaginais esbranquiçados, inchaço, vermelhidão e coceiras intensas e, muitas vezes, um diagnóstico precipitado ou errôneo é realizado baseado apenas na presença desses sinais, sem um exame citológico para confirmação (NYIRJESY, 2008; RAD et al., 2012).

A *Candida sp.* é um fungo oportunista e alguns fatores desencadeadores são necessários para que ocorra a manifestação e proliferação da doença. Esses fatores incluem relações sexuais sem preservativos, gravidez, ingestão de anticoncepcionais com alta dose de estrogênio, diabetes, disfunções da tireóide, obesidade, uso de dispositivos intrauterinos (DIU), má nutrição, anemia, corticoterapia, quimioterapia, infecções crônicas, uso de antibióticos, doenças imunológicas e imunodeficiências (DRAKE e MAIBACH, 1974; NYIRJESY, 2008; SOBEL, 2007). Alguns autores afirmam que a região geográfica e o clima também podem desencadear a doença, pois ela ocorre com maior incidência em países de clima quente e úmido, condições que são ideais para desenvolvimento do fungo (HOLANDA et al., 2007; KENNEDY e SOBEL, 2010).

Os agentes etiológicos da CVV são fungos de várias espécies do gênero *Candida sp.*, sendo a *C. albicans* a espécie mais comum (HURLEY e LOUVOIS, 1979; KENNEDY e SOBEL, 2010; RAD et al., 2012). No entanto, alguns estudos mostram que a incidência de casos com outras espécies, denominadas de *Candida não albicans*, como, por exemplo, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, estão aumentando com o passar dos anos por motivos ainda desconhecidos (KENNEDY e SOBEL, 2010; NYIRJESY, 2008; RAD et al., 2012; ROSA e RUMEL, 2004). A espécie *C. glabrata*, por exemplo, é a segunda espécie mais comum a

causar a CVV, de maior incidência em mulheres mais maduras, e mais resistente aos tratamentos convencionais que as outras espécies de *Candida sp* (RAD et al., 2012).

A *Candida albicans* caracteriza-se por apresentar grande quantidade de clamidosporos (filamentos formadores do aparelho vegetativo dos fungos) esféricos, terminais e blastosporos ovóides ou globosos (Figura 1) (MAC DONALD e WEGNER, 1962), estruturas responsáveis pela infecção e penetração do fungo (TASCHDJIAN et al., 1960). A espécie cresce com a presença das vitaminas biotina e tiamina (VAN UDEN e BUCKLEY, 1970) e com uma dieta rica em carboidratos (MARTINS, 1980; MURILLO DE LINARES e MARIN, 1978), pois esta levedura assimila o açúcar como única fonte de carbono para o seu crescimento.

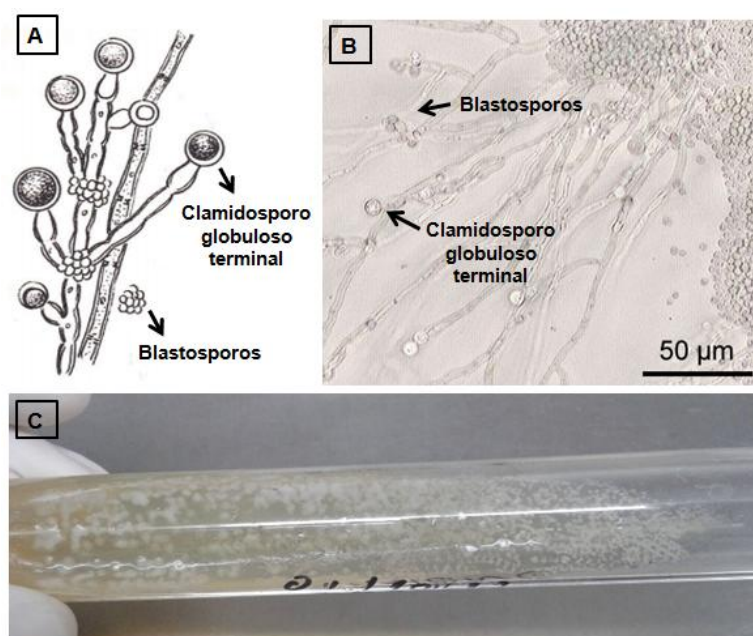


Figura 1 – *Candida albicans*: (A) Esquema da micromorfologia do fungo (adaptado de LACAZ, 1980); (B) Microscopia do fungo da cepa ATCC 10231 (adaptado de TAMBE, 2005); (C) Cultivo de *Candida albicans* da cepa ATCC 10231.

A virulência da espécie está relacionada a sua capacidade em modificar-se nos tecidos, dificultando a ação das células fagocitárias residentes (GOLDSTEIN et al., 1965). Após a invasão tecidual, o crescimento do fungo passa a ser predominantemente filamentososo e surgem, a partir daí, as manifestações clínicas (KOZINN e TASCHDJIAN, 1962; VAN HUDEN, 1960). Apesar da *Candida albicans* desenvolver-se melhor entre a faixa de pH de 5,0 até 6,4 (JOHNSON, 1954), sabe-se que no pH vaginal normal, que é de 3,5 a 4,5, ela consegue manter seu crescimento sem gerar alterações no pH (BEREK e

NOVAK, 2008). A mucosa vaginal propicia, portanto, condições ideais de umidade e temperatura para a proliferação desse fungo, independente de sua faixa de pH ideal, o que ajuda a explicar a recorrência dos quadros de CVV.

A CVV é classificada como recorrente (CVVR) quando mulheres apresentam esse diagnóstico, no mínimo, quatro vezes em um ano (NYIRJESY, 2008; RAD et al., 2012). Os fatores que ocasionam a CVVR ainda estão em estudo e não está claro se elas ocorrem devido a uma pré-disposição genética ou ao tratamento incompleto. Em ambos os casos, o tratamento torna-se diferenciado e mais intenso (NYIRJESY, 2008).

3.2. Tratamentos para a CVV

O tratamento utilizado para a CVV é prescrito segundo a intensidade da doença fúngica e do seu grau de recorrência. Nos anos 80, os tratamentos tópicos eram realizados com fungicidina, clordantoína, miconazol, clotrimazol, cortisona (apenas para aliviar prurido e irritação vulvar) e, o mais comum, violeta de genciana (SALVATORE, 1980) – que foi substituído pelos derivados imidazólicos devido à ação irritante e a cor que as lesões tratadas assumiam (LACAZ, 1977).

Atualmente, os fármacos para tratamento da CVV dividem-se em dois grupos: agentes polienos e agentes azólicos. No grupo dos polienos, encontra-se a nistatina, prescrita desde 1970 (BARLOW et al., 1970). No entanto, tem-se observado que a sua susceptibilidade à dose-dependência pode comprometer a eficácia da terapia (FAN e LIU, 2010; MARTINS et al., 2012). Os fármacos mais utilizados para o tratamento da CVV pertencem ao grupo azol, com destaque para o FLU e o cetaconazol de uso oral, e o clotrimazol e o miconazol de uso tópico (NYIRJESY, 2008).

Os antifúngicos do grupo azol agem inibindo o citocromo P450 fúngico, que atua como uma oxidase na síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana citoplasmática dos fungos. O FLU (Figura 2) é um agente antifúngico pertencente à subclasse dos triazóis e é utilizado para tratamento de diversas micoses. Ele oferece vantagens clínicas e microbiológicas, possui um bom perfil de segurança, baixa toxicidade, baixa massa molecular (MM 306,27 Da) e características hidrossolúveis (FRONTLING, 1988). Ademais, quando solubilizado em meio ácido, o FLU encontra-se não ionizado devido ao seu valor de pKa igual a 2,0, permitindo assim sua absorção no intestino

(ANSEL et al., 2007). Por essas razões, o FLU tem sido o agente antifúngico mais utilizado no combate à CVV (SEKHAVAT et al., 2011).

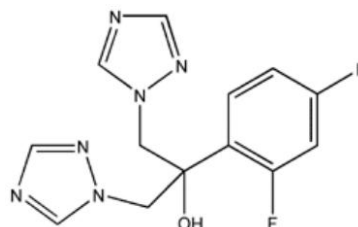


Figura 2 – Estrutura química do FLU (MM = 306,27 Da).

A concentração inibitória mínima (CMI₉₀) do FLU, ou seja, a concentração de FLU que inibe o crescimento de 90% de espécies de *Candida* é alcançada entre 72 ha 96 h, em tecido vaginal. Após a administração oral de uma única dose de 150 mg do fármaco, a concentração permanece alta por no mínimo três dias (SEKHAVAT et al., 2011).

O FLU vem sendo utilizado somente através da via de administração oral já que sua ação tópica deve ser prejudicada por sua hidrossolubilidade. Apesar de ser considerado levemente solúvel (AULTON, 2005), a sua interação com a mucosa vaginal (de características lipofílicas) é dificultada, impedindo que o fármaco atinja o tecido em concentrações adequadas para desempenhar sua ação. Desta forma, as formulações tópicas disponíveis atualmente no mercado nacional para tratamento da CVV não incluem em sua composição o FLU.

SEKHAVAT et al. (2011) compararam a eficácia dos tratamentos tópico e oral da CVV, avaliando 70 pacientes que receberam 200 mg de clotrimazol intravaginal diariamente durante sete dias e 72 pacientes que receberam 150 mg de FLU em dose única por via oral. Após um mês, e com acompanhamento regular, 17 pacientes do primeiro grupo ainda possuíam os sintomas da CVV, contra apenas um paciente do segundo grupo. Este estudo mostra a eficiência do fármaco FLU e, ao mesmo tempo, indica que novas estratégias devem ser estudadas para melhorar a eficácia do tratamento tópico da doença.

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. O efeito tóxico da alta dose administrada sistemicamente também deve ser levado em consideração, principalmente quando consideradas as altas taxas de CVVR. 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).

3.3. Liberação de fármacos na mucosa vaginal

Dentre as várias abordagens farmacotécnicas com o objetivo de controlar a liberação de fármacos na mucosa vaginal, muitas ainda em fases de estudo, estão a utilização de comprimidos antifúngicos mucoadesivos (HOMBACH et al., 2008; KARASULU et al., 2004), óvulos para liberação vaginal de antifúngicos e hormônios (DELLENBACH et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2009), géis com matrizes poliméricas para tratamento de infecções fúngicas, fármacos antivirais no combate ao HIV (DANG et al., 2012; KARIMUNNISA e ATMARAM, 2012; LI et al., 2012), matriz sólida para liberação de agentes antivirais no combate ao HIV (GUNASEELAN et al., 2012) e anéis vaginais para prevenção de doenças sexualmente transmissíveis ou como forma contraceptiva (BAUM et al., 2012; HAN et al., 2007; NUVARING, 2012; SAXENA et al., 2009).

A mucosa vaginal é composta por um epitélio escamoso estratificado não-queratinizado e possui um padrão característico de cristais e sulcos transversais (BEREK e NOVAK, 2008). Dentre as diversas secreções produzidas na vagina está o muco cervical, que é uma substância gelatinosa composta por água, açúcares, enzimas e glicoproteínas (MARRIOTT e GREGORY, 1990; UNIFESP, 2014). A mucina (MCN) é a principal glicoproteína e corresponde a 90% de todo muco cervical. Ela confere propriedades viscoelásticas ao muco e contribui para que o residual de cargas presente na mucosa seja negativo, devido a ionização de resíduos sulfatados em baixos pHs e a presença do ácido sálico. Essa carga negativa do muco contribui para que ocorra uma série de ligações de hidrogênio e outras interações eletrostáticas entre ele e os excipientes farmacêuticos (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005; PEPPAS e SALLIN, 1996).

As características da mucosa vaginal aliadas ao potencial da nanotecnologia são uma alternativa para melhoria do tratamento tópico de infecções locais promovendo a liberação controlada de fármacos para este tecido (Figura 4). Apesar de pouco explorada para tratamentos vaginais, alguns estudos já mostram a eficiência da nanotecnologia para

esse fim (ENSIGN et al., 2012; MALLIPEDDI e ROHAN, 2010). Recentemente, GUPTA e VYAS (2012) prepararam NP lipídicas sólidas para encapsular o FLU e verificaram que o tratamento terapêutico tópico com as NP conseguiu eliminar eficientemente o fungo *Candida albicans* inoculado em ratos. No entanto, o uso de NP poliméricas com propriedades mucoadesivas poderia aumentar o tempo de residência dessas nanoestruturas na mucosa. A interação entre a mucosa e as NP reduziria o número de aplicação de doses do medicamento e aumentaria a comodidade deste tipo de tratamento para o paciente. A Figura 3 resume de maneira esquemática a proposta deste trabalho, que utiliza NP poliméricas para promover a liberação mais sustentada de um agente antifúngico na mucosa vaginal.

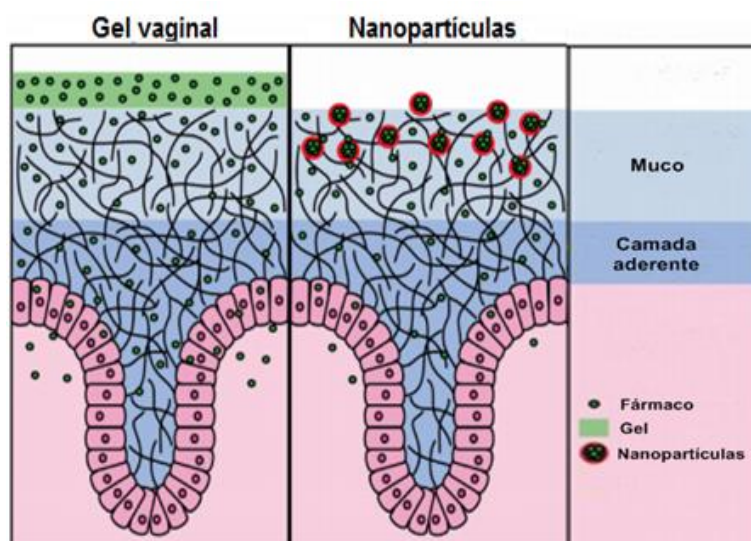


Figura 3 – Representação e comparação da liberação controlada de um fármaco contido em um gel convencional e em NP (adaptado de ENSIGN et al., 2012)

3.4. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de medicamentos

3.4.1. Contexto histórico da nanotecnologia

O conceito de nanociência surgiu com o físico Richard Feynman em dezembro de 1959, em uma palestra nomeada *There plenty of room at the bottom* (Há muito espaço lá dentro), no Instituto de Tecnologia da Califórnia durante a Reunião anual da Sociedade Americana de Física (DA SILVA, 2005). Devido à incredulidade e falta de recursos de

apoio a ciência, suas ideias e a manipulação dos átomos começaram a ser realizadas apenas nos anos 80, ganhando grande investimento na década de 1990.

De acordo com a Fundação Nacional da Ciência (2000), nanotecnologia pode ser definida como pesquisa e desenvolvimento de tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular, fornecendo informações para a compreensão dos fenômenos e materiais em nanoescala, criando e usando estruturas, dispositivos e sistemas com outras propriedades e funções devido ao seu tamanho diminuto. A escala de comprimento pode variar de 1 a 100 nm, sendo aceito valores maiores - entre 200 e 300 nm - quando há revestimento de polímeros, com as necessidades de cada pesquisador e do mercado consumidor.

O uso da nanotecnologia nos setores computacional, agrônomo, automotivo, em cosméticos e no tratamento do câncer está em ascensão. Entre os anos de 2005 e 2013, o número de produtos no mercado que oferecem algum tipo de nanotecnologia aumentou de 54 para 1628 (LOVELL, 2013). Com tal aumento, surgiram preocupações referentes a regulamentações e toxicidade dos diferentes tipos de NP (SHEUFELE et al., 2007), dando origem ao “Primeiro Congresso Internacional sobre Nanotoxicologia” (PRIESTLY, 2006). No Brasil, há o projeto de lei 5133/2013 (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2013) que visa regulamentar a rotulagem dos produtos que fazem uso da nanotecnologia, que tem seu crescimento previsto para as próximas décadas (Figura 4).

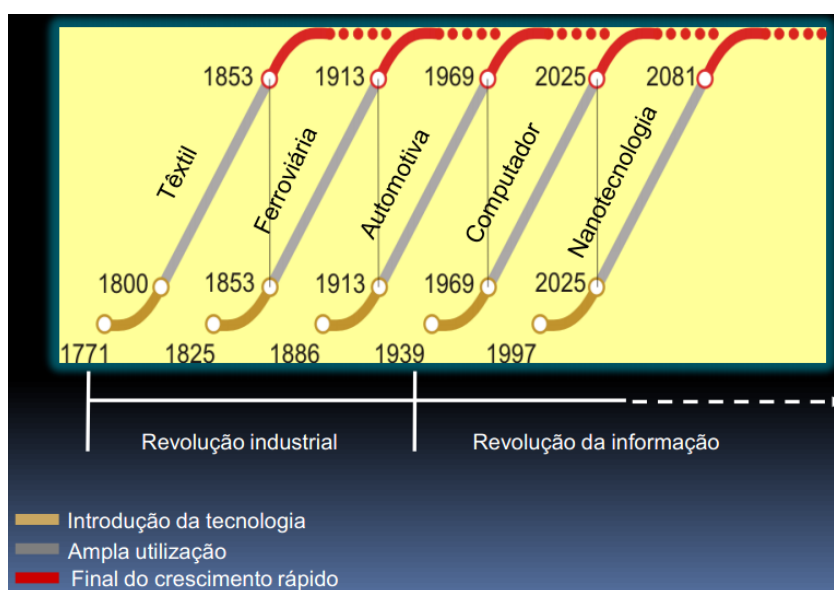


Figura 4 – Representação do panorama referente ao início da nanotecnologia e a prospectiva de crescimento (VENTURA-LIMA, 2013).

Dentre as inúmeras aplicações da nanotecnologia na área da saúde, os nanomateriais, que possuem tamanhos similares aos sistemas e moléculas biológicas, podem ser manipulados para adquirirem características e funções desejadas, tornando-os de grande interesse para fins médico-farmacêutico como carreadores de fármacos e para uso em diagnósticos (KIM et al., 2010).

3.4.2. NP poliméricas

Nas últimas décadas, o uso de micropartículas e NP estão em ascensão, sendo muito utilizadas em formulações tópicas para a liberação sustentada de fármacos (NAGPAL et al., 2010; RAJAN e RAJ, 2013). As NP podem ter diversas matrizes e serem produzidas por meio de diferentes métodos. As NP lipídicas sólidas, por exemplo, são facilmente administradas, possuem boa eficácia terapêutica, baixo custo, e possuem facilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (GUPTA e VYAS, 2012). As NP poliméricas, por outro lado, são mais rígidas e podem ter rápida ou baixa velocidade de bioerosão, dependendo das características do material que as compõem (GRATIERI et al., 2011). As características dos polímeros ou a possibilidade de incorporação de outros ligantes em sua superfície conferem propriedades especiais as NP. Os polímeros não-iônicos, por exemplo, são os mais biocompatíveis, enquanto os polímeros catiônicos apresentam importantes propriedades mucoadesivas (CALVO et al., 1997).

As NP poliméricas utilizadas para carrear fármacos podem ser divididas em dois grupos dependendo da sua composição e organização estrutural, como mostra a Figura 5. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico e o fármaco poderá estar presente no seu interior ou como componente deste invólucro. Em contrapartida, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica maciça e o fármaco poderá estar retido na superfície da matriz ou distribuído uniformemente por toda NP (SCHAFFAZICK et al., 2003). Se o fármaco estiver apenas na superfície da NP, ocorrerá uma liberação rápida e se estiver encapsulado, no interior da nanoestrutura, haverá uma liberação mais prolongada (GUPTA e VYAS, 2012).

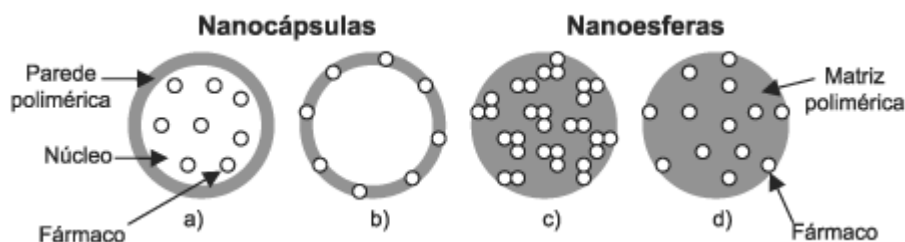


Figura 5 – Representação das NP poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo da nanocápsula; b) fármaco retido na membrana polimérica; c) fármaco retido na superfície da matriz polimérica; d) fármaco distribuído uniformemente pela matriz polimérica (adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).

As NP poliméricas podem ser obtidas por diversos métodos e técnicas de preparo como, por exemplo, emulsificação e evaporação de solvente, *salting out*, nanoprecipitação ou polimerização *in situ* (REIS et al., 2006). Outra técnica muito utilizada quando se trabalha com polímeros ionizáveis é a geleificação ionotrópica, em que um agente reticulante é adicionado ao polímero disperso em água, organizando a cadeia polimérica em NP, que encapsularão o fármaco dissolvido ou disperso no sistema (CALVO et al., 1997).

Dentre os principais polímeros utilizados para a obtenção de NP estão os PEO (óxidos de polietileno), PPO (óxidos de polipropileno), PLA (ácidos poliláticos) e PLGA (poli L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (CALVO et al., 1997). Desde 1971, os polímeros de PLGA são estudados para a obtenção de sistemas nanoparticulados, tornando-se uma das classes de polímeros com maior utilização por serem atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis (BRANNON-PEPPAS et al., 2004; GAVINI et al., 2004). Proteínas, peptídeos, vacinas e antígenos já foram encapsulados em NP de PLGA (KUMAR et al., 2004; SOPPIMATH et al., 2001), mas os monômeros ácidos liberados por esse co-polímero pode prejudicar a ação de alguns fármacos e biomoléculas encapsuladas (KUMAR et al., 2004). Para minimizar este tipo de inconveniente, outras substâncias poliméricas como alginato, QS, pectina (LIU et al., 2004), polivinilalcool (PATIL et al., 2004) e poliésteres (WANG et al., 2004) já foram utilizadas para revestir NP de PLGA.

A utilização da QS é uma alternativa viável aos polímeros de PLGA aniônicos. A QS (Figura 6) é formada a partir da desacetilação da quitina e o grau de desacetilação determinará a quantidade de grupos amina livres presentes no polímero (CRAVEIRO et al., 1999). Os grupos amina carregados positivamente, quando estão em contato com as paredes da mucosa – que são carregadas negativamente –, conferem propriedade

mucoadesiva à QS (LEHR et al., 1992; MAKHLOF et al., 2008). A mucoadesividade pode ser caracterizada como a adesão entre dois materiais, em que pelo menos um deles apresenta uma superfície mucosa. Assim sendo, a mucoadesão vaginal baseia-se na interação entre o polímero presente na formulação e a camada de MCN que reveste a superfície da mucosa vaginal (QI et al., 2007; SHAIKH et al., 2011). O polímero QS, em pH ácido, apresenta residual de cargas positivo e se adere facilmente às superfícies com carga negativa, como a da MCN (EL KAMEL et al., 2002).

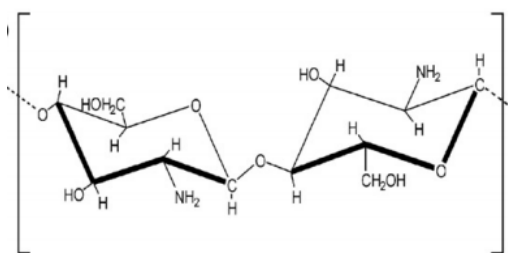


Figura 6 – Estrutura química da QS.

MODI e colaboradores (2013) encapsularam o antifúngico cetoconazol em NP-QS, que sustentaram em até 5h a liberação do fármaco quando comparadas a uma solução controle somente com o fármaco. A mucoadesividade da QS permite que os fármacos ligados a ela sejam liberados topicamente de forma prolongada, independente da forma farmacêutica, a qual pode ser encontrada na forma de comprimidos (SOGIAS et al., 2012), filmes (DE SANTANA et al., 2010; FULGÊNCIO et al., 2014) ou géis (CHAIYASAN et al., 2013).

De maneira adicional, a QS apresenta como vantagens a biodegradabilidade, biocompatibilidade, melhor estabilidade (NAGPAL et al., 2010), baixa toxicidade, com dose letal 50 correspondente a 1,33 g/dia/kg de peso corporal (ARAI et al., 1968) e propriedades antifúngicas (ZHONG et al., 2007; GUERRA-SÁNCHEZ et al., 2009; ZIANI et al., 2009; ING et al., 2012).

4. Material e Métodos

4.1. Material

O FLU (99% de pureza) utilizado foi doado pela Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Campinas, Brasil). Solventes como metanol e acetonitrila de grau para CLAE foram adquiridos da Tedia (Ohio, Estados Unidos). Ácido acético 99,9%, QS de baixo peso molecular, TPP e MCN tipo III foram obtidas da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As formulações hidrofílicas foram preparadas com carbopol e correções de pH foram realizadas com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). Para preparação do tampão fosfato 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 Cientific (Reino Unido).

4.1.1. Mucosa

A mucosa bucal de suínos foi gentilmente cedida pelo Frigorífico Bonasa (São Sebastião, Distrito Federal, Brasil). Os fragmentos de mucosa, que foram retirados imediatamente após o abate do animal e antes do processo de escalda para preservação das estruturas celulares, foram armazenados em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 e transportados sob refrigeração ao laboratório de pesquisa (Figura 7). Neste laboratório, foram limpas e mantidas hidratadas até sua montagem nas células de difusão.

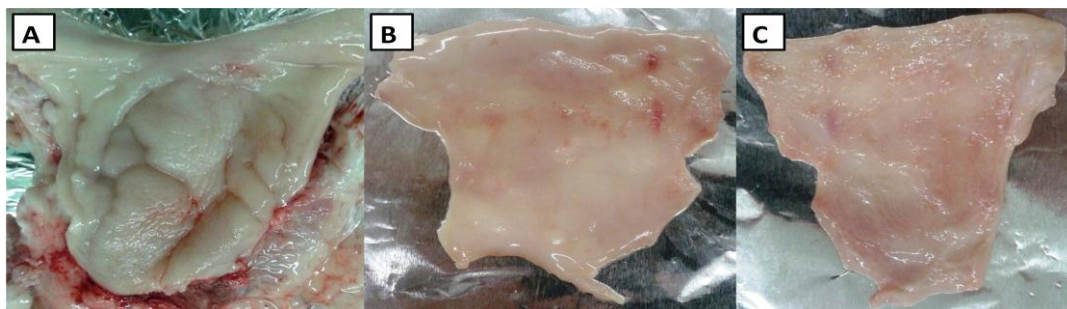


Figura 7 – Mucosa bucal de suínos: (A) mucosa retirada do suíno após o abate do animal e antes do processo de escalda; (B) mucosa de suíno limpa; (C) mucosa de suíno – parte interna com o lado anteriormente ligado aos tecidos musculares e gordura.

4.2. Métodos

4.2.1. Padronização de métodos analíticos para quantificação do FLU por CLAE com detecção no ultravioleta (UV)

Os métodos analíticos foram padronizados e validados por um único analista. Para doseamento do FLU através de CLAE composto por um conjunto de bombas modelo LC-20AT, injetor automático modelo SIL-20AHT, desgaseificador DGU-20A5R, unidade controladora modelo CBM-20A, forno modelo CTO-20A e detector de UV modelo SPDM-20A. O software utilizado para todas as análises foi o LC Solution. Todos os componentes são da marca Shimadzu (Tóquio, Japão).

4.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do FLU

Foram realizadas varreduras em espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800), entre 190nm e 700 nm, da solução estoque de FLU, preparada a uma concentração igual a 100 µg/mL em metanol, para se determinar o comprimento de onda de maior absorção do fármaco.

4.2.1.2. Condições cromatográficas para quantificação do FLU por CLAE

A dosagem do FLU foi realizada baseada no método proposto por GRATIERI, (2010) com modificações, utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) como fase estacionária, mantida a temperatura de 30°C e uma mistura de água Milli-Q:acetonitrila (80:20, v/v) como fase móvel, a uma vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de amostras igual a 50 µL e detecção no UV a 210 nm.

4.2.1.3. Validação dos métodos analíticos

Os métodos analíticos foram validados segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a Resolução 899/2003. Preparou-se soluções estoque de FLU com concentração igual a 100,0µg/mL utilizando como solvente

água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) no primeiro método e, no segundo método, tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. A partir destas foram feitas as diluições necessárias com os respectivos solventes para as análises. As validações dos métodos foram realizadas avaliando-se a linearidade, precisão e exatidão inter- e intra-dia, especificidade/seletividade e limite de quantificação (LQ). Em seguida, validou-se o processo de extração do FLU da mucosa suína.

a) Seletividade

A seletividade dos métodos representa a sua capacidade em dosar uma determinada substância mesmo na presença de outros compostos (ANVISA, 2003). Para tanto, foram injetadas no CLAE amostras do mesmo solvente de diluição do fármaco, ou seja, água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) e tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, contaminados com NP-QS e mucosa, na proporção de 1:1000, garantindo a seletividade do FLU na presença desses possíveis contaminantes.

b) Linearidade

A linearidade dos métodos propostos foram avaliadas por meio da construção de curvas analíticas utilizando como solventes de diluição água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) e solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. A partir das respectivas soluções estoque de FLU, obteve-se as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 µg/mL. Todas as concentrações, incluindo a própria solução estoque, foram analisadas em triplicata, através do valor do coeficiente de correlação linear (R) das curvas obtidas.

c) Precisão

A precisão, analisada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%), expressa a concordância entre vários resultados analíticos da mesma amostra e com a mesma concentração com análises inter- e intra-dia. A precisão foi verificada analisando as diluições de 0,5; 1,5 e 3,0 µg/mL e preparadas a partir das soluções estoque de FLU. Foram realizadas triplicatas de cada uma das três concentrações, totalizando nove resultados a serem analisados com cada solvente. Os resultados foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), calculado através da fórmula:

$$CV\% = \left(\frac{Desv.Padr\tilde{a}o}{Conc.M\acute{e}dia} \right) \times 100 \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 1}),$$

onde: *DesvPadr\~{a}o* representa a estimativa do desvio padr\~{a}o da m\~{e}dia dos resultados e *ConcM\~{e}dia* representa a m\~{e}dia das medidas em triplicata para cada concentra\c{c}\~{a}o analisada.

d) Exatid\~{a}o

A exatid\~{a}o representa o qu\~{a}o pr\~{o}ximo os resultados individuais das amostras analisadas est\~{a}o de um valor de refer\~{e}ncia. A exatid\~{a}o foi verificada da mesma forma que a precis\~{a}o e utilizou-se as mesmas concentra\c{c}\~{a}es j\~{a} descritas com an\~{a}lises inter- e intra-dia. Os resultados foram expressos em fun\c{c}\~{a}o da porcentagem do erro relativo (E%), de acordo com a f\~{o}rmula:

$$E\% = \left(\frac{Valor_{obtido} - Valor_{real}}{Valor_{real}} \right) \times 100 \quad (\text{Equa\c{c}\~{a}o 2}),$$

onde: *Valor_{obtido}* corresponde \~{a} concentra\c{c}\~{a}o obtida na an\~{a}lise e *Valor_{real}* corresponde \~{a} concentra\c{c}\~{a}o que deveria ser encontrada na an\~{a}lise.

e) Limite de quantifica\c{c}\~{a}o

O LQ foi determinado atrav\~{e}s da an\~{a}lise do FLU em \~{a}gua Milli-Q:metanol (1:1, v/v) nas concentra\c{c}\~{a}es de 0,01; 0,03, 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e em tamp\~{a}o fosfato 0,05 M, pH 7,4 nas concentra\c{c}\~{a}es de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. O valor do LQ foi definido como a menor concentra\c{c}\~{a}o com precis\~{a}o e exatid\~{a}o dentro dos par\~{a}metros aceit\~{a}veis, que permitem uma varia\c{c}\~{a}o m\~{a}xima de at\~{e} 5%.

f) Recupera\c{c}\~{a}o do f\~{a}rmaco

Inicialmente, foram extra\~{i}das \~{a}reas de aproximadamente 1,0 cm^2 de mucosa com aux\~{i}lio de uma tesoura e esses fragmentos foram colocados em tubo Falcon. As mucosas foram ent\~{a}o contaminadas com 50, 75 e 100 μL da solu\c{c}\~{a}o de FLU em metanol, correspondendo \~{a}s concentra\c{c}\~{a}es de 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Após a total evaporação do solvente, foram adicionados 5,0 mL de uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) (Figura 8). As mucosas ficaram imersas sob agitação por um período de 24 h para total extração do fármaco. O sobrenadante foi filtrado em membrana com porosidade de 0,45 µm e quantificado por CLAE. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração analisada.



Figura 8 – Mucosas contaminadas com FLU imersas em 5,0 mL de uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) para avaliação da recuperação do fármaco.

Os resultados foram expressos em função da porcentagem do valor de concentração recuperado (Recuperação%), de acordo com a fórmula:

$$\text{Recuperação\%} = \left(\frac{\text{Concentração}_{\text{obtida}}}{\text{Concentração}_{\text{real}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3}),$$

onde: $\text{Concentração}_{\text{obtida}}$ corresponde à concentração obtida na análise das mucosas e a $\text{Concentração}_{\text{real}}$ corresponde à concentração que foi determinada através da curva analítica.

4.3. Determinação do coeficiente de solubilidade

A solubilidade do FLU em água destilada foi determinada segundo a técnica proposta por OGISO et al. (1995). Foram preparadas três dispersões do fármaco em água destilada com concentrações de FLU igual a 4,0; 6,0 e 8,0 mg/mL, em triplicata para cada concentração. Essas dispersões foram mantidas sob agitação de 200 rpm, a temperatura de

30°C, durante 24 h. Após esse período, as dispersões foram filtradas em filtros com porosidade de 0,45 µm, acoplados a seringas e diluídas 2000 vezes para análise realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800), a 210 nm.

4.4. Obtenção de NP

As NP-QS foram obtidas por meio da técnica de geleificação ionotrópica, proposta por CALVO et al. (1997). A QS foi dissolvida em água Milli-Q, previamente acidificada com ácido acético. Corrigiu-se, então, o pH para 4,7 com 500 µL de uma solução de NaOH 2,0 M e adicionou-se o agente reticulante tripolifosfato de sódio (TPP) vagarosamente sobre a solução polimérica, sob agitação magnética constante, para formação das NP. As NP foram obtidas utilizando concentrações de 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL das soluções iniciais de QS e TPP, respectivamente. Foram analisadas diferentes proporções entre os volumes utilizados de QS/TPP (de 5:5 a 5:1, v/v). A concentração de ácido acético, para ambas as variações de concentração realizada, foi 1,75 vezes maior do que a concentração da solução de QS. A temperatura foi mantida a 30°C, a agitação magnética fixada em 2000 rpm.

4.4.1. Obtenção NP-FLU

A técnica utilizada para o processo de obtenção das NP-FLU foi similar ao descrito no item 4.4. No entanto, o fármaco só foi adicionado após a solubilização total da QS, ficando sob agitação magnética por, no mínimo, 6 h. O pH da suspensão foi ajustado para 4,7 com, aproximadamente, 500 µL de uma solução de NaOH 2,0 M (Figura 9) e adicionou-se então o agente reticulante.

Visando encontrar a melhor EE do fármaco, foram testadas as proporções entre QS/FLU (m/m) de 1:1/4; 1:1/2; 1:1 e 1:2.

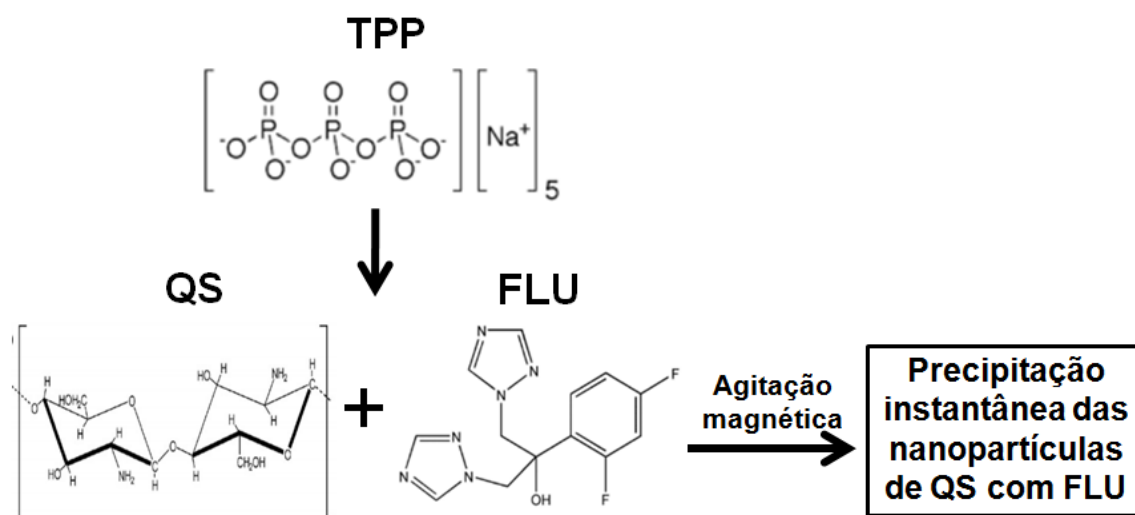


Figura 9 – Esquema ilustrando a formação das NP-QS com FLU pelo método de geleificação ionotrópica (adaptada de CALVO et al., 1997).

4.5. Caracterização das NP

4.5.1. Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico das NP-QS e NP-FLU, bem como seu índice de polidispersibilidade (IPD) e seu potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmica e mobilidade eletroforética, respectivamente, a partir de 1 mL das suspensões de partículas obtidas, utilizando um aparelho Zetasizer Nano Series (NANO ZS90, Malvern, Reino Unido).

4.5.2. Morfologia das NP

A morfologia das NP, bem como a visualização da distribuição de tamanho, foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL modelo JSM-7001F). Para isso, 10 μL da suspensão das NP-QS ou NP-FLU foram distribuídos uniformemente sobre uma lamínula limpa, seca e sem manchas e colocada em um suporte adequado, que secaram em temperatura ambiente durante 24 h. As amostras de NP foram então metalizadas com uma camada de ouro e levadas ao equipamento.

4.5.3. Estabilidade da suspensão de NP

A estabilidade da suspensão das NP-QS, armazenadas a temperatura de 10°C, foi verificada durante 90 dias. As análises foram realizadas a cada 30 dias no aparelho Zetasizer Nano Series, observando possíveis alterações do tamanho de partícula, potencial zeta e IPD de cinco replicatas com o passar do tempo.

4.5.4. Eficiência de encapsulação

A EE foi determinada avaliando-se a quantidade de FLU associada às NP. Amostras de 7 mL de suspensão de NP foram centrifugadas (CentriBio TDL80-2B) durante 30 min, a 4000 rpm. Após esse período e com a deposição das NP no fundo do tubo Falcon, o sobrenadante foi coletado, filtrado em membrana de porosidade igual a 0,45 µm e quantificado por CLAE. A EE foi calculada de acordo com a fórmula abaixo (SPÓSITO, 2008; TAGLIARI, 2012):

$$EE\% = \left(\frac{Valor_{total} - Valor_{quantificado}}{Valor_{total}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4}),$$

onde: EE% representa a porcentagem de FLU retido às NP, $Valor_{total}$ representa a massa de FLU adicionada inicialmente para se obter as NP e $Valor_{quantificado}$ representa o valor analisado através do CLAE

4.6. Avaliação *in vitro* do potencial mucoadesivo das NP

4.6.1. Preparo das NP-MCN

A mucina suína do tipo III (MCN) foi hidratada em água Milli-Q, a temperatura de 4°C, *overnight*, na proporção de 1:10 (m/v) e, posteriormente, teve o pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1,0 M. A solução foi diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, a uma concentração final de MCN igual a 1% (m/v).

A solução diluída foi sonicada (Sonicador Thornton – T14) até que as partículas de MCN atingissem tamanho menor que 600 nm. As análises referentes ao tamanho das NP e potencial zeta foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano Series.

4.6.2. Capacidade mucoadesiva das NP-QS frente às NP-MCN

As NP-FLU, com concentração de fármaco igual a 1,75 mg/mL, preparadas conforme o item 4.4, foram filtradas em membrana 0,45 µm para garantir a homogeneidade do tamanho de partículas. Em seguida, foi preparada uma mistura com proporção 1:1 (v/v) de NP-FLU e NP-MCN. As dispersões foram agitadas em vortex (Daigger Vortex Genie 2TM) durante 1 min e analisadas quanto ao tamanho de partículas e IPD no aparelho Zetasizer Nano Series (SHEN et al., 2009).

4.7. Obtenção de formulações hidrofílicas de NP-FLU encapsulado

As suspensões de NP-FLU foram geleificadas com o polímero hidrofílico carbopol. O polímero foi adicionado nas porcentagens de 0,5; 1,0 e 1,5% (m/v) na superfície das suspensões de NP e deixado em repouso durante 24 h. Após esse período, o gel foi homogeneizado por agitação mecânica até garantir a ausência de grumos a olho nu. Apesar do pH ideal para formação de géis de carbopol ser entre 6,5 e 7, onde ocorrem a máxima transparência e viscosidade, valores de pH entre 4,5 e 5 já apresentam essas características aceitáveis (ANSEL et al., 2007). Assim, o pH das formulações foram mantidos em 4,5, tornando-as compatíveis com o pH vaginal.

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

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados, em quintuplicata, utilizando-se células de difusão verticais do tipo Franz modificadas (Figura 10). O compartimento doador (superior) das células foi preenchido com 1,0 mL das formulações abaixo, todas com pH 4,5 e contendo 1,75 mg/mL de FLU:

- (i) solução de FLU (SOL-FLU);
- (ii) NP-FLU;
- (iii) gel da solução de FLU (G-FLU);

(iv) gel das NP-FLU (G-NP-FLU).

O compartimento receptor (inferior) das células foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, e foi mantido sob agitação magnética a 1000 rpm durante todo o experimento. Entre os dois compartimentos de cada célula, colocou-se uma membrana hidrofílica de acetato de celulose, previamente lavada com água Milli-Q fervente para a retirada de impurezas.

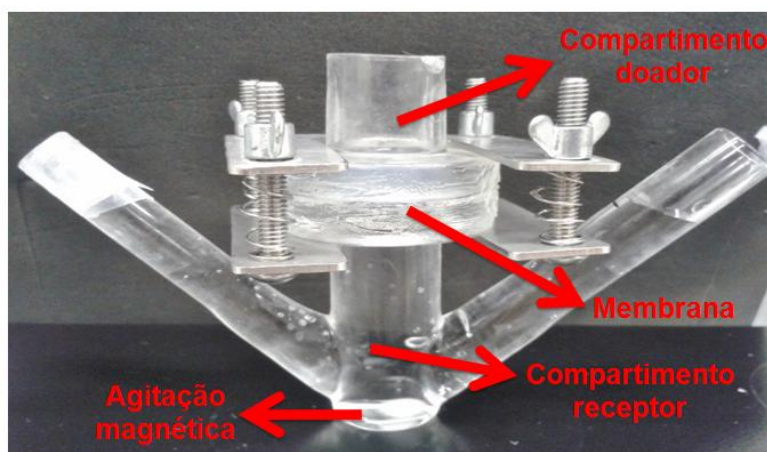


Figura 10 – Célula de difusão do tipo Franz modificada, montada para realização de ensaios *in vitro* de liberação de FLU através de membrana de acetato de celulose.

Alíquotas de 1,0 mL da solução receptora foram coletadas do compartimento receptor, após 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 e 12 h, e igual volume de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, foi imediatamente repostado após cada coleta. As alíquotas foram dosadas por CLAE para determinação da quantidade de FLU liberado. Para tanto, levou-se em consideração a reposição da solução receptora a cada hora de coleta. O cálculo da quantidade acumulada de FLU, ao longo das 12 h de experimento, foi expressa de acordo com a equação:

$$Q_{\text{real}, t} = C_{\text{mensurada}, t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (\text{Equação 5}),$$

onde: $Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t

$C_{\text{mensurada}, t}$ = concentração mensurada da amostra no tempo t

V_r = volume do receptor (15,0mL)

V_a = volume de amostra coletada (1,0 mL)

C_a = concentração de amostra coletada

Assim, a quantidade real de FLU liberada, acumulada em um determinado tempo t , é igual a quantidade medida no tempo t , somada a quantidade total coletada do compartimento receptor para quantificação das amostras em tempos anteriores.

4.9. Estudos *in vitro* de permeação de FLU através da mucosa de suínos

Os ensaios de permeação *in vitro* foram realizados utilizando-se as células verticais de difusão do tipo Franz modificadas, com as mesmas formulações descritas no item 4.8. No entanto, neste caso utilizou-se a mucosa de suínos ao invés da membrana de acetato de celulose e as alíquotas de 1,0 mL foram coletadas, do compartimento receptor, após 0,5; 1; 1,5 e 2 h de estudo, sendo esse volume imediatamente repostado após cada coleta com solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4(Figura 11).

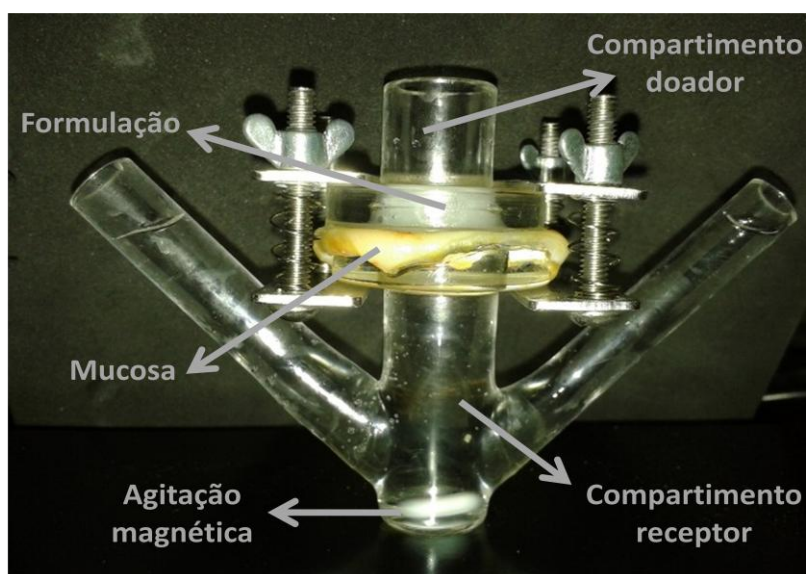


Figura 11 – Foto de uma célula de difusão do tipo Franz modificada, montada para a realização de estudos *in vitro* de permeação de FLU através da mucosa bucal de suínos.

Após as 2 h de estudo, a célula de Franz foi desmontada, retirou-se o excesso da formulação com um papel absorvente. A área difusional da mucosa foi fragmentada e imersa em 5 mL de uma solução de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) durante 24 h (Figura 12). Essa solução metanólica foi filtrada em membrana de porosidade igual a 0,22 μm para posterior quantificação do FLU por CLAE.

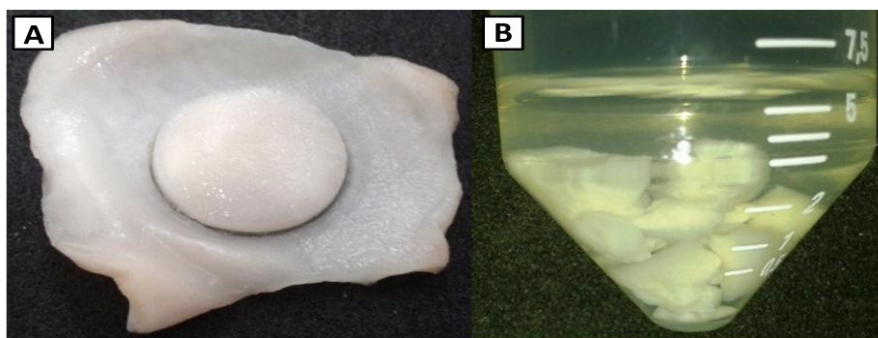


Figura 12 – Mucosa de suínos: (A) área difusional esférica após o experimento *in vitro* de permeação; (B) mucosa cortada e imersa em 5 mL de solução de metanol:água 1:1 (v/v).

As amostras de solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, do compartimento receptor e de solução de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) utilizadas na extração do FLU retido na mucosa foram analisadas por métodos cromatográficos distintos e validados.

4.10. Análises estatísticas

Os dados quantitativos de, pelo menos, três replicatas estão representados nas Tabelas e Figuras como média \pm desvio padrão. As regressões lineares e equações de reta foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism v.3.00. As diferenças significativas entre conjunto de dados foram verificadas por análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Validação de métodos analíticos para quantificação de FLU por CLAE

5.1.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção para o FLU por espectrofotometria

A varredura da solução de FLU com concentração igual a 100 µg/mL apresentou dois picos de absorção: o primeiro em 210 nm e o segundo, com menor intensidade, em 260 nm (Figura 13).

Inicialmente, os dois comprimentos de onda foram utilizados para as análises realizadas no CLAE. No entanto, verificou-se que em 210 nm os picos referentes ao FLU nos cromatogramas eram mais intensos, simétricos e proporcionais, sendo, portanto, selecionado para detecção do fármaco em estudo.

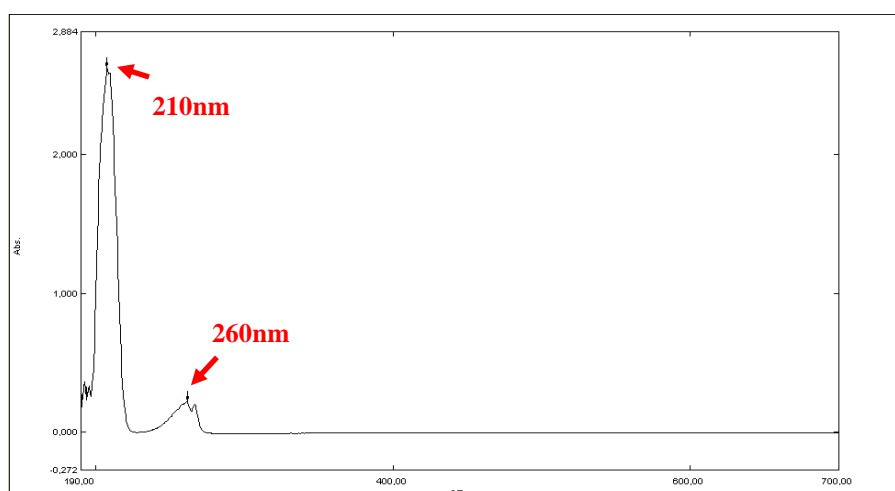


Figura 13 – Espectro de absorção em UV/Vis de uma solução aquosa de FLU a 100 µg/mL em metanol. Varredura realizada entre os comprimentos de onda 190 e 700 nm.

5.1.2. Validação dos métodos analíticos

Os estudos realizados por CLAE mostraram que a melhor proporção de solventes para compor a fase móvel nas análises foram de água Milli-Q:acetonitrila (80:20, v/v). Nas condições padronizadas neste trabalho, observou-se um tempo de retenção do FLU igual a 6,3 min, com separação adequada dos picos.

As diluições das amostras foram realizadas em água Milli-Q:metanol (1:1, v/v), mistura de solventes utilizado para extração adequada do FLU da mucosa, e em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, utilizado como meio doador nos estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*. A utilização desses solventes, aliado a injeções de amostras em volume igual a 50 μ L, possibilitaram a obtenção de picos referentes ao FLU simétricos e fácil estabilização da linha de base (ver Figuras 15 e 17 a seguir).

a) Seletividade

Os dois métodos analíticos mostraram-se seletivos para doseamento do FLU. Nas Figuras 14 e 16 são apresentados os cromatogramas referentes aos controles com os solventes água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) e tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, respectivamente. Apesar de um pico interferente aparecer em, aproximadamente, 5,7 min, esse pico não inviabilizou a quantificação precisa e exata do FLU, a qual ocorreu em, aproximadamente, 6,3 min (Figuras 15 e 17).

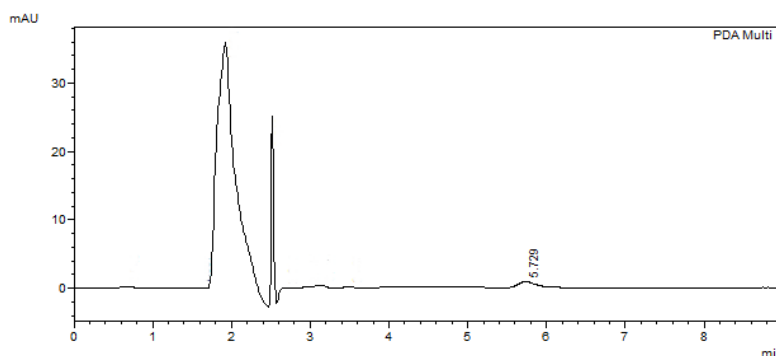


Figura 14 – Cromatograma obtido por CLAE com detecção em 210 nm, referente a uma amostra controle contendo somente o solvente água Milli-Q:metanol (1:1, v/v).

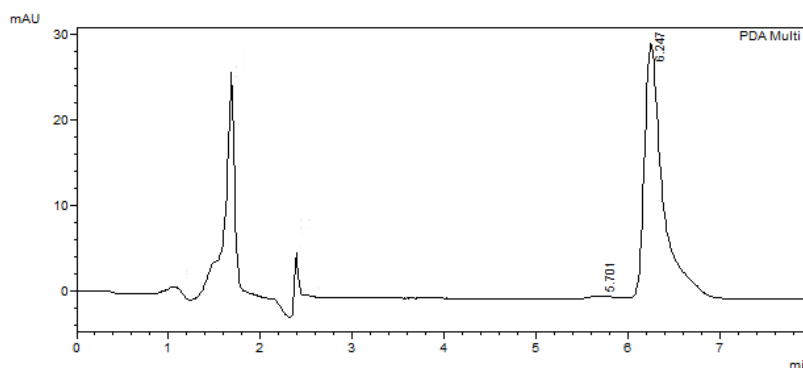


Figura 15 – Cromatograma obtido por CLAE com detecção em 210 nm, referente a uma amostra de FLU com concentração igual a 2,0 μ g/mL, diluída em água Milli-Q:metanol (1:1, v/v).

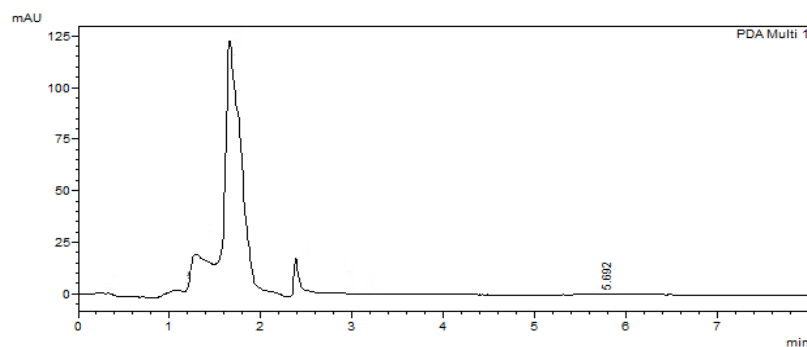


Figura 16 – Cromatograma obtido por CLAE com detecção em 210 nm, referente a uma amostra controle, composta somente por tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

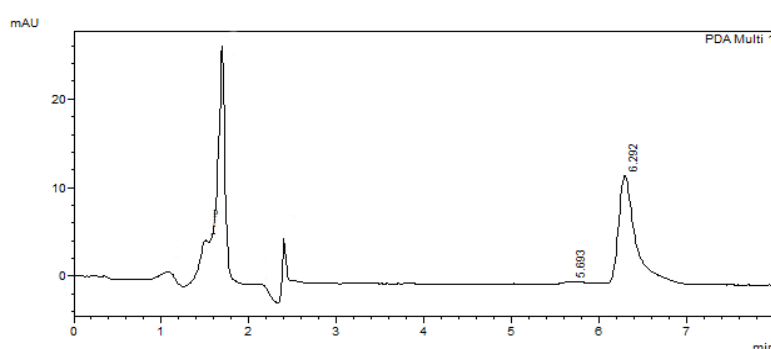


Figura 17 – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente a uma amostra de FLU com concentração igual a 2,0 µg/mL diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

Os métodos analíticos também mostraram-se seletivos para possíveis interferentes presentes na mucosa ou NP-QS (Figuras 18 e 19). Os cromatogramas obtidos pela injeção no equipamento de um homogenato de mucosa e de uma solução diluída de NP-QS filtrados não apresentaram picos adicionais próximos ao tempo de retenção do FLU nas condições padronizadas.

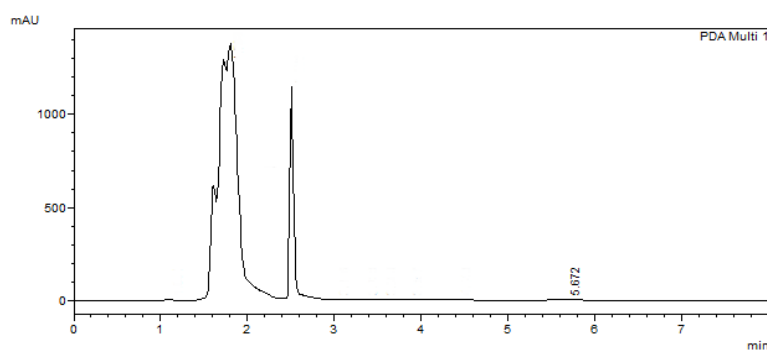


Figura 18 – Cromatograma obtido por CLAE com detecção em 210 nm, referente a uma amostra de homogenato de mucosa filtrada, diluída em água Milli-Q:metanol (1:1, v/v).

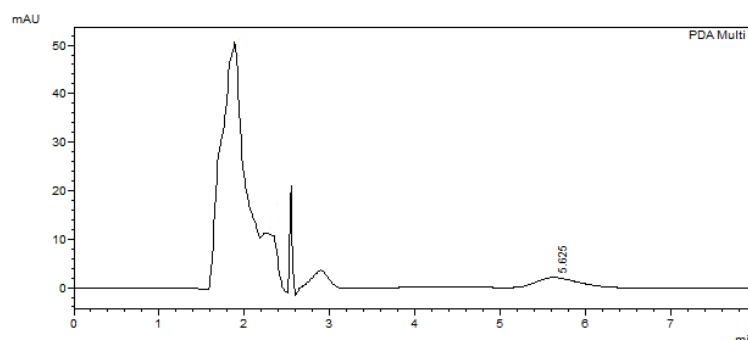


Figura 19 – Cromatograma obtido por CLAE, detecção em 210 nm, referente à injeção de uma solução de NP-QS diluída na proporção de 1:1000 em águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v).

b) Linearidade

O método que utilizou como solvente de diluição a mistura de águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v) mostrou-se linear dentro da faixa de concentração de 0,5 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado na Figura 20, com coeficiente de correlação linear (R) superior a 0,99 (ICH, 2005).

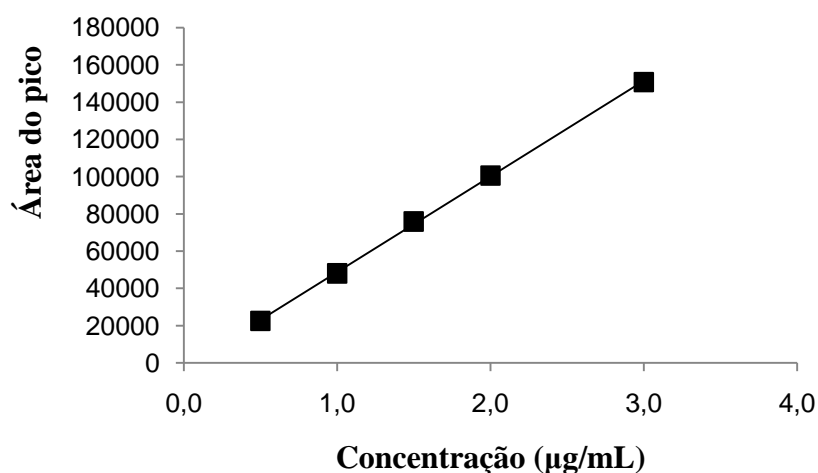


Figura 20 – Curva analítica obtida pela análise do FLU por CLAE, utilizando como solvente uma mistura de águaMilli-Q:metanol (1:1, v/v), comprovando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 51311x - 2513,9$ e $R = 0,999$.

O segundo método validado para o FLU, utilizando tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, como solvente para diluição das amostras, também mostrou-se linear entre as concentrações de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser visto na Figura 21, com R superior a 0,99 (ICH, 2005).

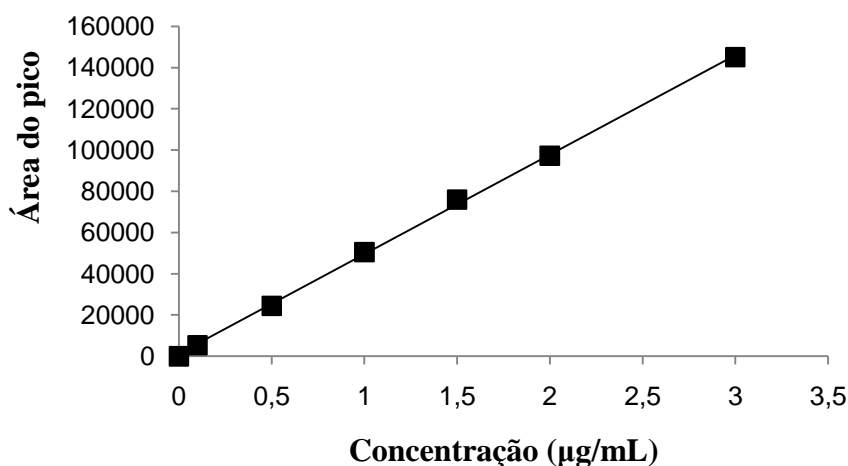


Figura 21 – Curva analítica obtida pela análise do FLU por CLAE, utilizando como solvente tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, confirmando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 48250x + 1259$ e $R = 0,999$.

c) Exatidão e Precisão

Ambos os métodos propostos mostraram-se precisos e exatos em relação às concentrações analisadas inter- e intra-dia (Tabela 1 e 2), levando-se em consideração as especificações estabelecidas pela ANVISA (2003), que estabelecem como aceitáveis valores de precisão e exatidão com variação máxima de 5%.

Tabela 1 – Parâmetros de precisão e exatidão intra- e inter-dia para validação de método analítico por CLAE para o FLU utilizando como solvente uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	E (%)
Intra-dia (n=9)			
0,5	0,49 ± 0,02	3,8	2,0
1,5	1,53 ± 0,01	0,7	1,9
3,0	2,99 ± 0,04	1,4	0,5
Inter-dia (n=9)			
0,5	0,48 ± 0,15	4,3	4,1
1,5	1,54 ± 0,02	1,1	2,6
3,0	2,98 ± 0,04	1,3	0,5

Tabela 2 – Parâmetros de precisão e exatidão intra- e inter-dia para validação de método analítico por CLAE para o FLU utilizando como solvente tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	E (%)
Intra-dia (n=9)			
0,5	0,49 \pm 0,03	3,1	2,6
1,5	1,50 \pm 0,01	3,0	0,3
3,0	3,00 \pm 0,04	1,8	0,1
Inter-dia (n=9)			
0,5	0,48 \pm 0,03	3,8	3,2
1,5	1,52 \pm 0,03	1,3	1,7
3,0	3,01 \pm 0,11	2,3	0,2

d) Limite de quantificação

A menor concentração quantificada de FLU, com os valores de precisão e exatidão dentro das conformidades, foi de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para as diluições realizadas em água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) e tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4, respectivamente. Analisando-se as Tabela 3 e 4, verifica-se que concentrações inferiores não apresentaram valores adequados de precisão e exatidão, de acordo com o que preconiza a resolução da ANVISA (2003) que trata da validação de métodos analíticos.

Tabela 3 – Dados para determinação do LQ do método analítico por CLAE para o FLU, utilizando como solvente uma mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	E (%)
0,01	*	**	**
0,03	*	**	**
0,05	*	**	**
0,1	*	**	**
0,2	*	**	**
0,3	*	**	**
0,4	*	**	**
0,5	0,49 \pm 0,02	3,8	2,0

* Valores não detectados por CLAE; ** Concentrações sem precisão e exatidão.

Tabela 4 – Dados para determinação do LQ do método analítico por CLAE para o FLU, utilizando como solvente um tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	E (%)
0,05	0,04 \pm 0,002	3,9	17,3 [#]
0,1	0,10 \pm 0,001	0,9	4,2
0,3	0,31 \pm 0,002	0,7	3,6
0,5	0,49 \pm 0,003	3,8	2,0

[#]Valor de exatidão não aceitável (ANVISA, 2005).

e) Recuperação

O estudo de recuperação do FLU foi realizado para verificar a capacidade extratora do solvente selecionado, a mistura de água Milli-Q:metanol (1:1, v/v), e para validar o processo de extração. Tornando adequada a metodologia de quantificação do FLU nos estudos de permeação através da mucosa.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de recuperação do FLU, em diferentes concentrações, extraídos com 5,0 mL do solvente selecionado.

Tabela 5 – Porcentagem de recuperação do FLU da mucosa bucal de suínos utilizando água Milli-Q:metanol (1:1, v/v) como solvente extrator (n = 3).

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
1,0	91,0 \pm 3,5
1,5	88,0 \pm 5,1
2,0	89,7 \pm 2,6

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 5 acima, conclui-se que o processo de extração mostrou-se eficiente na quantificação do FLU retido na mucosa. Nas três concentrações analisadas, recuperou-se, aproximadamente, 90% do fármaco adicionado à mucosa e as porcentagens de erro estão dentro do limite aceito para validação de métodos envolvendo processos extrativos (\pm 15%) (CAUSON, 1997).

5.2. Determinação do coeficiente de solubilidade em meio aquoso

A determinação das propriedades físico-químicas de um fármaco são essenciais para o desenvolvimento de novas fórmulas farmacêuticas e fundamental para a segurança de um novo medicamento (AULTON et al., 2005). Nesse contexto, a solubilidade aquosa do FLU foi determinada, a temperatura de 30°C, utilizando diferentes proporções de fármaco e água. Os dados obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de FLU obtida após filtração das dispersões aquosas do fármaco em diferentes concentrações, a temperatura de 30°C (n = 3).

FLU em suspensão aquosa (mg/mL)	Concentração obtida após a filtração (mg/mL)	pH
4,0	3,62 ± 0,47	5,0± 0,01
6,0	5,83 ± 0,05	5,2± 0,01
8,0	5,78 ± 0,13	5,1± 0,01

Na solução saturada com 4,0 mg/mL de FLU, quantificou-se estatisticamente todo fármaco. Enquanto com as concentrações de 6,0 e 8,0 mg/mL, quantificou-se 5,8 mg/mL. Assim, o FLU apresenta solubilidade em meio aquoso de 5,8 mg/mL, pH 5,2, em uma temperatura de 30°C, sendo considerado levemente solúvel (AULTON, 2005). A solubilidade do fármaco garantiu que os experimentos de liberação e permeação *in vitro* fossem conduzidos em condições *sink*, ou seja, a concentração do fármaco na solução receptora em estudo foi inferior a 10% do valor de sua solubilidade. A saturação do meio receptor prejudicaria a permeação do FLU à mucosa. A concentração de FLU em todas as formulações colocadas no compartimento doador das células de difusão foi igual a 1,75 mg/mL. Portanto, mesmo que toda a massa de FLU (1,75 mg) passasse para o volume de solução receptora (15 mL), a concentração total obtida seria de 116,7 µg/mL, ou seja, igual a 2% da solubilidade do fármaco.

Tendo em vista que a solubilidade aquosa de FLU é limitada, espera-se que a interação desse fármaco com a mucosa, com características mais lipofílicas (CORBO et al., 1989), ocorra em concentrações adequadas para que o fármaco desempenhe sua ação antifúngica.

5.3. Obtenção e caracterização das NP-QS

5.3.1. Tamanho de partículas e Potencial Zeta

A técnica de geleificação ionotrópica utilizada neste trabalho é um processo que não utiliza solventes orgânicos e possui variáveis facilmente controláveis (AGIHOTI et al., 2004). A QS de baixo peso molecular foi escolhida por apresentar melhor solubilidade, biodegradabilidade e menos efeitos tóxicos do que a QS de alto peso molecular, além de formar partículas menores e mais estáveis devido ao menor tamanho das suas moléculas (CHAE et al., 2005; LEE et al., 2001). Durante o preparo das NP-QS, ao adicionar-se a solução de TPP à solução de QS, as NP são evidenciadas visualmente pela turvação da solução sob agitação magnética, conforme observa-se na Figura 22. Entretanto, as concentrações utilizadas não devem formar suspensões opacas (muito turvas e esbranquiçadas), o que não ocorreu nesse estudo, o que significaria formação de micropartículas e, não, NP (CALVO et al., 1997).

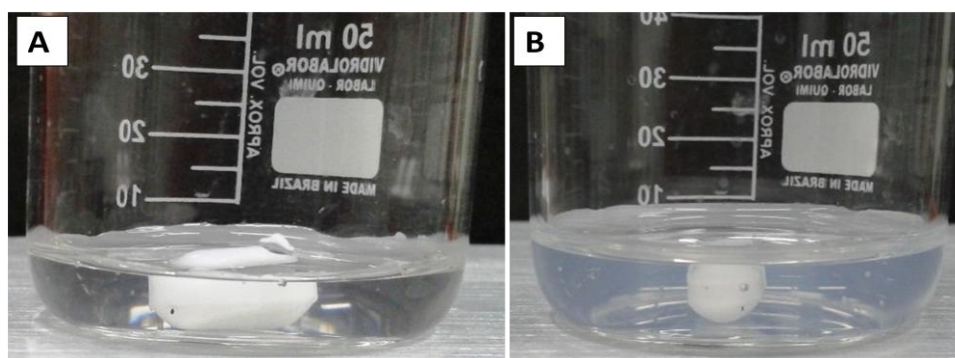


Figura 22 – Preparo das NP-QS antes (A) e após (B) a adição da solução de TPP à 1,0 mg/mL evidenciadas pela turvação da solução.

A acidificação da água é essencial para garantir a protonação da QS, e sua consequente solubilização. No entanto, a acidificação precisa ser controlada uma vez que valores de pH menores que 4,5 dificultam a produção de NP com distribuição unimodal, enquanto valores de pH maiores do que 5,2 podem produzir, na maioria das vezes, micropartículas (FAN et al., 2012). Altas concentrações de ácido aumentam a força iônica no meio aquoso e a quantidade de íons acetato (CH_3COO^-) que ligam-se aos grupos amino protonados da QS. Este efeito diminui a quantidade de sítios de ligações para o TPP e prejudica o preparo das NP. Além disso, a QS presente em solução permanece em uma

conformação entremeada, favorecendo a formação de grandes partículas (FAN et al., 2012). Dessa forma, o pH da solução de QS foi corrigido para 4,5 visando garantir a formação de partículas com o menor IPD.

As NP-QS foram obtidas através da técnica de geleificação ionotrópica, proposta por CALVO et al. (1997). Contudo, foram realizadas modificações no método inicial para a obtenção de NP com o menor tamanho e IPD possível, além de potencial zeta adequado. Inicialmente, analisou-se a melhor proporção entre os volumes utilizados das soluções de QS/TPP com as concentrações de 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente. Sendo assim, só foi possível obter resultados confiáveis, em quintuplicatas, quando utilizada a proporção de 5:2 (v/v) QS/TPP. Utilizando a proporção 5:1 verificou-se a formação de micropartículas, enquanto as proporções 5:3, 5:4 e 5:5 geraram resultados, porém sem adequada reprodutibilidade (Tabela 7). Entretanto, com a proporção 5:2 obteve-se NP-QS com tamanho, IPD e potencial zeta adequados (Tabela 8).

Tabela 7 – Análise da formação das NP-QS utilizando diferentes proporções (v:v) das soluções de QS e TPP com concentração igual a 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente.

Proporção QS:TPP (v:v)	Resultados
5:1	+
5:2	*
5:3	-
5:4	-
5:5	-

Legenda: + suspensão turva (formação de micropartículas); * suspensão clara (formação de NP); - não houve formação de NP

Tabela 8 – Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-QS preparadas com concentração de QS e TPP igual a 1,75 mg/mL e 1,0 mg/mL, respectivamente, utilizando a proporção volumétrica de 5:2 (v/v) das soluções de QS e TPP (n = 5).

Proporção QS:TPP (v/v)	Tamanho das NP-QS (nm)	IPD	Potencial Zeta (+mV)
5:2	271,7 ± 59,5	0,345 ± 0,06	46,2 ± 6,7

As NP-QS preparadas tiveram tamanho médio de 271,7 nm e IPD igual a 0,34, resultado relativamente baixo considerando uma escala com valores entre 0,0 e 1,0. Elas apresentaram residual médio de carga positivo de +46,2 mV, sendo esse um resultado importante para garantir a estabilidade física da dispersão e as propriedades de mucoadesão das partículas que entrarão em contato com a mucosa, a qual possui residual de cargas negativas.

5.3.2. Morfologia das NP-QS

As NP-QS obtidas apresentaram formato esférico, conforme pode ser visualizado nas imagens obtidas por MEV (Figura 23). Ainda, a imagem contida na Figura 23 confirma o tamanho médio das NP medidos anteriormente de maneira indireta por espalhamento de luz dinâmico (ver Tabela 8). Confirma também que as partículas não apresentaram grandes variações de tamanho, ou seja, apresentaram polidispersividade relativamente baixa (Figura 28B).

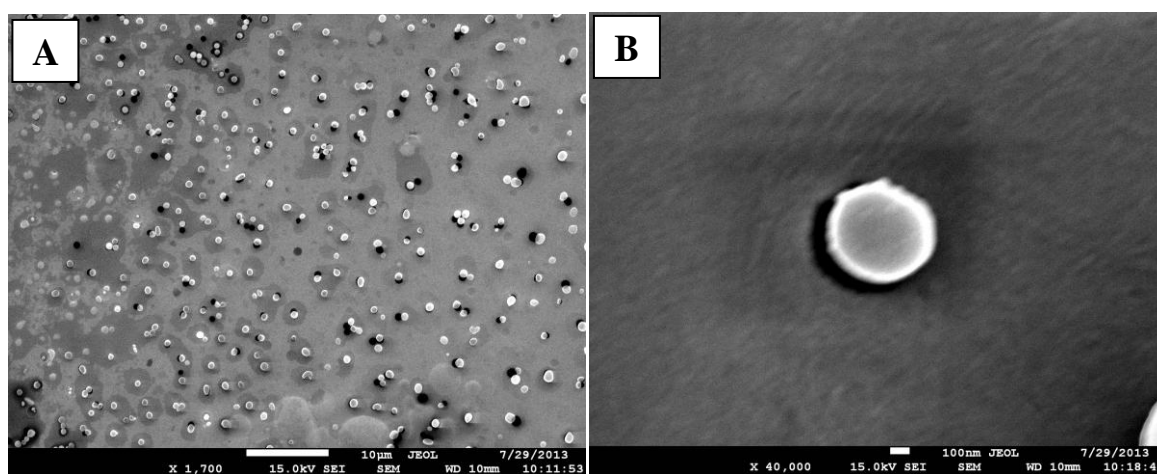


Figura 23 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM-7001F) das NP-QS com imagem aumentada 1700 vezes (A) e 40000 vezes (B), confirmando o tamanho aproximado de 250 a 300 nm.

NP poliméricas obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica, mesmo que com diferentes concentrações de QS e TPP, tendem a formar partículas esféricas e com IPD relativamente baixo (FAN et al., 2012; RAMPINO et al., 2013). No entanto, contrastando com os resultados de morfologia de partículas apresentados nesse trabalho, estão as NP preparadas com diferentes matrizes. GUPTA e colaboradores (2012), por exemplo,

prepararam NP lipídicas sólidas encapsulando FLU e verificaram que seu formato era semelhante ao de uma concha. Formatos não esféricos podem influenciar negativamente a sedimentação das NP após a aplicação tópica da formulação que as contém, dificultando sua interação com a pele ou mucosa. Desta forma, as NP-QS preparadas neste trabalho parecem ter formato adequado capaz de possibilitar boa interação com a mucosa.

5.3.3. Estabilidade da suspensão aquosa de NP-QS

Ao longo dos meses, as suspensões poliméricas possuem a tendência de se agregarem e sedimentarem, comprometendo a estabilidade física da dispersão. Esta característica reduz o seu tempo de armazenamento e reduz a validade de um medicamento contendo essas partículas (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003). No entanto, como pode ser observado na Tabela 9 e comprovado através das análises estatísticas ($p < 0,05$), as NP-QS mantiveram o tamanho, IPD e potencial zeta inalterados ao longo dos três meses de análises, indicando uma boa estabilidade.

Tabela 9 – Estabilidade de uma amostra de NP-QS utilizando a proporção de QS:TPP 5:2 (v/v), concentrações iniciais de 1,75 mg/mL de QS e 1,0 mg/mL de TPP (n = 3).

Tempo (dias)	Tamanho das NP-QS (nm)	IPD	Potencial Zeta (+mV)
0	271,7 ± 59,5	0,345 ± 0,06	46,2 ± 6,7
30	298,5 ± 75,0	0,309 ± 0,037	48,0 ± 1,2
60	316,0 ± 71,3	0,286 ± 0,004	50,0 ± 1,9
90	317,4 ± 24,8	0,292 ± 0,004	48,0 ± 3,8

5.3.4. Eficiência de encapsulação

A EE foi determinada para as NP-FLU preparadas com diferentes proporções de fármaco em relação ao polímero QS (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação entre as EE das NP-FLU preparadas com diferentes proporções de QS:FLU (m/m) (n = 5).

Proporção QS:FLU (m/m)	EE (%)	IPD das NP-FLU
1:1/4	33,84 ± 4,12	0,435 ± 0,080
1:1/2	32,58 ± 4,35	0,375 ± 0,020
1:1	39,20 ± 1,19	0,260 ± 0,014
1:2	36,62 ± 6,09	0,333 ± 0,062

As análises estatísticas indicaram que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as EE para as diferentes proporções de QS:FLU utilizadas. A proporção entre QS:FLU foi selecionada, portanto, analisando-se os valores de IPD obtidos para as diferentes NP-FLU. Optou-se, portanto, pela proporção de QS:FLU 1:1 (m/m) por apresentar os menores valores de IPD, sugerindo uma distribuição mais uniforme do tamanho das partículas.

Muitos fatores podem influenciar a quantidade de fármaco encapsulado nas NP, destacando-se suas características físico-químicas (GUTERRES et al., 1995), o pH do meio (GOVENDER et al., 1999), a superfície da partícula, a natureza do polímero (VILA et al., 2002) e a quantidade de fármaco adicionada à formulação (SCHAFFAZICK et al., 2003). Sabe-se que substâncias hidrofílicas, como o FLU, possuem baixa EE por tenderem a permanecer na superfície da partícula, em contato com a água (BARICHELLO et al., 1999; GOVENDER et al., 1999; LEO et al., 2004). Além disso, estudos com micropartículas de QS comprovaram que fármacos de baixo peso molecular se difundem rapidamente durante o processo de encapsulação (ARICA et al., 2002; YU et al., 2008). Exemplificando a dificuldade de encapsular fármacos com essas características, SPÓSITO (2008) obteve resultados de encapsulação do FLU entre 21,4% e 50% para nanocápsulas preparadas com os polímeros poli-caprolactona e PLA-PEG.

Portanto, a EE de $39,20 \pm 1,19\%$ para NP-FLU utilizando a proporção de QS:FLU 1:1 (m/m) foi um valor aceitável, considerando hidrofiliicidade e o baixo peso molecular do fármaco. Assim, as formulações hidrofílicas preparadas a partir das NP-FLU possuíram cerca de 40% (m/v) do fármaco associado ao polímero QS e os outros 60% livres, dissolvidos no meio aquoso dispersante.

5.3.5. Morfologia das NP-FLU

As NP-FLU, apresentadas na Tabela 11 e Figura 24, apresentaram mesma morfologia, tamanho médio, IPD e potencial zeta ($p < 0,05$) quando comparadas às NP-QS correspondentes (Tabela 8). Portanto, a presença do FLU nas NP não alterou as suas características físicas.

Tabela 11 – Valores correspondentes ao tamanho médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP-FLU obtidas com a proporção de QS:FLU 1:1 (m/m) ($n = 12$).

Tamanho das NP-FLU (nm)	IPD	Potencial Zeta (+mV)
$266,4 \pm 81,8$	$0,311 \pm 0,06$	$40,2 \pm 8,1$

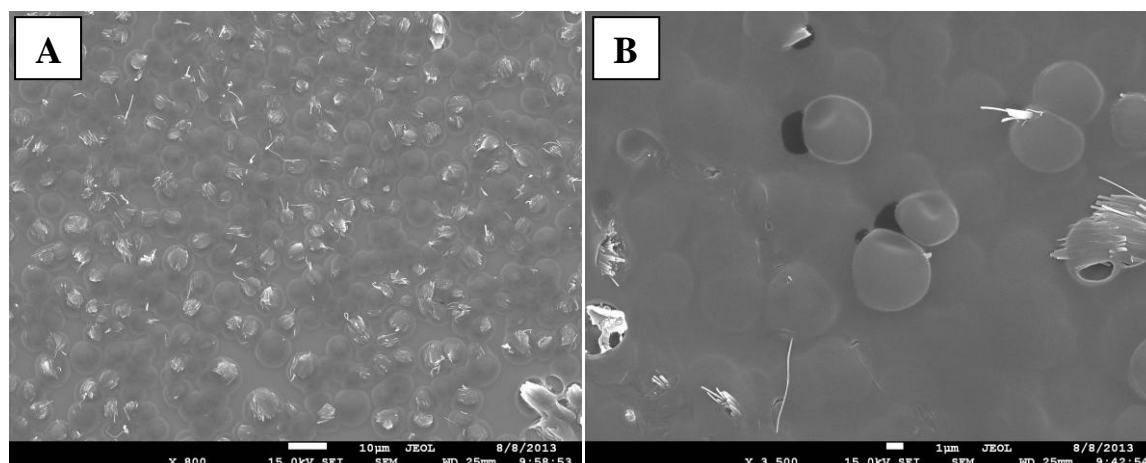


Figura 24 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM-7001F) das NP-FLU com aumento de 800 vezes (A) e 3500 vezes (B).

5.4. Avaliação *in vitro* do potencial mucoadesivo das NP-FLU

Para se determinar o caráter mucoadesivo do sistema proposto, as NP-FLU foram incubadas juntamente às NP-MCN preparadas conforme descrito no item 4.6. Nota-se por meio dos resultados apresentados na Tabela 12 que as NP-MCN apresentam tamanho 2,5 vezes maior que as NP-FLU e valores semelhantes de IPD. O aumento significativo ($p < 0,05$) do tamanho das partículas, observado após mistura entre as duas NP, e o fato de não se observar populações de partículas com tamanhos semelhantes aos das partículas isoladas (Figura 25), indicam que as NP-FLU são mucoadesivas.

Tabela 12 – Comparação entre o tamanho médio e IPD das NP-FLU e NP-MCN e depois de misturadas em proporção 1:1 (v/v) (n = 3).

Amostras	Tamanho médio das partículas (nm)	IPD
NP-FLU	272,5 ± 1,8	0,331 ± 0,059
NP-MCN	656,3 ± 16,9	0,343 ± 0,051
NP-FLU + NP-MCN	3430,7 ± 661,2	0,462 ± 0,094

Na Figura 25, nota-se que a intensidade do pico referente às NP-FLU + NP-MCN foi muito superior ao das NP-FLU e NP-MCN. As curvas representativas das amostras de NP isoladas apresentam-se distorcidas devido à grande diferença de intensidade da amostra de NP-FLU + NP-MCN.

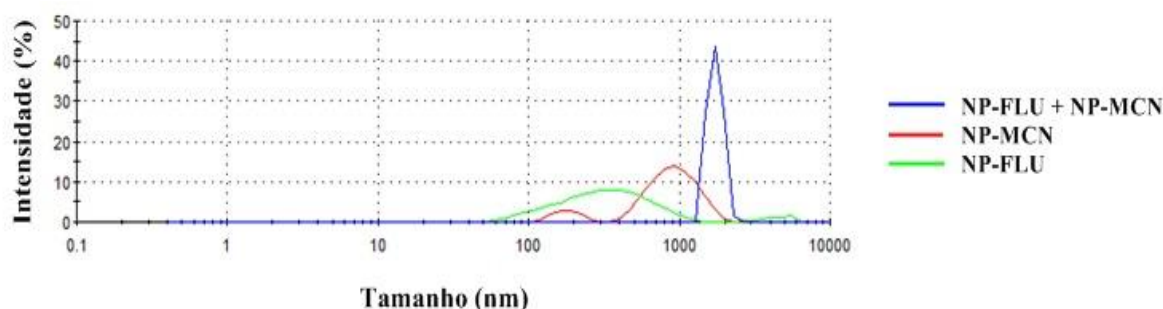


Figura 25 – Distribuição de tamanho hidrodinâmico referente às amostras de NP-FLU, NP-MCN e NP-FLU + NP-MCN obtidos através do equipamento Zetasizer Nano Series.

DHAWAN e colaboradores (2004) observaram que a quantidade de MCN absorvida por micropartículas de QS é diretamente proporcional à concentração de MCN utilizada. Comprovaram ainda que a escolha da técnica de preparo das partículas é determinante para a quantidade de MCN associada à QS, sendo a geleificação ionotrópica através de reticulação com TPP a que apresenta maior adesão da MCN à QS.

Encontram-se descritas na literatura diversas teorias sobre a força de mucoadesão (DEACON et al., 2000; SHAIKH et al., 2011). SOGIAS e colaboradores (2008) comprovaram que os fatores que influenciam as forças de mucoadesão são as atrações eletrostáticas, as ligações de hidrogênio e o efeito hidrofóbico. Dentre essas, as interações eletrostáticas exercem predominância, pois os grupos amino da QS, quando protonados, carregam cargas positivas que interagem com as cargas negativas presentes nas

macromoléculas de MCN. Vale ressaltar que fatores como hidrofiliicidade, peso molecular, o pH da solução e a concentração do polímero também podem influenciar essas interações.

Os resultados deste experimento indicam que as NP-FLU presentes na formulação desenvolvida ficarão aderidas à mucosa vaginal após aplicação, o que aumentará seu tempo de retenção local permitindo que o FLU liberado permaneça por mais tempo agindo no ambiente vaginal, melhorando a terapia tópica da CVV.

5.5. Obtenção de formulações hidrofílicas com as NP-FLU

Os géis de carbopol são formados rapidamente quando as moléculas desse polímero entram em contato com meio aquoso. A consistência do gel formado é diretamente proporcional à concentração de polímero dispersa na água (ANSEL et al., 2007). Visualmente, notou-se que os géis de carbopol a 1,0 e 1,5% (m/v) formaram formulações muito espessas, enquanto concentrações abaixo de 0,5% (m/v) formavam géis mais fluidos. Portanto, a porcentagem de 0,5% (m/v) de carbopol incorporado à suspensão de NP possibilitou a formação de um gel com boas características de fluidez (Figura 26), o que facilitaria a aplicação do produto na mucosa vaginal. O gel contendo a formulação estará aderido ao muco cervical. Assim, as NP-FLU se difundirão pelo gel até o contato direto com a mucosa vaginal, local onde o fármaco exercerá seu efeito farmacológico.



Figura 26 – Fotografia demonstrando o aspecto dos géis de carbopol formados pela adição de 0,5% (A), 1,0% (B) e 1,5% (C) (m/v) à suspensão de NP-FLU.

5.6. Estudos *in vitro* de liberação do FLU a partir da formulação desenvolvida

A eficácia de qualquer produto utilizado através da via tópica está diretamente relacionada à liberação do fármaco da forma farmacêutica para pele ou mucosa. Os ensaios

de liberação durante o desenvolvimento de uma formulação identificam variáveis críticas de um processo e garantem a qualidade da formulação final (SIEWERT et al., 2003). Apesar desse tipo de ensaio ainda não ser preconizado pela legislação brasileira para formulações líquidas e semi sólidas destinadas para uso tópico (ZARONI et al., 2013), sua importância é indiscutível no desenvolvimento de novas formulações. O perfil de liberação *in vitro* do FLU pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 27.

Observa-se que a SOL-FLU foi a formulação que liberou maior quantidade de FLU através da membrana de acetato, seguida por G-FLU, NP-FLU e G-NP-FLU. Através de análises estatísticas, foram confirmadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações “SOL-FLU e NP-FLU” e “G-FLU e G-NP-FLU” a partir de meia hora de experimento, entre “SOL-FLU e G-FLU” a partir da primeira hora de experimento e entre “NP-FLU e G-NP-FLU” a partir da segunda hora de experimento.

Muitos estudos sugerem que os sistemas nanoparticulados compostos pelo polímero QS tem como propriedade a sustentação da liberação do ativo ali encapsulado, controlando a entrada do fármaco desejado no alvo de ação (NAGPAL et al., 2010; RAJAN e RAJ, 2013). Os mecanismos de liberação podem acontecer devido à dessorção ou difusão do fármaco através da superfície ou matriz das partículas, a erosão da matriz polimérica ou ainda pela combinação desses fatores (SOPPIMATH et al., 2001). Desta forma, através da diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a SOL-FLU e NP-FLU, bem como entre o G-FLU e G-NP-FLU, infere-se que as NP obtidas são capazes de sustentar a liberação do fármaco. Neste caso, a formulação correspondente ao G-NP-FLU sustentaria a liberação do ativo, tanto por conter as NP quanto pelo efeito de viscosidade do gel.

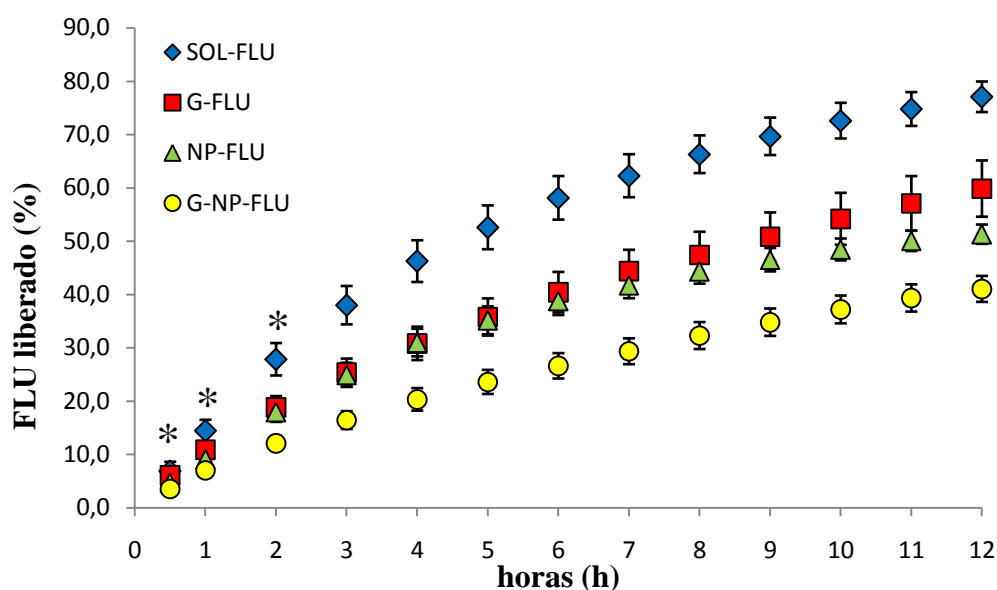


Figura 27 – Perfil de liberação *in vitro* do FLU através de membrana de acetato de celulose a partir de quatro formulações: SOL-FLU, NP-FLU, G-FLU e G-NP-FLU. Todas as formulações com concentração de FLU igual a 1,75 µg/mL e pH 4,5. O símbolo * representa o momento em que se inicia uma diferença estatística significativa entre as suspensões ($p < 0,05$). Cada valor corresponde a média \pm desvio padrão de cinco replicatas ($n = 5$).

Deve-se levar em consideração que, em uma situação real de aplicação desses tipos de formulação, a membrana de acetato de celulose não estaria influenciando a difusão do fármaco como no presente estudo. Ou seja, na aplicação tópica de uma solução de FLU (SOL-FLU) não haveria nenhuma barreira para controlar a liberação do FLU e o fármaco já estaria pronto para interagir com a membrana. A membrana de acetato de celulose neste estudo, no entanto, serviu como um suporte para que as formulações líquidas e semi-sólidas não se misturassem ao meio receptor. A SOL-FLU foi utilizada somente como um controle para caracterizar esse efeito da membrana em retardar a liberação do fármaco a partir das formulações analisadas.

Os resultados dos experimentos de liberação indicam que as formulações desenvolvidas (G-FLU, NP-FLU e G-NP-FLU) têm potencial em sustentar a liberação do fármaco, promovendo uma liberação progressiva no ambiente vaginal. Desta forma, elas devem melhorar a terapia tópica da CVV no que diz respeito à redução na quantidade de aplicação do produto e manutenção de quantidades terapêuticas do fármaco no local.

5.7. Estudos *in vitro* de permeação de FLU através da mucosa de suínos

Os ensaios *in vitro* que utilizam a mucosa como modelo não podem ser realizados por grandes períodos, tendo em vista a qualidade e manutenção das estruturas biológicas desse tecido (BERGINC et al., 2012; KULKARNI et al., 2011), fato determinante para se avaliar a penetração/permeação de um fármaco através dele. Assim, a mucosa bucal, após ser retirada do animal, foi cuidadosamente hidratada e transportada em temperatura refrigerada para o laboratório seguindo os procedimentos de limpeza e uso imediato.

Os estudos de permeação *in vitro* do FLU, utilizando mucosa bucal suína foram realizados, portanto, por um período máximo de 2 h, garantindo a integridade e a confiabilidade dos resultados (KULKARNI et al., 2011). As quatro formulações desenvolvidas contendo FLU permaneceram em contato com a mucosa durante esse período. A quantidade de FLU que penetrou a mucosa foi recuperado e dosado, assim como a quantidade que permeou o tecido. Ao término do experimento, os resultados obtidos referente ao fármaco recuperado da mucosa, a partir da solução controle e das três formulações desenvolvida, pode ser observado na Figura 28.

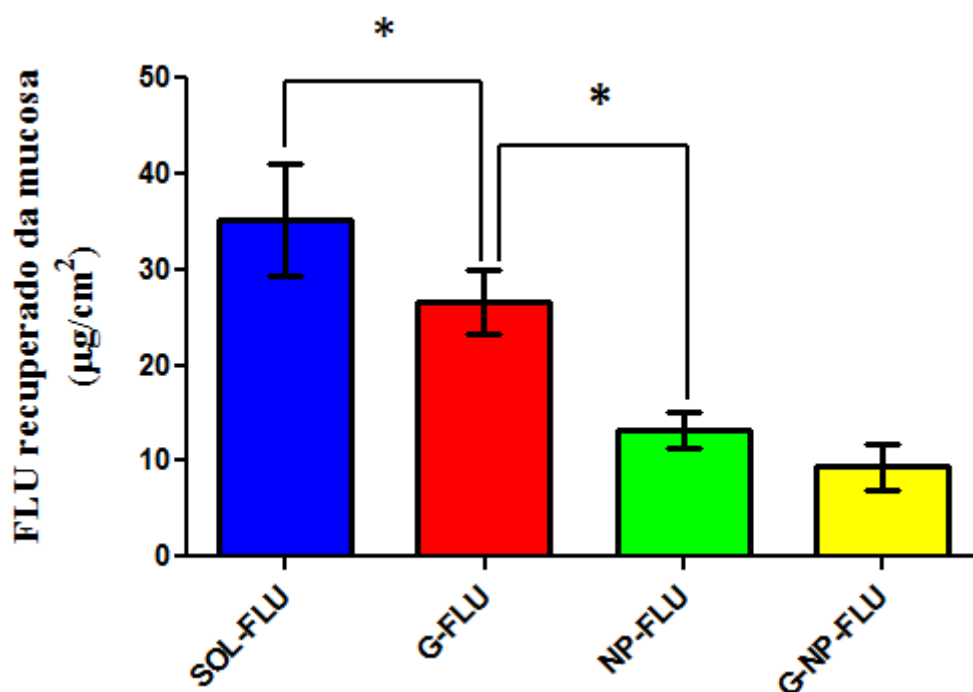


Figura 28 – FLU recuperado da mucosa suína após 2 h de experimento de permeação *in vitro* a partir de quatro formulações: SOL-FLU, NP-FLU, G-FLU e G-NP-FLU. Todas as formulações continham concentração de FLU igual a 1,75 mg/mL (n = 5), pH 4,5. O símbolo * representa diferença estatística significativa (p < 0,05).

Não houve quantidades significativas de FLU na solução receptora em nenhum ensaio realizado. Apesar de algumas amostras terem apresentado sinal de detecção do fármaco no CLAE, as quantidades eram inferiores ao limite de quantificação do método analítico validado, ou seja, menor que 100 ng/mL. O FLU apresenta log P igual a 0,99 e pKa igual a 2, encontrando-se na sua forma não ionizada em meio ácido (MERCK E COMPANY INCORPORATED, 2010). De acordo com a classificação biofarmacêutica, o FLU pertence à classe III, com alta solubilidade e baixa permeabilidade (FDA, 2000; PARAÍSO, 2012). Entretanto, a baixa permeabilidade de FLU a partir das formulações indica uma baixa absorção sistêmica do fármaco, ideal para sistemas de aplicação tópica (ANSEL et al., 2007; AULTON, 2005).

De acordo com a Figura 28, observa-se que a SOL-FLU foi a formulação que liberou maior quantidade de FLU para a mucosa, seguido do G-FLU, NP-FLU e G-NP-FLU. As análises estatísticas indicaram que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações correspondentes a SOL-FLU e NP-FLU, bem como entre a SOL-FLU e G-FLU, garantindo que tanto as NP, quanto o gel de carbopol são capazes de sustentar a liberação do fármaco. Também houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre G-FLU e G-NP-FLU, mostrando que, apesar do gel sustentar a liberação do fármaco, esse efeito torna-se ainda mais pronunciado na formulação contendo o gel e NP. Esses resultados condizem com os resultados de liberação (item 5.6), ou seja, as formulações que mais sustentaram a liberação do FLU foram as que mais reduziram a absorção do fármaco através da mucosa.

A representação abaixo simplifica os resultados apresentados na Figura 28 em termos de quantidade de FLU que penetrou a mucosa após as 2 h de experimento a partir de cada formulação avaliada:

$$\text{SOL-FLU} > \text{G-FLU} > \text{NP-FLU} = \text{G-NP-FLU}$$

O fato de não haver diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as quantidades de FLU recuperado da mucosa a partir das formulações NP-FLU e G-NP-FLU permite concluir que a sustentação do fármaco ocorre devido ao sistema nanoparticulado, ainda que ambos os sistemas apresentassem 60% do fármaco não encapsulado.

Estudos similares foram realizados por GUPTA e VYAS (2012), utilizando pele de orelha de porco, ao invés de mucosa, para verificar a permeação de FLU nanoencapsulado em NP lipídicas sólidas. Nesse estudo, as NP promoveram maior penetração do FLU, tanto no estrato córneo quanto na epiderme viável, quando comparados à solução controle com o fármaco. No entanto, os resultados apresentados no presente trabalho são mais significativos no que se refere ao tratamento da CVV, já que estudos de permeação de FLU através de modelo de mucosa são melhores indicativos de eficácia no tratamento desse tipo de infecção.

O uso da mucosa vaginal suína, ao invés da mucosa oral utilizada nestes estudos *in vitro*, seria mais adequado para caracterizar o local de aplicação destinado para a formulação desenvolvida. No entanto, o acesso a esse tipo de tecido seria logisticamente inviável, motivo pelo qual optou-se pelo último. Apesar de não haver diferença estrutural entre as mucosas, a mucosa oral possui um pH neutro, enquanto a vaginal apresenta pH ácido (BEREK e NOVAK, 2008). Esta diferença de pH poderia modificar a protonação da QS, por exemplo, o que geraria resultados diferentes dos apresentados. No entanto, todas as formulações tiveram o pH ajustado para 4,5 com o objetivo de minimizar esse efeito.

As concentrações de FLU retidas na mucosa a partir das formulações das NP-FLU e G-NP-FLU foram $1,32 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ e $0,94 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Considerando que a CMI do FLU para espécies de *C. albicans* varia entre 0,25 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ (NCCLS, 2002), as quantidades de FLU que permearam a mucosa, mesmo a partir das formulações que mais sustentaram a permeação do fármaco, foram suficientes para eliminar o fungo. Esta observação demonstra o potencial da formulação desenvolvida para o tratamento da CVV.

6. Conclusão

As NP-FLU desenvolvidas com o polímero QS e formuladas em gel hidrofílico de carbopol apresentaram-se como um sistema de liberação promissor com propriedades mucoadesivas, com potencial para permanecer no ambiente vaginal por períodos mais longos e sustentar a liberação do agente antifúngico FLU, promovendo melhoras na eficácia da terapia tópica da CVV.

6.1. Resultados parciais

- Os métodos analíticos para doseamento do FLU por CLAE, bem como o método de recuperação do fármaco da mucosa suína, foram validados adequadamente, assegurando a confiabilidade analítica de todos os resultados posteriores;
- A determinação do coeficiente de solubilidade aquosa do FLU assegurou que todos os experimentos de liberação e permeação *in vitro* desse fármaco foram realizados dentro das condições *sink*;
- As NP-QS e as NP-FLU apresentaram forma esférica, diâmetro em torno de 300 nm, com polidispersividade adequada e potencial zeta ideal para garantir certa estabilidade física à nanodispersão, bem como conferir mucoadesividade ao sistema;
- Estudos com NP-MCN evidenciaram o potencial mucoadesivo das NP desenvolvidas;
- As formulações de NP-FLU e G-NP-FLU foram capazes de sustentar a liberação *in vitro* do FLU;
- Estudos de permeação *in vitro* a partir das formulações SOL-FLU, G-FLU, NP-FLU e G-NP-FLU, mostraram que todas mantiveram concentrações altas do fármaco na mucosa, indicando tratar de formulações adequadas para aplicação tópica. Entretanto, revelaram que as NP são as principais controladoras na liberação do fármaco para a mucosa;
- Estudos adicionais são necessários para a avaliação da atividade antifúngica das formulações desenvolvidas.

7. Perspectivas futuras

7.1. Atividade antifúngica

Há diversas literaturas que relatam a atividade antifúngica do polímero QS (CRAVEIRO et al., 1999; GUERRA-SANCHEZ et al., 2009; ING et al., 2012; ZHONG et al., 2007; ZIANI et al., 2009). Portanto, testes adicionais *in vitro* devem ser realizados para se comprovar a eficácia da formulação desenvolvida, além de verificar se há um efeito sinérgico da formulação com o fármaco mais as NP-QS no combate à *C. albicans*.

7.2. Estudos *in vivo*

Após a realização dos testes citados no item 7.1., realizar-se-á testes *in vivo* com a formulação desenvolvida. Estes testes serão conduzidos de acordo com o protocolo proposto por GUPTA e VYAS (2012), em que se contamina a pele de camundongos com o fungo *C. albicans* e, após o crescimento do fungo, aplica-se as formulações a serem testadas.

8. Referências Bibliográficas

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **J Control Release**. v.100, n. 1, p.5-28, 2004.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR, L. V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ª edição. São Paulo: Artemed: São Paulo, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.899, 2003.

ARICA, B. et al. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. **Int J Pharm**. v.242, p.267–269, 2002.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Dev Ind Pharm**. v.25, p. 471-476, 1999.

BARLOW, A. J. E.; CHATTAWAY, F. W.; HOLGATE, M. C.; ALDERSLEY, T. Chronic parontchia. **Brit J Derm**.v.82, p.448-453, 1970.

BAUM, M. M. et al. An intravaginal ring for the simultaneous delivery of multiple drugs. **J Pharm Sci**. v.101, p.2833-2843, 2012.

BERGINC, K.; SKALKO-BASNET, N.; BASNET, P.; KRISTL, A. Development and evaluation of an *in vitro* vaginal model for assessment of drug's biopharmaceutical properties: curcumin. **AAPS PharmSciTech**. v.13, n.4, p.1045–1053, 2012.

BRANNON-PEPPAS, L. et al. Nanoparticles for delivery of pifithrins to combat cell death due to chemotherapy and radiation. **J Drug Del Sci Tech**. v.14, n.4, p.257-264, 2004.

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.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J Chromatogr B**. v. 689, p. 175-180, 1997.

CHAE, S. Y.; JANG, M. K.; NAH, J. W. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. **J Control Release**. v.102, n.2, p.383-94, 2005.

CHAIYASAN, W.; SRINIVAS, S. P.; TIYABOONCHAI, W. Mucoadhesive chitosan-dextran sulfate nanoparticles for sustained drug delivery to the ocular surface. **J Ocul Pharmacol Ther**. v.29, n.2, p.200-7, 2013.

CORBO, D. C.; LIU, J. C.; CHIEN, Y. W. Drug absorption through mucosal membranes: effect of mucosal route and penetrant hydrophilicity. **Pharm Res.** v.6, n.10, p.848-52, 1989.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana: a fibra do futuro. Fortaleza: Sandro Vasconcelos. PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 1999.

DANG, N. T. T.; TURNER, M. S.; COOMBES, A. G. A. Development of intra-vaginal matrices from polycaprolactone for sustained release of antimicrobial agents. **J Biomater Appl.** p.1-10, 2012.

DE OLIVEIRA FULGÊNCIO, G. et al. Mucoadhesive chitosan films as a potential ocular delivery system for ofloxacin: preliminary in vitro studies. **Vet Ophthalmol.** 2014.

DE SANTANA, D. C. et al. Nitricoxide photo release from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex. **Int J Pharm.** v.391, n.1-2, p.21-8, 2010.

DEACON, M. P. et al. Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. **Biochem J.** v.348, p.557-563, 2000.

DELLENBACH, P. et al. Topical treatment of vaginal candidiasis with sertaconazole and econazole sustained-release suppositories. **Int J Gynecol Obstet.** v.71, p.47-52, 2000.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech.** v.5, n.4, p.67, 2004.

DRAKE, T. E.; MAIBACH, H. I. Cutaneous candidiasis. In: ROBINSON JR, H.M. (ed.), *The diagnosis and treatment of fungal infections.* Springfield, 1974, p.5-28.

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

EL KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMAL, S. Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive vaginal tablets. **AAPS PharmSci.** v.4, n.4, 2002.

ENSIGN, L. M. et al. Mucus-penetrating nanoparticles for vaginal drug delivery protect against herpes simplex virus. **Sci Transl Med.** v.4, n.138, p.138-79, 2012.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **Eur J Pharm Sci.** v.15, n.4, p.355-66, 2002.

FAN, S. R.; LIU, P. *In vitro* fluconazole and nystatin susceptibility and clinical outcome in complicated vulvovaginal candidiasis. **Mycoses.** v.54, p.501-505, 2010.

FDA. GUIDANCE FOR INDUSTRY: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. Rockville, 2000.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clin Microbiol Rev.** v.1, n.2, p.187-217, 1988.

GARCÍA-RINCÓN, J. et al. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopusstolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Pestic Biochem Phys.** v.97, n.3, p.275–278, 2010.

GAVINI, E. et al. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: *in vitro/in vivo* studies. **Eur J Pharm Biopharm.** v.57, p.207-12, 2004.

GELFUSO, G. M. et al. Chitosan microparticules for sustaining the topical delivery of minoxidilsulphate. **J Microencapsul.** v.28, n.7, p.650-658, 2011.

GOLDSTEIN, E.; GRIECO, M. H.; FINKEL, G.; LOURIA, D. D. Studies on the pathogenesis of experimental *Candida parapsilosis* and *guilliermondii* infections in mice. **J Infect Dis.** v.115, p.293-302, 1965 .

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, p.63, 2011.

GOVENDER, T. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J Control Release.** v.57, n.2, p.171-85, 1999.

GRATIERI, T. Sistema de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo*. 2010. 190f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2010.

GRATIERI, T. et al. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. **Eur J Pharm Biopharm.**v.79, p.320-327, 2011.

GUERRA-SÁNCHEZ, M. G.; VEGA-PEREZ, J.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopusstolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. **Pestic Biochem Phys.** v.93, n.1, p.18–22, 2009.

GUNASEELAN, S. et al. Sustained local delivery of structurally diverse HIV-1 microbicides released from sublimation enthalpy controlled matrices. **Pham Res.** 2012.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chem Phys Lipids.** v.165, p.454-461, 2012.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharm Res.** v.12, n.10, p.1545-7, 1995.

HAN, Y. A.; SINGH, M.; SAXENA, B. B. Development of vaginal rings for sustained release of nonhormonal contraceptives and anti-HIV agents. **Contraception.** v.76, p.132-138, 2007.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v.29, n.1, p.3-9, 2007.

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, 2009.

HURLEY, R.; LOUVOIS, J. Candida vaginitis. **Postgrad Med J.** v.55, p.645-647, 1979.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.** v. 2005.

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

JOHNSON, S. A. M. Candida (Monilia) albicans. Effect of aminoacids, glucose, pH, chlortetracycline, dibasie sodium and calcium phosphates, and anaerobic and aerobic conditions on its growth. **Arch DermSyph.** v.70, p.49-60, 1954 .

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, p.163-167, 2004.

KARIMUNNISA, S.; ATMARAM, P. Mucoadhesive nanoliposomal formulation for vaginal delivery of an antifungal. **Drug Den Ind Pharm.** 2012.

KENNEDY, M. A.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis caused by non-*albicans* candida species: new insights. **Curr Infect Dis Rep.** v.12, p.465-470, 2010.

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.

KOZINN, P. J.; TASCHHDJIAN, C. L. Enteric candidiasis: diagnosis and clinical considerations. **Pediatrics.** v.30, p.71-85, 1962.

KULKARNI, U. D. et al. Effect of experimental temperature on the permeation of model diffusants across porcine buccal mucosa. **AAPS PharmSciTech.** v.12, n.2, p.579-586, 2011.

KUMAR, M. N. et al. Cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient in vivo gene transfection agents. **J Nanosci Nanotechnol.** v.4, n.8, p.990-4, 2004.

MARINS, J. E. C.; LACAZ, C. DA S.; Terapêutica das candidíases. In: LACAZ, C. DA S. *Candidíases*. São Paulo: EPU, 1977. p.178-190.

LEE, M. et al. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. **Pharm Res.** v.18, n.4, p.427-31, 2001.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int J Pharm.** v.78, p.43-48, 1992.

LEO, E.; BRINA, B.; FORNI, F.; VANDELLI, A. M. *In vitro* evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **Int J Pharm.** v. 278, p. 133-141, 2004.

LI, N. et al. Thermosensitive hydrogel of hydrophobically-modified methylcellulose for intravaginal drug delivery. **J Mater Sci: Mater Med.** v.23, p.1913-1919, 2012.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **Int J Food Microbiol.** v.95, n.2, p.147-155, 2004.

LIU, L. et al. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. **Biomaterials.** v.25, n.16, p.3201-10, 2004.

MAC DONALD, D. O.; WEGNER, M. J. A slide culture technique for the identification of *Candida albicans*. **Tex Rep Biol Med.** v.20, p.128-130, 1962.

MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery. **J Drug Deliv Sci Technol.** v.18, p.375-386, 2008.

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

MARRIOTT, C.; GREGORY, N. P. Mucus physiology and pathology. In: LENAERTS, V.; GURNY, R. *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. Florida: CRC Press, 1990, p. 1-22.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. **Nanomedicine.** v.6, n.5, p.681-688, 2010.

MARTINS, H. P. R. et al. Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. **Acta DermVenereol.** v.92, p.72-82, 2012.

MARTINS, J. E. C. Etiopatogenia e aspectos clínicos das candidíases superficiais, cutâneas e cutâneo-mucosas. In: LACAZ, C. S., *Candidíases*. São Paulo: EPU, 1980. p.79-88.

MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. Disponível em www.medley.com.br/portal/bula/fluconazol_caps.pdf Acesso em: 03 de fev. 2014.

MERCK & COMPANY INCORPORATED. The Merck Index. 13ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2010.

MODI, J.; JOSHI, G.; SAWANT, K. Chitosan based mucoadhesive nanoparticles of ketoconazole for bioavailability enhancement: formulation, optimization, in vitro and ex vivo evaluation. **Drug Dev Ind Pharm.** v.39, n.4, p.540-7, 2013.

MURILLO DE LINARES, L.; MARIN, C. Frequency of yeasts of the genus *Candida* in humans, as pathogens and a part of normal flora. In: Proceedings of the Fourth International Conference on the Mycosis. The black and white yeasts. Washington, Pan American Health Organization, 1978.n.356, p.124-133.

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. et al. Sustained-release progesterone vaginal suppositories 1 – development of sustained-release granule. **Biol Pharm Bull.** v.32, n.2, p.276-282, 2009.

NCCLS. 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.

NUVARING – Merck. Disponível em www.nuvaring.com/Consumer/index.asp Acesso em: 03 de fev. 2014.

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

OGISO, T.; IWARI, M.; PAKU, T. Effects of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, as relationship between penetration parameters and enhancement factors. **J Pharm Sci.** v.84, n.4, p.482-488, 1995.

PARAÍSO, R. L. M. Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). 2012. 141f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2012.

PARIKH, R.H. et al. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. **AAPS PharmSciTech.** v.4, n.2, E13, 2003.

PATIL, S. D.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. Dexamethasone-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres/poly(vinyl alcohol) hydrogel composite coatings for inflammation control. **Diabetes Technol Ther.** v.6, n.6, p.887-97, 2004

PEPPAS, N. A.; SALLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. **Biomaterials.** v.17, p.1553-1561, 1996.

PURCHIO, A. Ecossistemas fúngicos da Baixada Santista. 1978. Tese de livre-docência – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1978.

QI, H. et al. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **Int J Pharm.** v.337, n.1–2, p.178–187, 2007.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydr Res.** v.339, n.16, p.2693–2700, 2004.

RAD, M.M. et al. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. **Infect Dis Obst Gynecol.** 2012.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **Int J Pharm.** v.455, n.1–2, p.219–228, 2013.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine.** p.8-21, 2006.

RIVERA, P. A. et al. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. **J Microencapsul.** v.21, n.2, p.203-11, 2004.

RODRIGUES, F. M. Candidíase vulvovaginal recorrente: tratar é fácil, curar é difícil, 2003. Disponível em: www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?bpid=121&id=675
Acesso em: 03 de fev. 2014.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **Int J Food Microbiol.** v.47, n.1–2, p.67–77, 1999.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Bras Ginecol Obstet.** v.26, n.1, p.65-70, 2004.

SALVATORE, C. A. Candidíase vulvovaginal. In: LACAZ, C. S. *Candidíases*. São Paulo: EPU, 1980. p.119.

SAXENA, B. B. et al. Sustained release of microbicides by newly engineered vaginal rings. **AIDS.** v.15, n.8, p.917-922, 2009.

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. **Quím Nova.** v.26, n.5. São Paulo. Out 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm Bonoarense.** v 21, n.2, p.99-106, 2002.

SEKHAVAT, L.; TABATABAI, A.; TEZERJANI, F. Z. Oral fluconazole 150 mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. **J Infect Public Health**. v.4, n.4, p.195-199, 2011.

SHAIKH, R. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **J Pharm Bioallied Sci**. v.3, n.1, p.89-100, 2011.

SHARMA, D. et al. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. **Thin Solid Films**. v.519, n.3, p.1224–1229, 2010.

SHEN, J. et al. Mucohesive effect of thiolated PEG stearate its modified NLC for ocular drug delivery. **J Control Release**. v.137, p.217-223, 2009.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**. v.4, n.1, 2003.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. **Lancet**. v.369, p.1961-1971, 2007

SODHI, P. K.; MEHTA, D. K. Fluconazole in management of ocular infections due to *Curvularia*. **Ann Ophthalmol**. v.35, n.1, p.68-72, 2003.

SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen. **Int J Pharm**. v.436, n.1–2, p.602–610, 2012.

SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? **Biomacromolecules**. v.9, p. 1837-1842, 2008.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J Control Release**. v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

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.

TAMBE, Y. The Wikimedia Commons. Commons is a freely licensed media file repository with the permission from GNU Free Documentation License (GFDL) for reusing this image. 2005.

TASCHDJIAN, C. L.; REISS, F.; KOZINN, P. S. Experimental vaginal candidiasis in mice its implication superficial candidiasis in humans. **J Invest Derm**. v.34, p.89-94, 1960.

TAYEL, A. A. et al. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **Int J Biol Macromol.** v.47, n.4, p.454-457, 2010.

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/colo/histofisiologia.htm> Acessado em: 02 de fev. 2014.

VALENTA, C.; AUNER, B. G.; LOIBL, I. Skin permeation and stability studies of 5-aminolevulinic acid in a new gel and patch preparation. **J Control Release.** v.107, n.3, p.495–501, 2005.

VAN HUDEN, V. The occurrence of *Candida* and the other yeasts in the intestinal tracts of animals. **Ann N Y Acad Sci.** v.89, p.59-68, 1960.

VAN UDEN, N.; BUCKLEY, H. R. Genus 2. *Candida* Berkhoutapud Lodder, J. In: The yeasts. Amsterdam, 1970, p.893-1087.

VENTURA-LIMA, J. Nanotoxicologia. III Curso de verão de toxicologia da Universidade de Brasília. 2013.

VILA, A. et al. Design of biodegradable particles for protein delivery. **J Control Release.** v.78, n.1-3, p.15-24, 2002.

WANG, L. et al. Preparation, characterization, and in vitro evaluation of physostigmine-loaded poly(ortho ester) and poly(ortho ester)/poly(D,L-lactide-co-glycolide) blend microspheres fabricated by spray drying. **Biomaterials.** v.25, n.16, p.3275-82, 2004.

WEELS, J. I. Pharmaceutical preformulation: the psychochemical properties of drug substances. **Ellis Horwood, Hardcover.** p.21-85, 1988.

YU, C. et al. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloid Surface B.** v.68, p.245–249, 2009.

ZARONI, M.; MENDES, P. H. O.; CAON, T.; MARQUES, M. R. C. Orientações normativas relativas a medicamentos dermatológicos no Brasil e em outros países. In: A regulação de medicamentos no Brasil. VIERIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ZHONG, Z. et al. Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of chitosan. **Carbohydr Res.** v.342, n.16, p.2390–2395, 2007.

ZIANI, K.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO, M.; MATÉ, J. I. Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. **Food Hydrocolloid.** v.23, n.8, p.2309-2314, 2009.

9. Anexos

9.1. Estudo preliminar para avaliação da atividade antifúngica das formulações com FLU para cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*

Os fungos das espécies de *C. albicans*, cepa ATCC 10231, e *C. glabrata* já haviam sido cultivadas e estavam armazenadas com glicerol, em tubos de ensaio, em geladeira. As cepas utilizadas foram proliferadas em triplicata a cada utilização, para sua manutenção no laboratório.

A metodologia utilizada (NCCLA, 2002) foi a mesma para ambas as espécies de *Candida*. Entretanto, os cultivos foram realizados separadamente para minimizar os riscos de contaminação entre os fungos.

9.1.1. Material e Métodos

9.1.1.1. Material

Os ensaios em cultura de fungos foram realizados utilizando Sabouraud dextrose broth e Sabouraud dextrose agar (Neogen Corporation, Lansing, Michigan), glicerina P.A. e NaCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e *resazurin sodium salt* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Todas as análises foram realizadas com água ultrapurificada tipo Milli-Q (Millipore, França).

9.1.1.2. Métodos

9.1.1.2.1. Higienização do material e medidas de segurança

A cultura das cepas, bem como os testes para avaliar a atividade antifúngica das amostras de interesse, foi realizada dentro de uma capela de fluxo laminar (FilterFlux[®]), com abertura suficiente para a entrada das mãos do experimentador. A capela foi higienizada, a cada utilização, com álcool 70% e raios UV, durante 20 min, antes e após o experimento.

Todo o material utilizado para o teste (vidrarias, pipetas, ponteiras, tubos de ensaio, água grau Milli-Q, cubetas, tubos falcon, caneta para vidro, meios de cultura, solução salina) foi autoclavado antes de ser colocado na capela de fluxo laminar. Todas as vidrarias

utilizadas durante o experimento e quaisquer materiais descartados foram autoclavados novamente antes de serem colocados em lixo biológico.

Dentro da capela de fluxo laminar, a parte superior das vidrarias e a alça de platina utilizada para o cultivo do fungo foram flambadas antes e depois de serem manuseadas. Nesse estudo, os equipamentos de proteção individual (luvas, óculos, jaleco e touca) foram utilizados para evitar a ocorrência de contaminações.

9.1.1.2.2. Preparo das soluções e meios de cultura

Os meios líquidos foram preparados com Sabouraud Broth, com concentração igual a 30,0 g/L, em duas alíquotas: 50 mL para cultura do fungo e 200 mL para as diluições posteriores. O meio sólido foi preparado com Sabouraud agar, com concentração igual a 65,0 g/L, e alíquota de 50 mL.

A solução salina e a solução de resazurin foram preparadas com concentrações correspondentes a 0,85% e 0,01% (m/v), respectivamente.

9.1.1.2.3. Cultivo das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*

Primeiro dia

No fluxo laminar, o meio sólido foi vertido dentro de três tubos de ensaio vazios. Os tubos foram inclinados e apoiados na diagonal durante, aproximadamente, 20 min até total solidificação (Figura 1). Os meios sólidos foram armazenados isoladamente na geladeira.



Figura 1 – Preparo do meio sólido com Sabouraud dextrose agar com concentração igual a 65,0 g/L para cultura de fungo.

Posteriormente, o fundo de um tubo de ensaio contendo a cepa do fungo foi aquecido em banho-maria a temperatura de 45°C para facilitar a remoção de todo conteúdo. Na capela de fluxo laminar, o conteúdo do tubo de ensaio (meio sólido com fungo e glicerol) foi vertido em 50 mL do meio líquido e, posteriormente, deixado na estufa a temperatura de 35°C, durante 24 h, para crescimento do fungo.

Segundo dia

A alça de platina foi mergulhada no meio líquido, cultivado no dia anterior e passada levemente sobre o meio sólido (Figura 1). Este procedimento foi repetido três vezes. Os tubos de ensaio foram vedados com algodão e levados novamente à estufa a temperatura de 35°C, por 24 h.

Terceiro dia

Os tubos de ensaio contendo a cultura do fungo, já proliferado, foram retirados da estufa (Figura 2). Em dois tubos foram colocados glicerol, vedados com algodão e armazenados na geladeira. O terceiro tubo foi levado à capela de fluxo laminar.

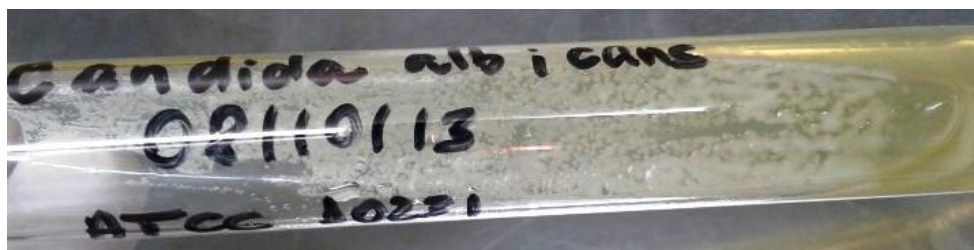


Figura 2 – Proliferação do fungo da espécie *C. albicans*, correspondente à cepa ATCC 10231, em meio de cultura.

Para preparo do inóculo, uma pequena porção do fungo de parte esbranquiçada (conforme a Figura 2) foi raspada com o auxílio da alça de platina e diluído em 5 mL da solução salina. As leituras da solução salina foram realizadas no espectrofotômetro a 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. Em seguida, diluiu-se 1 mL da solução salina com o fungo em 100 mL do meio líquido (diluição 1:100). Posteriormente, 1 mL da última diluição em 20 mL de novo meio líquido

(1:20). Após as duas diluições, o inóculo continha uma quantidade de fungos correspondente de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células/mL (NCCLS, 2002).

As diluições seriadas em placa de 96 poços foram realizadas conforme o esquema representado na Figura 3. Inicialmente, colocou-se 100 μ L do inóculo em todos os poços em que seriam realizadas as triplicatas (Figura 3A). Em seguida, colocou-se 100 μ L das amostras listadas abaixo, somente nos poços da primeira coluna (Figura 3B). Todas as amostras com FLU continham concentração de fármaco igual a 2 mg/mL.

- (i) SOL-FLU;
- (ii) NP-QS;
- (iii) NP-FLU;
- (iv) G-NP-FLU.

O inóculo, somado a amostra, foi homogeneizado e, então, transferiu-se 100 μ L para os poços da segunda coluna. Novamente, homogeneizou-se os poços da segunda coluna e transferiu-se 100 μ L para os poços da terceira coluna. Este procedimento foi repetido 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 3C). Por fim, as amostras controle foram realizadas colocando-se 100 μ L do meio líquido e 100 μ L o inóculo em poços separadamente (Figura 3D). As placas de 96 poços foram colocadas em estufa a temperatura de 35°C para análises em 24 h e 48 h.

Quarto dia

A placa com 96 poços foi retirada da estufa, após incubação por 24 h e, em cada poço, foi colocado 30 μ L da solução de resazurin 0,01%. Após 2 h, os resultados foram analisados visualmente, com a coloração rosa indicando a proliferação do fungo e a cor azul indicando que a formulação eliminou o fungo inoculado.

Quinto dia

A placa com 96 poços foi retirada da estufa após incubação por 48 h, e foram seguidos os mesmos procedimentos do dia anterior.

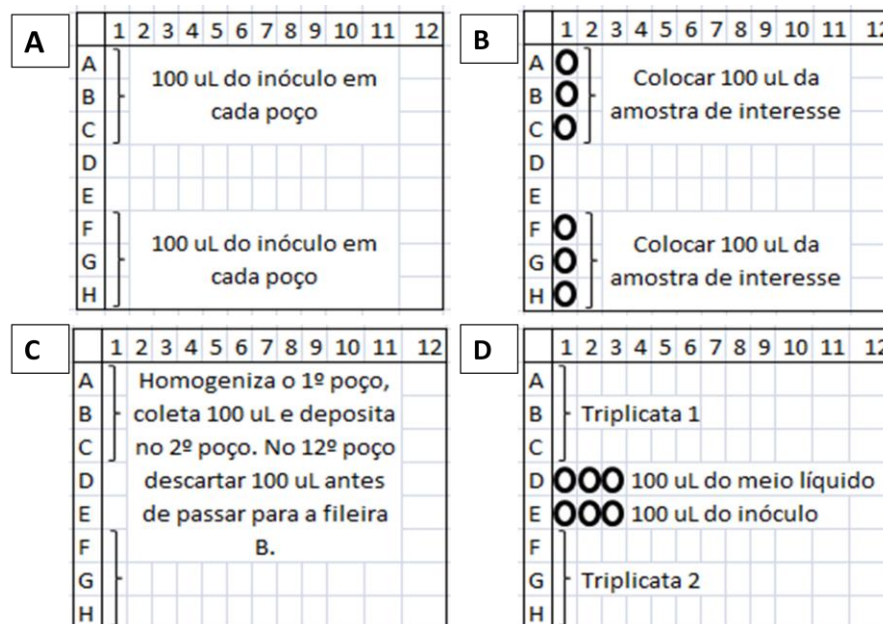


Figura 3 – Esquema simplificado das diluições seriadas em placa de 96 poços para cultura de fungos: 100 µL do inóculo em todos os poços de interesse (A); 100 µL das formulações antifúngicas nos poços da primeira coluna (B); homogeneização de todos os poços, com transferência de 100 µL a cada mudança de coluna (C); brancos com 100 µL do meio líquido e 100 µL do inóculo

9.1.2. Resultados e Discussão

9.1.2.1. Estudos preliminares de avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das NP-QS e NP-FLU para cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*

Os resultados envolvendo cultura de *Candida sp.* foram analisados visualmente, utilizando solução de resazurin 0,01%. Após 2 h de reação entre a solução e o meio de cultura dos fungos, a variação de coloração para azul indica que a formulação eliminou o fungo, enquanto a coloração rosa indica a presença do fungo ainda vivo. A CMI_{total} corresponde à primeira concentração do agente fungicida na diluição seriada a apresentar coloração azul, inferindo-se que aquela concentração é suficiente para eliminar de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células de *Candida*/mL (NCCLS, 2002).

Nos estudos preliminares realizados em culturas de cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* observou-se que os poços correspondentes à aplicação das formulações SOL-FLU e NP-FLU apresentaram coloração rosa assim que entraram em contato com a solução reveladora de resazurin. Independente da concentração de FLU presente no poço,

constatou-se a presença do fungo vivo (Figura 4). Através da análise da amostra pura do inóculo, percebe-se que ele não possuía nenhum tipo de contaminação.

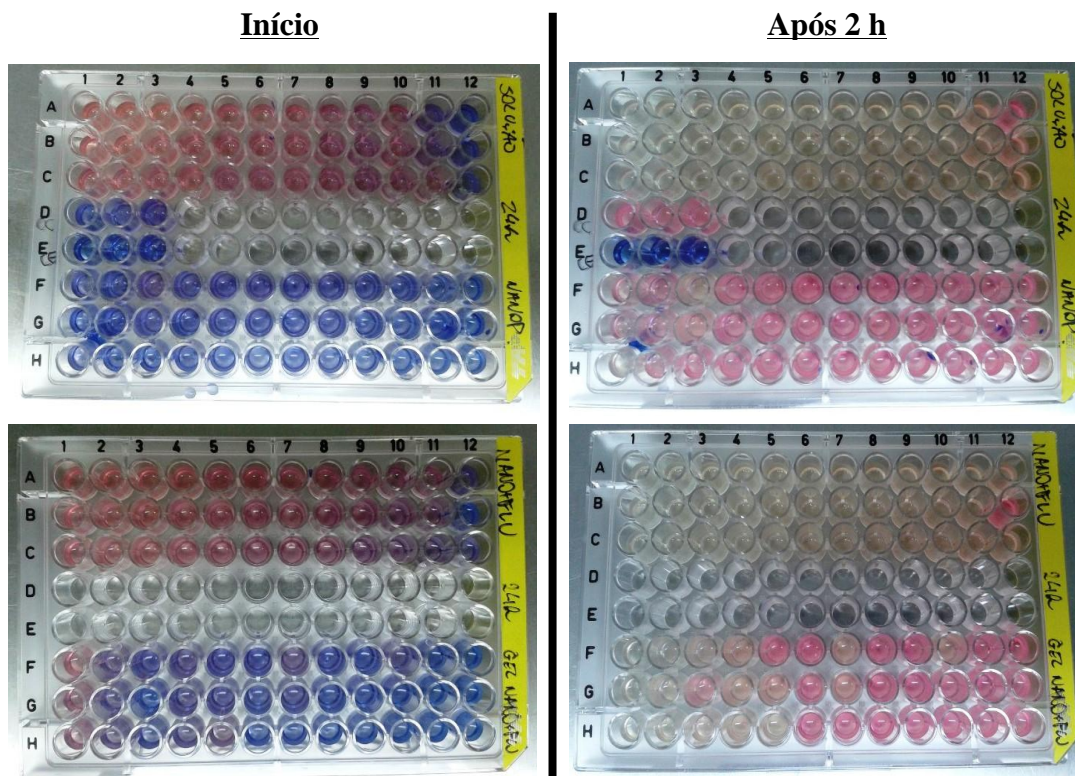


Figura 4 – Revelação com resazurin 0,01% de *C. albicans*, cepa ATCC 10231, após 24 h de incubação em contato com quatro formulações com agentes antifúngicos com concentração inicial de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Cada três fileiras representam uma triplicata, ordenadas de cima para baixo com as formulações: SOL-FLU, NP-QS, NP-FLU e G-NP-FLU.

Algumas formulações podem demorar mais tempo para inibir o crescimento da população de fungos. Portanto, o experimento também foi realizado com período de incubação das formulações em 48 h. No entanto, após esse período, foi observado – inclusive a olho nu – uma maior proliferação das cepas. Os “pontos” brancos no fundo de cada poço, conforme destacado na Figura 5, indicam a presença dos fungos após contato com as formulações desenvolvidas. Confirma-se assim que as concentrações utilizadas não foram suficientes para inibir o crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* utilizadas no ensaio.

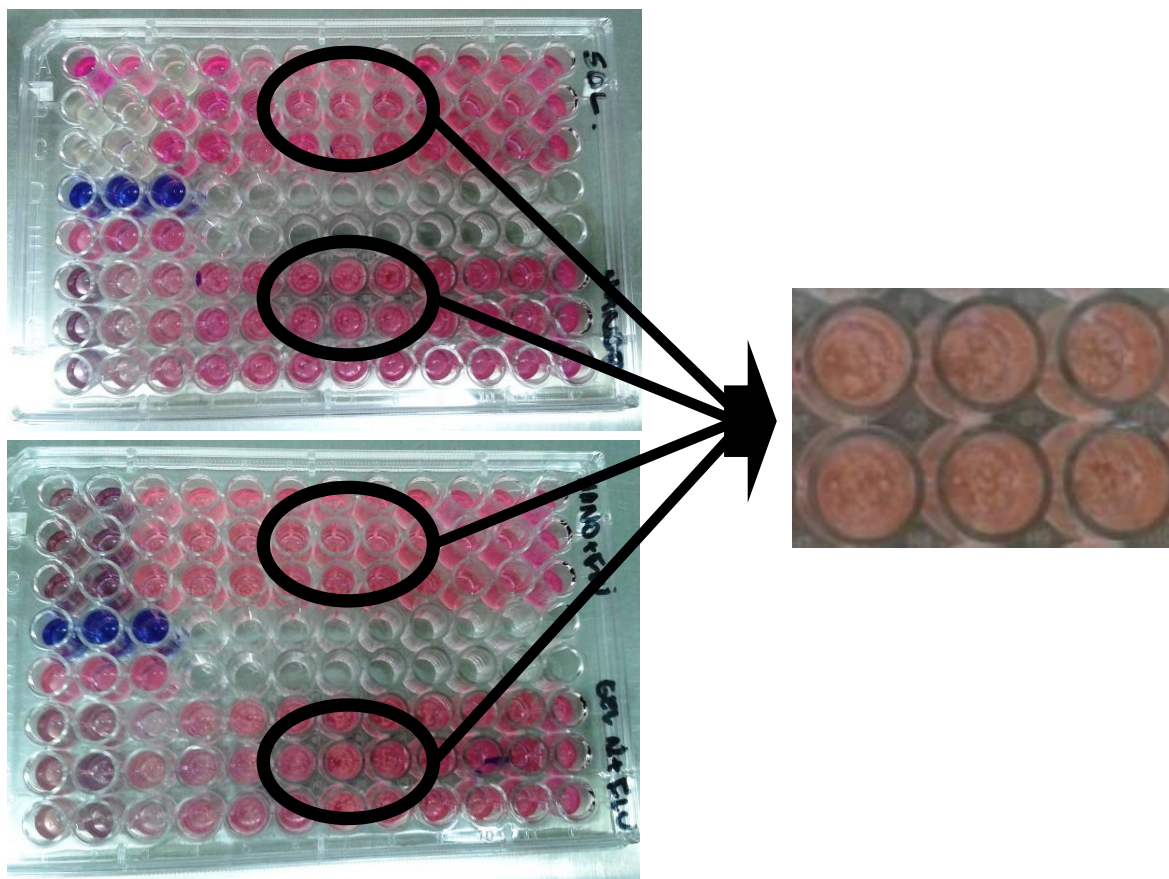


Figura 5 – Revelação com resazurin 0,01% de *C. albicans*, cepa ATCC 10231, após 48 h de incubação em contato com quatro formulações com agentes antifúngicos com concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Cada três fileiras representam uma triplicata, ordenadas de cima para baixo com as formulações: SOL-FLU, NP-QS, NP-FLU e G-NP-FLU.

Considerando que os experimentos foram realizados mais de uma vez, com dois tempos de incubação diferentes (24 h a 48 h), e ainda que a CMI do FLU para espécies de *Candida sp.* varia entre 0,25 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (NCCLS, 2002), conclui-se que as cepas utilizadas no experimento estavam resistentes à ação do fármaco. Esses estudos preliminares devem ser realizados novamente, utilizando novas cepas das duas espécies de *Candida sp.*, para avaliar a eficácia das formulações desenvolvidas em reduzir a carga fúngica de espécies causadoras da CVV.

É importante ressaltar que a QS apresenta propriedades antifúngicas (CRAVEIRO et al., 1999; GUERRA-SANCHEZ et al., 2009; ING et al., 2012; ZHONG et al., 2007; ZIANI et al., 2009) e alguns possíveis mecanismos são descritos na literatura para explicar o potencial antifúngico do polímero natural. O primeiro deles diz respeito à capacidade de interação entre as cargas positivas da QS com os componentes fosfolipídicos carregados negativamente dos fungos. A interação aumenta a permeabilidade da membrana ao

organismo, causando um vazamento do conteúdo celular seguido de morte (GARCÍA-RINCON et al., 2010; LIU et al., 2004). Um segundo mecanismo indica que a QS age como agente quelante, capturando os nutrientes essenciais para o crescimento do fungo (ROLLER e COVILL, 1999). Um terceiro e último mecanismo descrito infere que a QS penetra a parede celular dos fungos, ligam-se ao DNA e afeta diretamente a síntese de enzimas e proteínas essenciais a sobrevivência fúngica (KONG et al., 2010). Dessa forma, este polímero pode agir sinergicamente ao FLU na eliminação dos agentes causadores da CVV.