

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RAYSSA HELLEN FERREIRA COSTA**

**GÉIS MICELARES DE TERBINAFINA PARA TRATAMENTO ANTIFÚNGICO DA  
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**BRASÍLIA**  
**2022**

**RAYSSA HELLEN FERREIRA COSTA**

**GÉIS MICELARES DE TERBINAFINA PARA TRATAMENTO ANTIFÚNGICO DA  
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.

Orientadora: Profa. Dra. Tais Gratieri.

**BRASÍLIA  
2022**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Rayssa Hellen Ferreira Costa**

**Título: Géis micelares de terbinafina para tratamento antifúngico da candidíase vulvovaginal**

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

Aprovada em: 27/05/2022

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Tais Gratieri  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Stephânia Fleury Taveira  
Universidade Federal de Goiás

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília (UnB)** pela oportunidade de aperfeiçoamento, continuidade nos estudos e por ser minha segunda casa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** por me permitir essa importante oportunidade que me fez crescer de uma maneira muito valiosa.

Ao **Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC)**, pela oportunidade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo financeiro que me permitiu dedicação exclusiva ao programa.

À minha orientadora, professora **Dra. Taís Gratieri**, agradeço imensamente 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. Você é um exemplo de farmacêutica, de professora, de pesquisadora e de mulher.

A todos os integrantes do **NanoSYS-UFG**, em especial à professora **Dra. Stephânia Fleury** e a **Ma. Anna Paula Krawczyk Santos** que firmaram parceria e foram fundamentais para que este estudo acontecesse.

Aos professores **Dr. Marcílio Cunha Filho** e **Dr. Guilherme Gelfuso**, pelas grandes contribuições acadêmicas e por dividirem tanto conhecimento.

Às professoras **Dra. Rosane Mansan** e **Dra. Yanna Nóbrega** por cederem os espaços e materiais do laboratório de microbiologia para que eu pudesse desenvolver meus experimentos. Sem a parceria e experiência de vocês, boa parte do meu trabalho não seria possível.

À **Via carnes indústria e comércio Eireli**, em especial ao responsável técnico João Paulo que, sempre cordial como todos os funcionários da empresa, nos recebe na unidade e nos fornece os mais diversos insumos para os estudos de permeação, sempre que necessitamos.

Em meio a tantas pessoas a quem quero agradecer esta conquista, prefiro iniciar agradecendo a **Deus**, que deve ser o grande responsável não apenas por eu ter conseguido realizar esse meu

objetivo, mas, principalmente, por eu ter tido a coragem de ir buscá-lo, trilhando um caminho novo e desconhecido que só tem me dado alegrias e realizações.

À minha família pelo apoio incondicional e incentivo aos estudos, em especial às **minhas mães (Deuzenir, Iris, Eunice e Helena)**, pelo amor, admiração, respeito e compreensão devido minhas ausências para estudos. Vocês são a minha inspiração de vida!

Ao meu marido e melhor amigo, **Jardel Amorim**, que caminha ao meu lado desde antes da graduação e sempre esteve disponível para apoiar meus estudos. Obrigada pela dedicação, amor, paciência, companheirismo, incentivo, compreensão e suporte emocional em todos os momentos difíceis que passei até chegar aqui. Eu te amo demais!

Com o coração muito grato, gostaria de agradecer à **família LTMAC** por todo o compartilhamento de experiências, pelo acolhimento e por terem sido muito prestativos, em me ensinar as técnicas do laboratório, e muito pacientes em entender as minhas limitações.

Aos amigos que fiz na UnB, especialmente **Geisa e Jayanaraian**, pela amizade sincera, pelas angústias e alegrias compartilhadas e, principalmente, pela contribuição fundamental para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

COSTA, Rayssa Hellen Ferreira Costa. **Géis micelares de terbinafina para tratamento antifúngico da candidíase vulvovaginal. Brasília, 2022.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

O presente trabalho propôs avaliar a viabilidade da aplicação de géis micelares e supramoleculares de terbinafina (TB) 2% no tratamento tópico de candidíase vulvovaginal (CVV). Os tensoativos Kolliphor RH40 (RH40) e Gelucire 48/16 (GEL) 20% (p/v) foram utilizados para obtenção de micelas, e o  $\alpha$ CD (5% e 10%) foi adicionada para formar os PPRs. O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão e exatidão, limite de quantificação e detecção, seletividade e recuperação. As micelas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e pH. As formulações foram avaliadas quanto a viscosidade, mucoadesão e permeação na mucosa vaginal, bem como a atividade antifúngica frente às cepas de *Candida*. O método mostrou-se linear, seletivo, preciso e exato na faixa de concentração de 2  $\mu$ g/mL a 30  $\mu$ g/mL. As micelas de TB apresentaram tamanho médio de aproximadamente 15nm, PDI abaixo de 0,3 e potencial zeta de +3 mV. Todas as formulações mantiveram o pH próximo do pH da vagina (5,0). As formulações com  $\alpha$ CD apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viscosidade em comparação com as dispersões sem  $\alpha$ CD. Em relação a mucoadesão, as formulações com 10%  $\alpha$ CD apresentaram a força mucoadesiva estatisticamente superior as demais formulações ( $p < 0,05$ ). As formulações com 10%  $\alpha$ CD demonstraram desempenho *ex vivo* superior quanto à permeação na mucosa vaginal. Em adição, os testes microbiológicos confirmaram que a *C. albicans* e *C. glabrata* são sensíveis à TB com CIM de 8  $\mu$ g/mL e 4  $\mu$ g/mL, respectivamente. As formulações de RH40 sem  $\alpha$ CD e GEL sem  $\alpha$ CD, apresentaram zona inibição superior aos mesmos sistemas com  $\alpha$ CD ( $p < 0,05$ ) para *C. albicans* e *C. glabrata*. De modo geral, os géis com  $\alpha$ CD apresentaram melhores características em relação a viscosidade, mucoadesividade e permeação do fármaco demonstrando que a formação de PPRs é o fator preponderante para o desempenho da formulação. A atividade antifúngica da TB nas formulações foi mantida, visto que todas as formulações formaram halos de inibição comparáveis àqueles formados pelos controles antifúngicos em solução aquosa. As formulações versáteis obtidas revelaram o potencial do uso das micelas e PPR como veículos para o tratamento tópico da CVV.

**Palavras-chave:** Micelas; poli(pseudo)rotaxanos, géis supramoleculares, terbinafina, permeação vaginal, candidíase.

## ABSTRACT

COSTA, Rayssa Hellen Ferreira Costa. **Terbinafine micellar gels for antifungal treatment of vulvovaginal candidiasis. Brasília, 2022.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

The present study aimed to evaluate the feasibility of applying 2% micellar and supramolecular terbinafine (TB) gels in the topical treatment of vulvovaginal candidiasis (VVC). The surfactants Kolliphor RH40 (RH40) and Gelucire 48/16 (GEL) 20% (w/v) were used to obtain micelles, and  $\alpha$ CD (5% and 10%) was added to form the PPRs. The analytical method was validated according to the parameters of linearity, selectivity, precision and accuracy, limit of quantification and detection, selectivity and recovery. The micelles were characterized in terms of mean diameter, polydispersity index, zeta potential and pH. The formulations were evaluated for viscosity, mucoadhesion and permeation in the vaginal mucosa, as well as antifungal activity against *Candida* strains. The method proved to be linear, selective, precise and accurate in the concentration range from  $2\mu\text{g/mL}$  to  $30\mu\text{g/mL}$ . The TB micelles had an average size of approximately 15nm, PDI below 0.3 and a zeta potential of +3 mV. All formulations maintained the pH close to the pH of the vagina (5.0). Formulations with  $\alpha$ CD showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in viscosity compared to dispersions without  $\alpha$ CD. Regarding mucoadhesion, the formulations with 10%  $\alpha$ CD showed a statistically superior mucoadhesive strength than the other formulations ( $p < 0.05$ ). The formulations with 10%  $\alpha$ CD demonstrated superior ex vivo performance in terms of permeation in the vaginal mucosa. In addition, microbiological tests confirmed that *C. albicans* and *C. glabrata* are sensitive to TB with MIC of  $8\mu\text{g/mL}$  and  $4\mu\text{g/mL}$ , respectively. The RH40 formulations without  $\alpha$ CD and GEL without  $\alpha$ CD, showed superior zone inhibition than the same systems with  $\alpha$ CD ( $p < 0.05$ ) for *C. albicans* and *C. glabrata*. In general, the  $\alpha$ CD gels showed better characteristics in relation to viscosity, mucoadhesiveness and drug permeation, demonstrating that the formation of PPRs is the preponderant factor for the performance of the formulation. The antifungal activity of TB in the formulations was maintained, as all formulations formed inhibition halos comparable to those formed by the antifungal controls in aqueous solution. The versatile formulations obtained revealed the potential of using micelles and PPR as vehicles for the topical treatment of VVC.

**Keywords:** Micelles; poly(pseudo)rotaxanes, supramolecular gels, terbinafine, vaginal permeation, candidiasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor feminino.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2. Anatomia da vulva. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3. Estimativa global dos casos de CVVR. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4. Representação da etiologia da CVV.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Estrutura química do Ibrexafungerp.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 6. Estrutura química do Oteseconazol. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7. Estrutura química do cloridrato de terbinafina.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 8. Representação gráfica da estrutura de micelas simples.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9. Representação gráfica da estrutura de micelas mistas.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 10. Estrutura funcional (à esquerda) e estrutura molecular (à direita) da <math>\alpha</math>CD. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 11. Esquema do ensaio de mucoadesão. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 12. Esquema do ensaio de permeação estática. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 13. Esquema do ensaio de permeação vertical. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 14. Representação gráfica do teste de suscetibilidade. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 15. Representação gráfica da curva analítica de TB. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE com detecção em 260 nm.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 17. Sequência ilustrativa do aspecto visual das formulações de TB.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 18. Permeação estática da TB através da mucosa vaginal suína. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 19. Permeação vertical da TB através da mucosa vaginal suína. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 20. Representação de ensaio revelado com resazurina a 0,01% frente à <i>C.albicans</i> ATCC 90028.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 21. Representação de ensaio revelado com resazurina a 0,01% frente à <i>C. glabrata</i> ATCC 90030.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 22. Sequência ilustrativa dos halos de inibição formados frente à <i>C. albicans</i> ATCC 90028. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 23. Sequência ilustrativa dos halos de inibição formados frente à <i>C. glabrata</i> ATCC 90030.....</b>	<b>64</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Condições cromatográficas para quantificação do TB por CLAE.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 2 – Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra-dia e inter-dia.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 3 - Porcentagem de recuperação da TB da mucosa vaginal suína. ....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 4. Representação das formulações desenvolvidas à base de TB. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 5 - Caracterização das micelas simples e mistas de TB.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 6 - Viscosidade e pH das formulações de TB.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 7 - Força mucoadesiva dos géis micelares e supramoleculares de TB. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 8 – Perfil de suscetibilidade da TB, FLU e ITZ frente as cepas de <i>Candida</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 9 – Diâmetro dos halos de inibição formados frente as cepas de <i>Candida</i>.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	American Type Culture Colletion
<b>CFU</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CLSI</b>	Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>CVV</b>	Candidíase Vulvovaginal
<b>CVVR</b>	Candidíase Vulvovaginal Recorrente
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dnm</b>	Diâmetro Médio Hidrodinâmico
<b>FLU</b>	Cloridrato de Fluconazol
<b>GEL</b>	Gelucire® 48/16
<b>ITZ</b>	Cloridrato de Itraconazol
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MIC</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>PDI</b>	Índice de Polidispersividade
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PPR</b>	Poli(pseudo)rotaxanos
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RH40</b>	Kolliphor™ RH40
<b>RH40:GEL</b>	Micelas mistas de RH40 20% e GEL 20% obtidas na proporção 1:1
<b>RPMI</b>	Meio de cultura Memorial Institute Roswell Park
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrose Agar
<b>TB</b>	Cloridrato de Terbinafina
<b>αCD</b>	Alfa ciclodextrina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Anatomia e fisiologia da vagina.....	16
3.2 Epidemiologia da CVV.....	18
3.2.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV) e as características do gênero <i>Candida</i> .....	20
3.2.2 Resistência de <i>Candida</i> spp. frente aos medicamentos comerciais.....	23
3.2.3 Perspectivas atuais de tratamento .....	25
3.2.4 Cloridrato de Terbinafina .....	27
3.3 Sistema de liberação de fármacos na mucosa vaginal.....	29
3.3.1 Sistemas micelares .....	31
3.3.2 Sistemas supramoleculares .....	33
3.3.3 Géis micelares e supramoleculares de terbinafina .....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 Material .....	36
4.2 Métodos .....	36
4.2.1 Preparo da solução estoque de TB .....	36
4.2.2 Padronização de método analítico para quantificação da TB por CLAE.....	36
4.2.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da TB.....	37
4.2.4 Validação do método analítico.....	37
4.2.4.1 Linearidade .....	37
4.2.4.2 Precisão.....	38
4.2.4.3 Exatidão.....	38
4.2.4.4 Limite de quantificação (LQ) .....	38
4.2.4.5 Limite de detecção (LD).....	39
4.2.4.6 Seletividade .....	39
4.2.4.7 Recuperação do fármaco.....	40
4.2.5 Produção das micelas e dos géis supramoleculares de TB.....	40
4.2.5.1 Caracterização das micelares de TB.....	40
4.2.5.2 Determinação da viscosidade das formulações .....	41
4.2.5.3 Estudo <i>in vitro</i> de mucoadesão .....	41

4.2.5.4 Estudo de permeação estática <i>ex vivo</i> .....	42
4.2.5.5 Estudo de permeação vertical <i>ex vivo</i> .....	42
4.2.6 Estudos <i>in vitro</i> da atividade antifúngica da TB.....	43
4.2.6.1 Origem dos microrganismos e aspectos éticos .....	43
4.2.6.2 Manutenção e cultivo de <i>Candida</i> spp. ....	44
4.2.6.3 Padronização do inóculo .....	44
4.2.6.4 Preparo das suspensões de trabalho .....	44
4.2.6.5 Inoculação da placa de microdiluição.....	44
4.2.6.6 Método de difusão em poço .....	45
4.2.7 Análise estatística.....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Método analítico para quantificação da TB por CLAE.....</b>	<b>47</b>
5.1.1 Determinação do Comprimento de Onda ( $\lambda$ ) do TB .....	47
5.1.2 Condições cromatográficas para quantificação do TB por CLAE .....	47
5.1.3 Linearidade .....	48
5.1.4 Precisão e Exatidão.....	49
5.1.5 Limite de quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....	49
5.1.6 Seletividade (estudo dos interferentes) .....	50
5.1.7 Recuperação do fármaco a partir da mucosa vaginal suína.....	51
<b>5.2 Desenvolvimento das micelas e dos géis supramoleculares de TB .....</b>	<b>51</b>
5.2.1 Caracterização das micelas de TB .....	52
5.2.2 Determinação do pH e da viscosidade das formulações.....	54
5.2.3 Estudo <i>in vitro</i> de mucoadesão .....	55
5.2.4 Estudo de permeação em mucosa vaginal suína a partir das formulações .....	56
5.2.4.1 Estudo de permeação estática <i>ex vivo</i> .....	57
5.2.4.2 Estudo de permeação vertical <i>ex vivo</i> .....	58
<b>5.3 Estudos <i>in vitro</i> da atividade antifúngica da TB.....</b>	<b>59</b>
5.3.1 Determinação do perfil de sensibilidade da TB .....	59
5.3.2 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em poço .....	61
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

A candidíase é considerada uma infecção fúngica ocasionada por leveduras do gênero *Candida*. Dentre as inúmeras espécies do gênero *Candida*, a *C. albicans* é a espécie mais isolada, 80-95% dos casos, nas amostras da mucosa vaginal. Entretanto, nos últimos anos, tem sido observado o aumento na frequência das infecções pelas espécies não albicans, como por exemplo, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Essas espécies são mais associadas aos casos crônicos, e podem apresentar resistência aos tratamentos habituais devido ao uso indiscriminado dos antifúngicos tópicos e sistêmicos (BRANDOL et al., 2017; BRADFORD; RAVEL, 2017).

A *Candida* spp. é um fungo comensal pois compõe parte da microbiota humana normal e muitas vezes reside em superfícies mucosas, como a cavidade oral ou o trato gastrointestinal. Além de sua comensalidade, as espécies de *Candida* podem, de forma oportunista, se tornar patogênicas se a microbiota do hospedeiro for interrompida ou se o sistema imunológico do hospedeiro for comprometido. A candidíase pode se apresentar sob diversas formas clínicas, graus de complexidade e manifestações clínicas que vão depender do tecido afetado podendo ser cutânea, mucosa ou sistêmica (ALONSO-MONGE et al., 2021; CAUCHIE et al., 2017; MISHRA; KOH, 2018; VALDERRAMA et al, 2018).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é caracterizada pela multiplicação excessiva de leveduras do gênero *Candida* na mucosa vaginal de mulheres em idade reprodutiva, processo que pode ser favorecido por diferentes fatores predisponentes. A *C. albicans* é a espécie mais comum isolada de pacientes com CVV, sendo responsável por 80-90% dos casos, seguida pela *C. glabrata* que apresenta prevalência de aproximadamente 5% dos casos de CVV por espécies não albicans (BRANDOL et al., 2017; GONÇALVES et al., 2016; SOBEL, 2004).

O tratamento da CVV é feito com o uso de medicamentos antifúngicos, que podem ser administrados por via oral e/ou via tópica. O Ministério da Saúde preconiza alguns protocolos terapêuticos para o tratamento da CVV que incluem antifúngicos do grupo dos azóis e polienos, de forma isolada ou em associação, como fluconazol, miconazol, nistatina, itraconazol, nas apresentações de comprimidos, cremes vaginais e óvulos (CARVALHO et al., 2021).

Nos últimos anos, diferentes cepas de *Candida* spp. têm desenvolvido resistência aos fármacos durante o tratamento e outras já são consideradas intrinsecamente resistentes ou menos suscetíveis a antifúngicos específicos, como o caso da *C. glabrata* que apresenta suscetibilidade intrinsecamente baixa e pode desenvolver resistência durante exposição prolongada à classe de antifúngicos azólicos (BORTS et al., 2005; ARENDRUP;

PATTERSON, 2017). Por conta disso, pesquisadores têm buscado novas alternativas terapêuticas para o tratamento da CVV.

A terbinafina é um antifúngico sintético derivado da alilamina comumente usados em humanos e animais, tendo como mecanismo de ação a inibição do esqualeno epoxidase, uma enzima essencial na biossíntese do ergosterol na membrana celular dos fungos (RYDER, 1989). Atualmente, o medicamento é indicado para o tratamento de fungos patogênicos da pele, cabelo e unhas, incluindo dermatófitos como *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton floccosum* e leveduras do gênero *Candida* (KANAKAPURA; PENMATSU, 2016). Ao longo dos anos, estudos têm apontado o potencial terapêutico da terbinafina para o tratamento seguro e eficaz da CVV (FERAHBAS et al., 2006; CHE et al., 2007; SALEHEI; SEIFI; ZAREI, 2012; YASSIN et al., 2020).

Outra limitação que envolve o tratamento de CVV são os efeitos adversos severos que podem estar associados ao uso oral dos medicamentos antifúngicos, como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, que podem comprometer a adesão e efetividade do tratamento (TRAGIANNIDIS et al., 2021; TVERDEK; KOFTERIDIS; KONTOYIANNIS, 2016; WANG et al., 2010; SONG, DERESINSKI, 2005).

As terapias baseadas na administração tópica de antifúngicos para o tratamento da CVV apresentam algumas vantagens em relação à via oral como evitar o metabolismo de primeira passagem, promover o uso de menores doses do fármaco, proporcionar menor frequência de administração, com conseqüente diminuição da toxicidade e a redução dos efeitos adversos provocados pela administração sistêmica. Por outro lado, a administração tópica de fármacos no canal vaginal apresenta alguns obstáculos como o baixo tempo de residência das formulações convencionais, que pode influenciar no número de reaplicações, baixa absorção e biodisponibilidade do fármaco (LOURENÇO, 2013). Portanto, é altamente desejável projetar formulações que possam melhorar a permeação dos fármacos antifúngicos no tecido-alvo, assim como minimizar os efeitos adversos e, conseqüentemente, melhorar a adesão ao tratamento.

Dessa forma, este projeto propôs avaliar a viabilidade da aplicação de micelas e PPRs de TB 2% como um sistema de liberação na mucosa vaginal para tratamento tópico da candidíase vulvovaginal. A hipótese é que as micelas e os géis supramoleculares possam resistir mais tempo em contato com a mucosa vaginal, aumentando assim a biodisponibilidade local de fármaco. Avaliações *in vitro*, em cultura de *C. albicans* e *C. glabrata* e estudos de permeação *ex vivo* através da mucosa vaginal foram realizados a fim de confirmar tal hipótese.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade da aplicação de micelas e PPRs de TB 2% como um sistema de liberação na mucosa vaginal para tratamento tópico da candidíase vulvovaginal.

### 2.2 Objetivos específicos

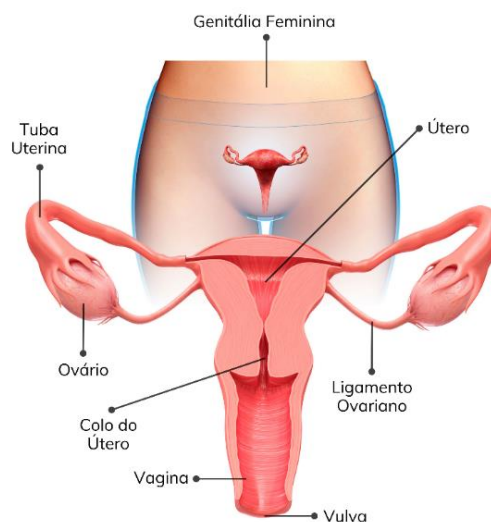
- Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) capaz de quantificar seletivamente a terbinafina extraída da mucosa vaginal suína após experimentos de permeação vaginal;
- Obter diferentes micelas e géis supramoleculares de terbinafina 2%;
- Caracterizar os géis micelares de terbinafina por meio de parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, dispersão do tamanho, potencial zeta e pH;
- Determinar a viscosidade das formulações;
- Avaliar as propriedades mucoadesivas das formulações desenvolvidas;
- Determinar a penetração da terbinafina em mucosa vaginal suína através das formulações desenvolvidas;
- Analisar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* frente à terbinafina, fluconazol e itraconazol por meio do método microdiluição em placa;
- Avaliar a atividade antifúngica dos sistemas desenvolvidos contra *C. albicans* e *C. glabrata* empregando o método de difusão em poço.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

---

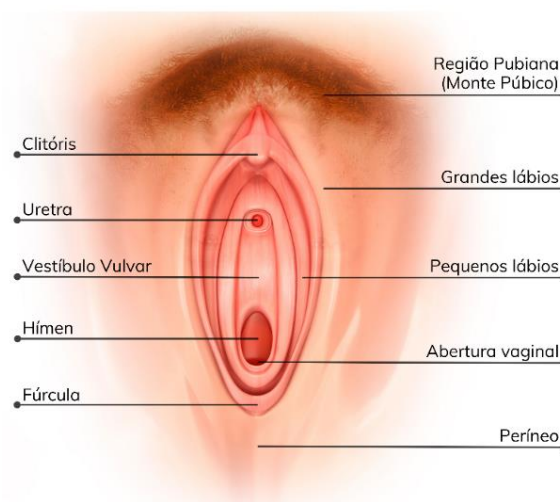
#### 3.1 Anatomia e fisiologia da vagina

O sistema reprodutor feminino, assim como o masculino, possui estruturas internas e externas. No interior da pelve feminina encontramos os ovários, as tubas uterinas, o útero e a vagina. A genitália externa feminina consiste no monte púbico, lábios menores e maiores, clitóris, vestíbulo e bulbo vestibular, como ilustra a Figura 1 (HEITMANN, 2014).



**Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor feminino.**

A vulva é o termo global que descreve todas as estruturas que compõem a genitália externa. Os principais componentes da vulva são o monte púbico, grandes e pequenos lábios, clitóris, bulbos vestibulares, vestíbulo da vulva, uretra e abertura vaginal. Uma das principais funções da vulva é a proteção da vagina (JACKSON et al., 2019; YEUNG; PAULS, 2016).



**Figura 2. Anatomia da vulva.**



A vagina é o órgão genital feminino interno mais superficial caracterizada como um tubo muscular elástico de aproximadamente 10 cm de comprimento que se estende desde a vulva até o colo do útero. A vagina está intimamente relacionada com muitos dos órgãos da região pélvica, uma vez que o canal vaginal está posicionado entre a uretra e a bexiga anteriormente e o reto posteriormente (ALSHIEK et al., 2020; APPELBAUM et al., 2018).

A mucosa vaginal apresenta espessura entre 150 a 200µm sendo revestida por epitélio escamoso estratificado não queratinizado e possui dobras transversais chamadas rugas, que podem ser visualizadas macroscopicamente. A mucosa vaginal é uma superfície úmida, geralmente devido à presença de muco, que reveste as paredes de várias cavidades do corpo, incluindo a vagina (GOLD; SHRIMANKER, 2021). O muco é uma secreção altamente viscosa e translúcida produzida por células caliciformes especializadas e desempenha papel importante no processo de adesão célula-célula, atuando também como lubrificante, permitindo a movimentação entre as células, desempenhando um papel fundamental na bioadesão dos sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos (SHARMA et al., 2012).

O muco cérvico-vaginal (MCV) representa uma mistura de muco vaginal, cervical e uterino e é composto de 92 a 95% de água, íons e 5 a 8% de matéria sólida. A fração sólida é composta predominantemente por glicoproteínas de mucina, proteoglicanos e lipídios. O muco também contém proteínas de defesa, como imunoglobulina A secretora (IgA), lactoferrina e lisozima (LACROIX et al., 2020; ADNANE; MEADE; O'FARRELLY, 2018).

A mucina (MCN) é a principal glicoproteína e corresponde a 90% de todo muco cervical. As glicoproteínas de mucina são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas do muco e são formadas principalmente por carboidratos como N-acetilgalactoseamina, Nacetilglucosamina, fucose, galactose e o ácido siálico. Em pH fisiológico (5,8 – 7,4), o muco fica com carga negativa (devido ao ácido siálico e resíduos de sulfato) e adquire características de um gel fortemente coeso, uma vez que possuem a tendência de se agregar e formar uma rede tridimensional (BANSIL; TURNER, 2018). Estudos sugerem que, em função dessas características conferidas ao muco, a mucina possui um papel chave no processo de mucoadesão. Essa propriedade vem sendo utilizada na área farmacêutica com o intuito de potencializar a permeação de fármacos por meio do aumento do tempo de permanência da formulação em contato com o tecido-alvo (ENGGI et al., 2021; RENÇBER et al., 2021; CAZORLA-LUNA et al., 2019; VIGANI et al., 2019; RENÇBER et al., 2017).

A vagina não contém glândulas, em vez disso, o fluido transuda através da parede vaginal. As células do revestimento contêm alta concentração de glicogênio que é fermentado

pelos *Lactobacillus*, presente na microbiota vaginal, de modo que o ácido láctico seja produzido, tornando a superfície do revestimento levemente ácida (BOSKEY et al., 2001).

O pH vaginal pode representar a saúde da vagina. Fatores fisiológicos podem modular o pH vaginal dependendo da fase da vida da mulher e da fase do seu ciclo menstrual. Aquelas em período não reprodutivo possuem um pH de aproximadamente 4,5, entretanto, durante o período menstrual este número pode variar de 6 a 4. No período de menopausa e pós-menopausa este valor também pode sofrer mudanças, apresentando valores de 4,5 até >5. Este ambiente altamente ácido promove a manutenção da microbiota vaginal e protege a vagina de muitas infecções (GODHA et al., 2018; MILLER et al., 2016).

A microbiota vaginal exerce um papel importante para a manutenção da saúde do trato genital feminino. Em mulheres saudáveis, os *Lactobacillus* spp. são os principais componentes da secreção vaginal, aproximadamente entre  $10^7$  e  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (CFU/mL) (MARTINEZ, 2008). No entanto, o estresse ou desequilíbrios físicos/hormonais como, infecções vaginais, envelhecimento, atividade sexual e duchas vaginais, podem ocasionar mudanças que alteram tanto o pH vaginal como o equilíbrio entre os microrganismos comensais e patogênicos, causando desfechos desfavoráveis, tais como vaginose ou candidíase (LIN, 2021).

### 3.2 Epidemiologia da CVV

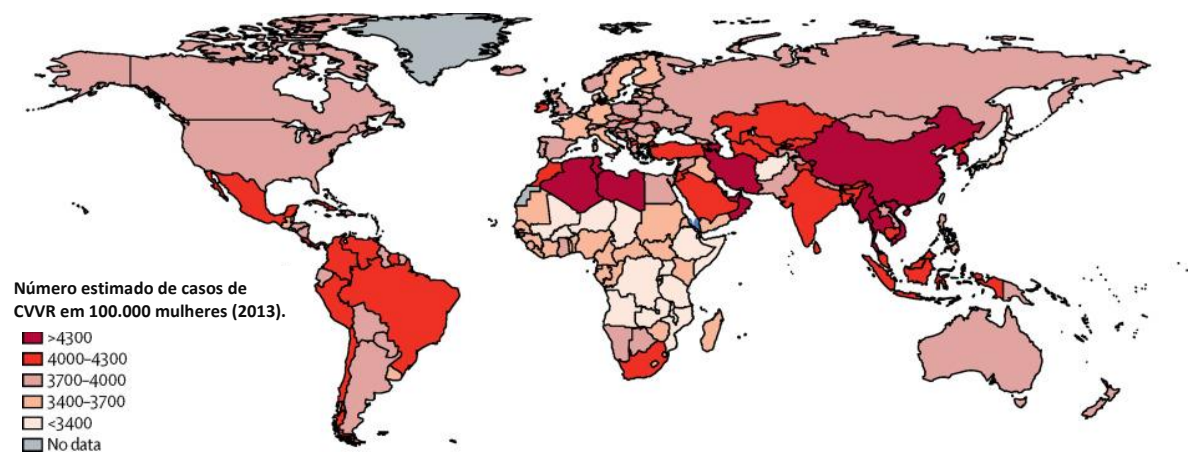
A CVV é a segunda infecção vaginal mais relatada entre as mulheres (BRANDOLT, 2017; CAUCHIE et al., 2017; UNEMO et al., 2013). Estima-se que 70-75% das mulheres terão CVV ao menos uma vez na vida, 50% das mulheres poderão desenvolver a infecção pela segunda vez e que 5-10% delas terão CVV recorrente. A CVV recorrente (CVVR) é definida  $\geq 4$  episódios de CVV em um ano (GONÇALVES et al., 2016; BRADFORD; RAVEL, 2017).

A CVV não é considerada uma doença de notificação compulsória e, portanto, as informações sobre sua prevalência e incidência são incompletas e baseadas em estudos epidemiológicos muitas vezes prejudicados por imprecisões no diagnóstico e/ou pelo uso de populações não representativas (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019).

Rathod e Buffler (2014) buscaram investigar as fontes das estatísticas sobre as características epidemiológicas e clínicas da CVV e CVVR disponíveis na literatura. A investigação possibilitou identificar que os números de incidência e recorrência frequentemente citados na literatura não são, de fato, apoiados por estudos epidemiológicos publicados, mas sim por reformulações de informações derivadas de relatórios não publicados e de opiniões

clínicas de especialistas que conferiu a estes uma “autoridade infundada”. Os autores ainda destacam que estudos de coorte de base populacional são essenciais para estimar a incidência e recorrência da CVV E CVVR e, caso os dados não sejam derivados desse tipo de estudo epidemiológico, não é possível fazer estimativas confiáveis da incidência e recorrência da CVV em uma população. No entanto, recentemente, estudos propuseram avaliar as estimativas de prevalência da CVV e CVVR.

Uma revisão sistemática foi desenvolvida sobre prevalência global de CVVR. Estima-se que, a prevalência mundial de CVVR aproxima-se de 138 milhões de casos por ano, com uma prevalência anual global de 3.871 por 100.000 mulheres (Figura 3), com a maior frequência (9%) em pacientes com idade entre 25 e 34 anos, e um adicional de 372 milhões de mulheres são afetadas por CVVR ao longo da vida, causando morbidade substancial e carga econômica. Além disso, o estudo prevê uma tendência ascendente nos casos de CVVR até 2030 (DENNING et al., 2018).



**Figura 3. Estimativa global dos casos de CVVR.**

Fonte: Adaptado de DENNING (2022).

Um outro estudo buscou fornecer novas estimativas de prevalência da CVV e CVVR com base na análise de dados de 7 países. A prevalência da CVV e CVVR varia de acordo com a idade e a área geográfica. A CVV apresentou prevalência de 23% e a CVVR apresentou prevalência de 9% antes dos 50 anos, com pico entre os 19 e 35 anos (BLOSTEIN et al., 2017).

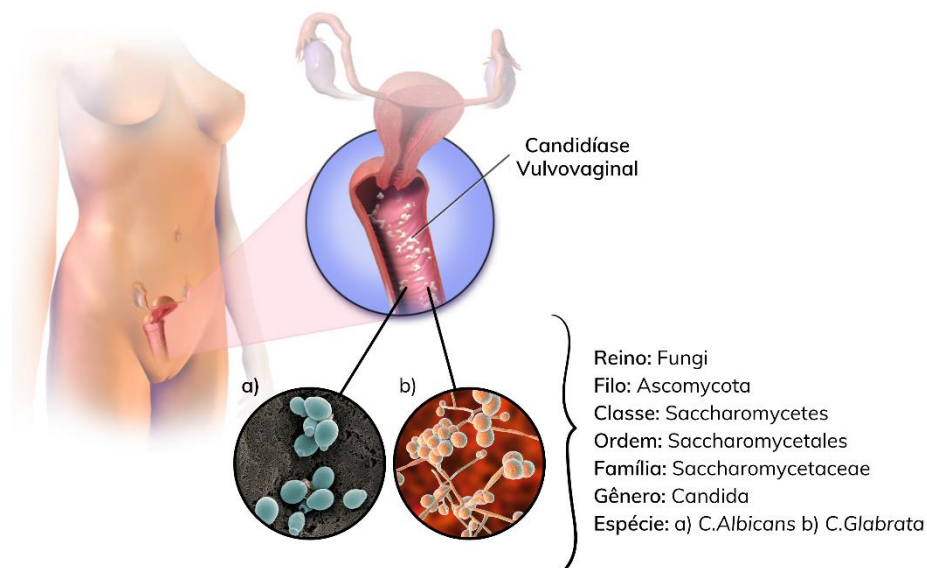
Yano et al (2019) estudaram as perspectivas atuais dos pacientes sobre vários aspectos da CVV E CCVR e identificaram que a prevalência de CVV foi de 78% entre as mulheres participantes do estudo e que, a maioria delas, apresentaram 3 ou menos episódios anuais (65%) e uma proporção menor daquelas com 4 ou mais episódios anuais, a CVVR (35%) predominando na faixa etária de 26 a 40 anos.

No Brasil, a CVV não faz parte da lista de doenças/agravos de notificação compulsória do Ministério da Saúde sendo a sua prevalência estimada com base em estudos transversais em grupos específicos que varia entre 11,8 a 29,7% (DE BRITO MUNIZ, 2018; BRANDOLT et al., 2017; GUNTHER et al., 2014; MASCARENHAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

As estimativas de incidência e prevalência com base automedicação e autodiagnóstico são problemáticas e um grande desafio dada a imprecisão das informações. Muitas pacientes com CVV não buscam atendimento médico e optam pelo autodiagnóstico e a automedicação contribuindo para que a prevalência real da infecção seja desconhecida. Durante o ciclo menstrual é comum que as mulheres apresentem aumento da secreção vaginal que pode ser interpretado como um sintoma de CVV ou CVVR. Essa interpretação pode contribuir para o autodiagnóstico errôneo e a automedicação desnecessária levando desde efeitos adversos a resistência antifúngica (MUÑOZ et al, 2012; CIUDAD-REYNAUD, 2007).

### 3.2.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV) e as características do gênero *Candida*

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção oportunista caracterizada pelo crescimento excessivo de leveduras do gênero *Candida* no sistema reprodutor de mulheres em idade fértil. O gênero *Candida* é amplo e compreende, aproximadamente, 200 diferentes tipos de espécies, que apresentam diversidade nos atributos de virulência e na patogenicidade. Apenas cerca de 10% das espécies são associadas a infecções (Figura 4) (BRANDOL et al., 2017; BRADFORD; RAVEL, 2017).



**Figura 4. Representação da etiologia da CVV.**

A CVV é a segunda infecção vaginal mais relatada entre as mulheres após a menarca (BRANDOLT, 2017; CAUCHIE et al., 2017; UNEMO et al., 2013). Enquanto *C. albicans* é a espécie mais comum isolada de pacientes com CVV, sendo responsável por 80-90% dos casos, a *C. glabrata* é a segunda mais comum, com prevalência de aproximadamente 5% dos casos de CVV por espécies não albicans (GONÇALVES et al., 2016; SOBEL, 2004).

Infecções por *Candida* podem, ocasionalmente, ocorrer em processos de co-infecção, representando menos de 10% dos diagnósticos, porém, quando ocorre, as espécies mais comumente encontradas são *C. albicans* associada a *C. glabrata* (SOBEL, 1998; OLSON; JAYARAMAN; KAO, 2018). Um estudo realizado *in vitro* com epitélio vaginal humano reconstituído demonstrou que na co-infecção de *C. albicans* e *C. glabrata*, a *C. albicans* aumentou a colonização, invasão e dano tecidual de *C. glabrata*, o que também foi evidenciado pela expressão de genes de virulência (ALVES et al., 2014).

A CVV pode ser classificada em duas categorias: CVV simples e CVV recorrente. A CVV classificada como simples tem gravidade leve à moderada, episódios esporádicos, não recorrentes, em uma hospedeira normal, geralmente causada por uma cepa de *Candida* spp. sensível aos antifúngicos comumente utilizados. A CVV recorrente (CVVR) é definida pela ocorrência de 4 ou mais episódios de CVV em um período de 12 meses (SOBEL, 1998).

A causa dessas recorrências é desconhecida na maioria das mulheres, mas em alguns casos, pode estar relacionada à hospedeira imunocomprometida, infecção adquirida do intestino, por meio de contato sexual, falha no tratamento antifúngico e surgimento de linhagens resistentes de *Candida* spp. (KANG et al., 2018; SOBEL, 2016; MTIBAA et al., 2017).

A apresentação clínica da CVV consiste em secreção vaginal espessa, em grumos, e de coloração frequentemente branca, inflamação da vulva, eczema, fissuras e prurido intenso. Apesar da frequência desses sintomas, eles não são específicos da CVV pois são comuns a outras infecções fúngicas e bacterianas (MTIBAA et al., 2017).

Pesquisadores buscaram investigar os erros de diagnósticos de infecções vaginais e demonstraram que, quando foram levados em consideração apenas os sintomas clínicos das pacientes, o diagnóstico foi errado em 77% dos casos de CVV (SCHWIERTZ et al., 2006). Por conta disso, o diagnóstico clínico deve sempre ser confirmado por métodos laboratoriais para garantir o diagnóstico correto e a escolha mais efetiva de tratamento. Os principais métodos utilizados no diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas são a microscopia direta, cultura fúngica e testes de antígenos (SOBEL, 2016; OTAŠEVIĆ et al., 2018).

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae. Apesar de ser um gênero amplo com

mais de 200 espécies, apenas cerca de 30 delas apresentam potencial patogênico sendo isoladas de infecções em humanos (TURNER; BUTLER, 2014).

Embora as leveduras de *Candida* spp. sejam reconhecidas como constituintes da microbiota vaginal, o canal vaginal não é considerado seu principal reservatório, mas sim o trato gastrointestinal (ALONSO-MONGE et al., 2021; CAUCHIE et al., 2017). Em indivíduos imunocompetentes, normalmente não ocorre crescimento excessivo e invasão sistêmica (VALDERRAMA et al, 2018), mas essas leveduras podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável ao seu desenvolvimento. Por conta disso, as espécies do gênero *Candida* spp. são consideradas fungos oportunistas (MISHRA; KOH, 2018).

Dentre os mecanismos pelos quais os fungos emergem de estado comensal para patogênico, destaca-se a plasticidade morfológica que permite a adaptação às diferentes condições impostas pelo hospedeiro por manter a integridade e a viabilidade celular (POULAIN, 2015).

As formas leveduriformes de *Candida* spp. possuem tamanhos variáveis, entre 2 a 11µm de diâmetro e consistem em células simples, ovais, que se reproduzem assexuadamente por brotamento (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Várias espécies do gênero *Candida* spp são dimórficas, ou seja, crescem na forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (TURNER; BUTLER, 2014).

As espécies do gênero *Candida* spp. possuem a parede celular bem definida, com basicamente a mesma composição: quitina, polissacarídeos (glucanas e mananas) e proteínas (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). No entanto, há variações nas proporções destes compostos entre as diferentes espécies do gênero. A parede celular de *C. albicans* é constituída de 60% de β-glucana e cerca de 40% de mananoproteínas e quitina (HUANG, 2012). Já a parede celular de *C. glabrata* apresenta 50% a mais de proteínas e mananas, enquanto apresenta menos glucanas do que *C. albicans*. Além disso, quantidades maiores de quitina são observadas na parede celular da *C. albicans* quando comparadas com *C. glabrata* (DE GROOT et al., 2008; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2013).

Macroscopicamente, as espécies do gênero *Candida* apresentam colônias de coloração branca a creme com texturas cremosas ou membranosas exibindo superfície variável de lisa a sulcada, brilhante ou opaca. De modo geral, as formas das colônias são circulares e as bordas ou margens, regulares a irregulares. Em meio nutritivo, apresentam crescimento dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37 °C (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A patogenicidade da *Candida* spp. é mediada por múltiplos fatores de virulências sendo os mais estudados nos últimos anos: a adesão às células epiteliais, o pleomorfismo, a liberação de enzimas proteolíticas, plasticidade fenotípica, formação de hifas e a capacidade de formação de biofilmes (GONÇALVES et al., 2016; MEDEIROS et. al, 2017; MAJUMDAR et. al, 2016; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Apesar da alta prevalência e do grande número dos inúmeros fatores de risco associados à infecção por *Candida* spp., os mecanismos patogênicos da CVV e da CVVR ainda não foram completamente elucidados (GONÇALVES et al., 2016).

### **3.2.2 Resistência de *Candida* spp. frente aos medicamentos comerciais**

O tratamento da CVV é feito com o uso de medicamentos antifúngicos, que podem ser administrados por via oral e/ou via tópica. O Ministério da Saúde preconiza alguns protocolos terapêuticos para o tratamento da CVV que incluem antifúngicos do grupo dos azóis e polienos, de forma isolada ou em associação, como fluconazol, miconazol, nistatina, itraconazol, nas apresentações de comprimidos, cremes vaginais e óvulos (CARVALHO et al., 2021).

Nos últimos anos, houve um aumento expressivo em relação às infecções ocasionadas pelas espécies de *Candida* spp. que têm levado a um aumento no uso de agentes antifúngicos importantes, como os azóis e equinocandinas, tanto na terapia profilática como na terapia empírica, o que tem sido responsável pelo surgimento de cepas clínicas resistentes aos medicamentos antifúngicos comerciais (MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017).

A resistência de dado microrganismo à determinado fármaco pode ser classificado inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca (ou primária) é encontrada ocorrendo naturalmente entre certos fungos sem exposição prévia ao fármaco, como ocorre na resistência à fluconazol por *C. krusei*. Já a resistência adquirida (ou secundária) é observada em cepas anteriormente sensíveis após a exposição a agentes antifúngicos e geralmente é dependente de expressão gênica alterada (PERLIN et al., 2017).

Ao contrário do mecanismo de resistência aos antibióticos, não existe nenhuma evidência científica de que os fungos são capazes de inativar ou modificar os medicamentos antifúngicos como meio de adquirir resistência, porém a resistência antifúngica está associada a diversos outros fatores como exposição à terapia medicamentosa ineficaz (WHITE, MARR, e BOWDEN, 1988), modificações de mecanismos moleculares pelos fungos (ex: mutação dos receptores do fármaco (PEMAN, CANTON e ESPINEL-INGROFF, 2009), expressão de um

sistema de bombas de efluxo (SANGLARD et al, 1997; ALBERTSON et al, 1996), formação de biofilme (KUHN et al, 2002) e respostas pleiotrópicas (PFALLER, 2012).

O aumento da resistência a azóis e equinocandinas por espécies de *Candida* é um problema cada vez mais sério em ambientes clínicos em todo o mundo. A compreensão dos suscetibilidade, toxicidade e resistência dos fungos a esses medicamentos é imprescindível para determinar a melhor opção terapêutica para o paciente (VIEIRA; NASCIMENTO, 2017; VIEIRA; SANTOS, 2017; LUDWIG et al; 2018).

Os mecanismos atribuídos a resistência aos azóis tanto em *C. albicans* como espécies *Candida* não-albicans estão bem definidos e estão associados principalmente pela mutação do gene ERG11 que codifica a enzima a 14 $\alpha$ -desmetilase, modificando o sítio alvo a ponto de influenciar na afinidade do antifúngico azólico a enzima, impedindo a interação com o fármaco. Outro importante mecanismo de resistência aos azólicos ocorre pela superexpressão do gene ERG11, resultando na produção excessiva da enzima 14 $\alpha$ -desmetilase, tornando necessário aumentar a concentração do fármaco dentro da célula. Três outros mecanismos de resistência aos azólicos são conhecidos: alteração genética do alvo do fármaco Erg11, regulação positiva das bombas de efluxo Cdr1, Cdr2 e Mdr1 e inativação de Erg3 que sintetiza o esterol tóxico (WHALEY et al., 2017; BERKOW; LOCKHART, 2017; HOU et al., 2019; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

A resistência aos antifúngicos da classe das equinocandinas ainda é bastante incomum e raro entre as espécies de *Candida*. O mecanismo de resistência está intimamente ligado a mutações do gene FSK1, que codifica a enzima 1,3- $\beta$ -glucana sintetase, que é o alvo de ação das equinocandinas e é responsável pela síntese de 1,3- $\beta$ -glucana, um componente importante da parede celular das espécies de *Candida*. Na clínica, essa mutação se manifesta pelo aumento das concentrações inibitórias mínimas das cepas de *Candida* e consequentemente na falha terapêutica (PERLIN, 2015; HOU et al., 2019; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

O mecanismo de resistência que isolados clínicos de *Candida spp.* exerce sobre os polienos ainda não foi bem caracterizada, mas é provável que o aumento ou diminuição do ergosterol presente na membrana do fungo possa estar associado aos casos de resistência. Essa resistência pode ser resultado de mutações nos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de ergosterol. Por exemplo, *in vitro*, a ruptura de *ERG3* e *ERG6* causa diminuição dos níveis de ergosterol e resistência à anfotericina B em *C. albicans* e *C. glabrata* (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; CAROLUS et al., 2020).

A terapia atual para o tratamento da CVV compreende poucas classes de fármacos, que se diferenciam principalmente quanto aos seus mecanismos de ação, levando à busca pelo



desenvolvimento de outras estratégias para superar a resistência fúngica, como a descoberta de novos fármacos e/ou atuação em novos alvos fúngicos (XIE et al, 2014).

### 3.2.3 Perspectivas atuais de tratamento

Os fungos, assim como os humanos, são organismos eucarióticos e há uma escassez de alvos seletivos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. Como consequência, e em contraste com os antibióticos, o atual arsenal antifúngico ainda é muito limitado tornando evidente a necessidade pela busca de substâncias mais eficazes e novos mecanismos de ação para o tratamento de infecções fúngicas (SANTOS et al., 2018).

A maioria dos fármacos disponibilizados para o tratamento da CVV são antigos e o ritmo de inovação dentro da área de micoses é muito lento tendo em vista que as primeiras equinocandinas foram aprovadas há 20 anos. O ritmo de desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos é consideravelmente menor quando comparado a outras áreas terapêuticas. No entanto, várias empresas de biotecnologia e universidades têm trabalhado arduamente para colocar no mercado novas opções de tratamento para CVV.

A aprovação do Brexafemme® (Ibrexafungerp) representa o primeiro medicamento aprovado pela FDA em uma nova classe de antifúngicos em mais de três décadas. O Ibrexafungerp é um antifúngico, inibidor da glucano sintase, de amplo espectro pertencente à classe fungerp, desenvolvido pela empresa de biotecnologia Scynexis. O fármaco foi aprovado para o tratamento da CVV e também está sendo testado para o tratamento da aspergilose e outras infecções fúngicas invasivas. O medicamento ainda não é comercializado no Brasil (Figura 5) (SOBEL, 2022; BARNES; YANCEY; FORINASH, 2022; MASONE. 2021).

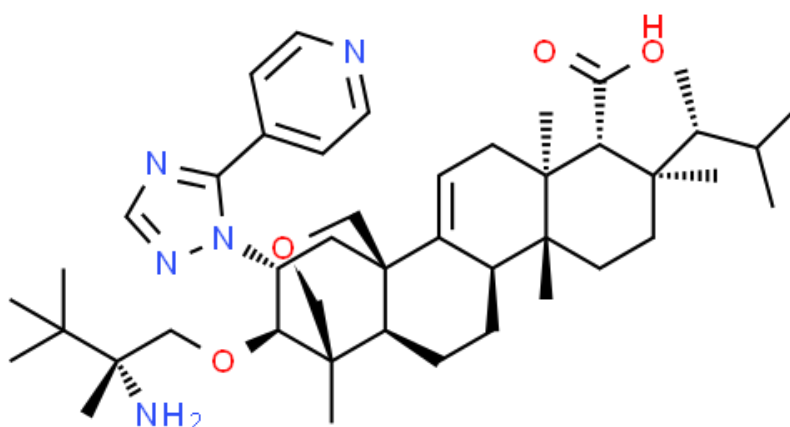
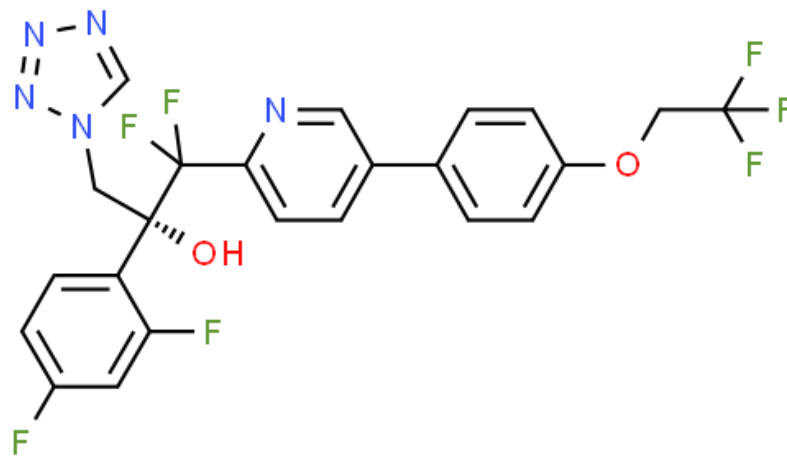


Figura 5. Estrutura química do Ibrexafungerp.  
Fonte: ChemSpider, 2022.

Recentemente, a FDA aprovou o primeiro medicamento para tratamento da CVVR, o Vivjoa® (Oteseconazol). O Oteseconazol faz parte do grupo dos azóis e possui como mecanismo de ação a inibição do CYP51 na parede celular dos fungos, porém diferente dos demais medicamentos desta classe, o oteseconazol tem uma porção tetrazol (anel de cinco membros de quatro átomos de nitrogênio e um átomo de carbono), com seletividade ao alvo melhorada e não se liga ao CYP51 humano. O novo antifúngico oral é indicado para tratamento da CVVR apenas mulheres permanentemente inférteis ou pós-menopáusicas devido aos riscos de toxicidade embriofetal (Figura 6) (SOBEL; NYIRJESY, 2021).



**Figura 6. Estrutura química do Oteseconazol.**  
Fonte: ChemSpider, 2022.

O desenvolvimento e processo de introdução de um novo fármaco no mercado é um grande desafio tendo em vista que é um processo longo, oneroso e caro. A cada 100.000 novas moléculas descobertas, apenas 250 delas são submetidas aos ensaios pré-clínicos e apenas 5 avançam para os ensaios clínicos. Estima-se que, das 100.000 novas moléculas descobertas, apenas uma delas pode chegar ao mercado. Os custos envolvidos no desenvolvimento de um novo fármaco podem chegar a um milhão e meio de dólares (FERREIRA et al., 2009). Tendo em vista a necessidade de reduzir custos e a urgência de novos agentes antifúngicos, o redirecionamento ou reposicionamento de fármacos já existentes no mercado, para outros fins terapêuticos, é uma alternativa promissora e eficaz.

O reposicionamento de medicamentos é um processo de identificação de novos usos terapêuticos para medicamentos antigos/existentes/disponíveis. Nos últimos anos laboratórios acadêmicos têm buscado desenvolver novos sistemas de entrega de fármacos já existentes, para, em princípio, permitir o desenvolvimento de terapias direcionadas, para proporcionar maior

eficácia e toxicidade reduzida, resultando em melhores resultados gerais para os pacientes (PUSHPAKOM et al., 2019).

A maioria dos estudos sugerem o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos, com base nos principais fármacos utilizados no tratamento de CVV, para melhorar a entrega intravaginal do fármaco como géis nanolipídicos, pastilhas à base de complexo polieletrólito de quitosana/ânion e filmes vaginais mucoadesivos de fluconazol (TAKALKAR; DESAI, 2018; KUMAR et al., 2013; DARWESH; ALDAWSARI; BADR-ELDIN, 2018); nanoemulsão de exopolissacarídeos e nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) à base de nistatina (HOSSEINI et al., 2020; SONG et al., 2020); nanopartículas de quitosana e microgéis mucoadesivos carregados de miconazol (AMARAL et al., 2019; KENECHUKWU et al., 2018) e; géis de cristal líquido e nanopartículas de policaprolactona carregadas de itraconazol (LUCENA et al., 2018; TIAN et al., 2022). Outra alternativa para o tratamento da CVV é o reposicionamento de fármacos já existentes no mercado, como é o caso da terbinafina.

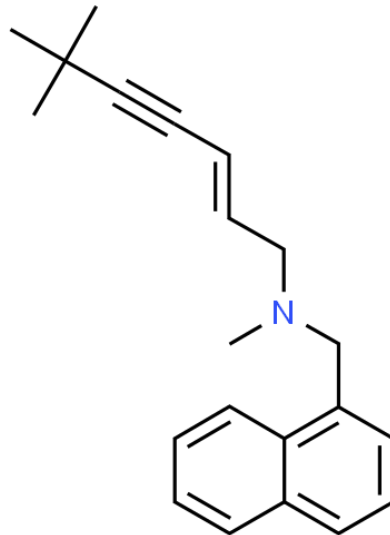
Recentemente, um estudo realizado por Arpa e colaboradores (2020) propôs examinar o possível uso de hidrogéis carregados de terbinafina para aplicação vaginal como parte do tratamento da candidíase vaginal. Polímeros naturais como quitosana, carboximetilcelulose de sódio e carbopol foram usados para o desenvolvimento de géis vaginais de terbinafina e demonstraram atividade antifúngica superior sobre diferentes espécies de *Candida* em relação ao produto comercializado. Os resultados confirmaram que os hidrogéis de terbinafina podem ser propostos como candidatos promissores para o tratamento de CVV.

### 3.2.4 Cloridrato de Terbinafina

O Cloridrato de Terbinafina (TB) (cloridrato de (E)-(N)-(6,6-dimetil-2-hepten-4-ínil)-N-metil-1-naftalenometilamina) é um derivado sintético da alilamina com atividade antifúngica exercendo seu efeito através da inibição da enzima esqualeno epoxidase. A inibição enzimática leva à deficiência de ergosterol na parede celular do fungo e, por sua vez, ao aumento de níveis tóxicos de esqualeno intracelular. Como resultado, o fármaco interrompe a síntese da membrana celular fúngica e inibe o crescimento fúngico. Devido a esses mecanismos, a TB tem efeitos fungistáticos e propriedades fungicidas (GUPTA; FOLEY; VERSTEEG, 2017).

A TB é um pó cristalino fino branco a esbranquiçado, com massa molar de 327,89 g/mol, correspondendo à fórmula molecular de  $C_{21}H_{26}NCl$ . Apresenta faixa de fusão entre 204 e 208 °C. A estrutura química do TB (Figura 9) apresenta um anel naftaleno substituído com cadeia lateral amina insaturada e grupo terminal-butil. O grupamento amina fornece a molécula caráter

básico e apresenta pKa 7,1. A TB apresenta natureza lipofílica (log P 3,3), e queratofílica e desta forma se acumula em pele, unha, cabelos e pelos e no tecido adiposo, apresentando alta permeabilidade e baixa solubilidade em água (0,000738 mg/L) sendo classificado como um fármaco da classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (Figura 7) (KUMINEK et al., 2013).



**Figura 7. Estrutura química do cloridrato de terbinafina.**

Fonte: ChemSpider, 2022.

No Brasil, a TB é comercializada na forma de comprimidos e cápsulas (125 e 250 mg), na forma de cremes (10 mg/g) e sprays de soluções (10 mg/mL). A administração do medicamento é realizada por via oral (250 a 500 mg por dia) ou tópica (1% creme, aplicada uma ou duas vezes por dia), usualmente durante 2 ou 4 dias chegando em até 4 semanas dependendo do tipo de infecção. Atualmente, o medicamento é indicado para o tratamento de fungos patogênicos da pele, cabelo e unhas, incluindo dermatófitos como *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton floccosum* e leveduras do gênero *Candida* (KANAKAPURA; PENMATSA, 2016).

A TB apresentou resultados satisfatórios, em condições *in vitro*, indicando ser altamente ativa contra *C. albicans* e algumas espécies não-albicans, como a *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (apresentando CIM entre 0,03125 a 4 µg/mL) (GARG et al., 2006). Yassin e colaboradores (2020) evidenciaram, em condições *in vitro*, que a terbinafina apresenta CIMs contra *C. albicans* e *C. tropicalis* de 5 µg/ml e 2,5 µg/ml, enquanto suas CMFs foram de 10 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente. Em um estudo realizado *in vivo*, a TB demonstrou seu potencial terapêutico no tratamento da CVV erradicando a infecção em apenas 2-3 semanas de tratamento (FAHIM et al., 2018).

A TB indicada para tratamento oral pode causar alguns efeitos adversos que tendem a ser leves e autolimitados, como reações alérgica, erupção cutânea, alterações na visão, problemas gastrointestinais, náuseas, vômitos, alterações do paladar, perda de cabelo (AGGARWAL et al., 2020; THATAI; SAPRA, 2018), porém na literatura há relatos de casos de hepatotoxicidade induzida pelo uso prolongado de TB (KRAMER; ALBRECHT, 2017; KAUSHAL et al., 2017; CHOUDHARY et al., 2014; PERVEZE et al., 2007). O 7,7-dimetilhept-2-eno-4-inal (TBF-A), metabólito aldeído da TB, pode desempenhar um papel na patogênese de sua hepatotoxicidade (AJIT et al., 2003).

Além disso, como a TB inibe a enzima hepática CYP2D6, podem ocorrer interações medicamentosas quando utilizada em associação com outros medicamentos. A lista de medicamentos com potencial interação inclui, mas não se limita a, antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção da serotonina, betabloqueadores, antiarrítmicos da classe 1C e inibidores da monoamina oxidase (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR et al., 2018).

Levando em consideração a baixa solubilidade em água da TB e os efeitos adversos causados pela administração oral do fármaco e, tendo em vista que não há disponível comercialmente TB para administração vaginal, sistemas micelares e supramoleculares demonstram ser boas alternativas para a administração tópica do fármaco.

### **3.3 Sistema de liberação de fármacos na mucosa vaginal**

As terapias baseadas na administração oral de antifúngicos para o tratamento da CVV geralmente são eficazes; no entanto, existem inúmeros efeitos adversos sistêmicos associados ao seu uso que podem impactar na adesão ao tratamento e conseqüentemente comprometer a efetividade do tratamento. Os efeitos adversos comuns incluem dor de cabeça, náuseas e distúrbios gastrointestinais, bem como anormalidades assintomáticas da função hepática. Além disso, a administração oral de medicamentos pode ser considerada um problema para mulheres que sofrem de distúrbios do trato gastrointestinal, bem como para mulheres grávidas, tendo em vista que os fármacos podem atravessar a barreira placentária e comprometer o desenvolvimento do feto (VALENTA, 2005; BRUSCHI; DE FREITAS, 2005).

Na administração de fármacos, a via tópica apresenta algumas vantagens em relação à via oral como evitar o metabolismo de primeira passagem, promover o uso de menores doses do fármaco, proporcionar menor frequência de administração, com conseqüente diminuição da toxicidade e a redução dos efeitos adversos provocados pela administração sistêmica (LOURENÇO, 2013). As pacientes, geralmente, têm preferência por formas farmacêuticas na

forma de géis ou pomadas para administração no canal vaginal por representar uma aplicação fácil, cômoda e indolor (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005). Por outro lado, os sistemas de liberação de fármacos na mucosa vaginal apresentam algumas limitações que podem influenciar na resposta terapêutica.

As formas farmacêuticas convencionais, como cremes, géis e óvulos, apresentam limitações que envolvem, geralmente, pouca retenção no canal vaginal, rápida remoção pelos fluidos fisiológicos da mulher e, principalmente pelo escoamento da formulação resultando em um baixo tempo de permanência na mucosa vaginal que pode influenciar no número de reaplicações, baixa absorção e biodisponibilidade do fármaco (HUSSAIN; AHSAN, 2005).

Neste contexto, novos sistemas de liberação de fármacos têm sido propostos com o objetivo de controlar a liberação de fármacos no canal vaginal por um período prolongado. Diferentes técnicas vêm sendo adotadas no desenvolvimento de sistemas de liberação como a utilização de nanopartículas, lipossomas e ciclodextrinas, entre outros, para veiculação de fármacos. Assim, sistemas mucoadesivos de liberação vaginal se tornam uma alternativa promissora para contornar os desafios enfrentados pelas formas farmacêuticas convencionais (CARVALHO et al., 2010).

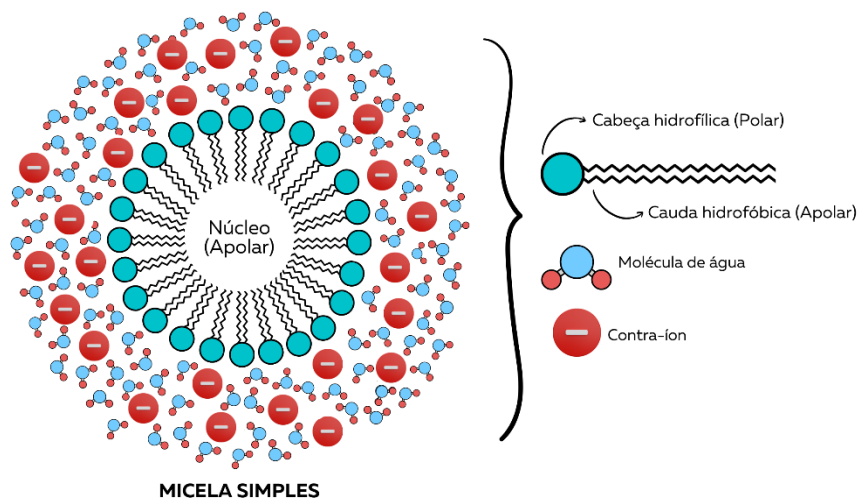
Os sistemas mucoadesivos são extremamente vantajosos por controlarem a taxa de liberação de fármacos, estenderem o tempo de residência, aumentarem a eficácia terapêutica e diminuir a frequência de administração na mucosa vaginal. Esse tipo de sistema apresenta como característica contato íntimo e prolongado da formulação com a mucosa vaginal e alta resistência aos mecanismos fisiológicos de remoção. O principal objetivo desse sistema é promover uma liberação controlada e sustentada do fármaco na mucosa vaginal (PEREIRA; BRUSCHI, 2012). Nos últimos anos, formas farmacêuticas mucoadesivas vêm sendo sugeridas para a liberação de fármacos na vagina, incluindo sistemas sólidos e semissólidos composta por diversos polímeros (RENÇBER et al., 2021; KENECHUKWU et al., 2018; DARWESH; ALDAWSARI; BADR-ELDIN, 2018; RENÇBER et al., 2017).

Dentre as formas farmacêuticas sólidas e semissólidas, cremes e géis vaginais podem ser formulados como emulsões ou hidrogéis para liberação de fármacos. Nos últimos anos vem sendo muito estudado o desenvolvimento de hidrogéis para liberação de fármacos. Os hidrogéis são considerados sistemas carreadores de fármacos, devido suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, permeabilidade e de intumescimento, assim como sua sensibilidade a estímulos. Os hidrogéis são redes tridimensionais insolúveis em água de cadeias poliméricas capazes de reter grandes quantidades de água (DREISS, 2020).

Recentemente, um estudo propôs encapsular a terbinafina (TB) em micelas e géis supramoleculares de poli(pseudo)rotaxanos (PPR) para aumentar a solubilidade do fármaco e obter uma formulação de base aquosa capaz de proporcionar viscosidade adequada para uma melhor permeação ungueal. Os tensoativos Kolliphor RH40 (RH40) e Gelucire 48/16 (GEL) foram utilizados para obtenção de micelas, e a  $\alpha$ CD foi adicionada para formar os PPR. Os resultados do estudo revelaram o potencial do uso de micelas e PPR como veículos para o tratamento tópico de onicomicose (KRAWCZYK-SANTOS, 2020).

### 3.3.1 Sistemas micelares

As micelas são microestruturas automontadas formadas por tensoativos em um sistema aquoso e geralmente têm diâmetro  $< 50$  nm. A porção hidrofóbica das moléculas anfifílicas forma o núcleo das micelas, enquanto a porção hidrofílica forma a casca ou a coroa. As micelas são formadas por tensoativos ou polímeros anfipáticos em solução aquosa em que a região polar está voltada para a superfície externa da micela e a região apolar voltada para o interior formando o núcleo da micela (Figura 8) (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2008; GHOSH; RAY; PRAMANIK, 2020; GRIMAUDO et al., 2019).



**Figura 8. Representação gráfica da estrutura de micelas simples.**

Os segmentos hidrofóbicos na parte interna da micela apresentam elevada capacidade para encapsular compostos hidrofóbicos melhorando a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água. Por outro lado, porções hidrofílicas garante a estabilidade do sistema, entre o núcleo hidrofóbico e o ambiente externo aquoso (MCKENZIE et al., 2015).

A formação das micelas somente acontece a partir da Concentração Micelar Crítica (CMC). Abaixo da CMC, o tensoativo é encontrado na forma de monômero, com o aumento da concentração no meio, a CMC é atingida e há um equilíbrio dinâmico onde as micelas começam a ser formadas. A partir dessa CMC, ocorre a ação da força de atração e da força de repulsão. A força de atração faz com que os unímeros se agrupem de forma organizada formando as micelas, evitando a exposição parte hidrofóbica das moléculas no meio aquoso. A força de repulsão impede que as micelas cresçam indefinidamente. Inúmeros fatores podem influenciar os valores de CMC de um tensoativo. Estes incluem tamanho e estrutura do grupo hidrofóbico, natureza do grupo hidrofílico, adição de eletrólitos e álcool, efeito da temperatura e adição de copolímeros (AHMAD et al., 2014; GHOSH; RAY; PRAMANIK, 2020; GRIMAUDDO et al., 2019; MAKHMALZADE; CHAVOSHY, 2018)

A obtenção de um CMC baixo é interessante, do ponto de vista farmacológico, para sistemas administrados por via vaginal. Ao atingir o tecido-alvo, micelas com valores de CMC alto podem se dissociar em monômeros e seu conteúdo pode ser liberado, visto que o volume de fluídos vaginais em que as micelas estão presentes aumenta muito e uma concentração abaixo da CMC é alcançada (GRALLERT et al., 2012).

A limitação de tais micelas, no entanto, é que a diluição desse sistema leva à sua dissociação. Sistemas mais controlados são as micelas poliméricas, compostas por um núcleo hidrofóbico e uma casca hidrofílica, que são ligadas covalentemente. Micelas poliméricas são nanoestruturas, esféricas, coloidais e supramoleculares, geralmente, formadas a partir da automontagem de copolímeros em bloco anfifílicos que consistem em unidades hidrofílicas e hidrofóbicas em um ambiente aquoso (CAGEL et al., 2017; DESHMUKH et al., 2017).

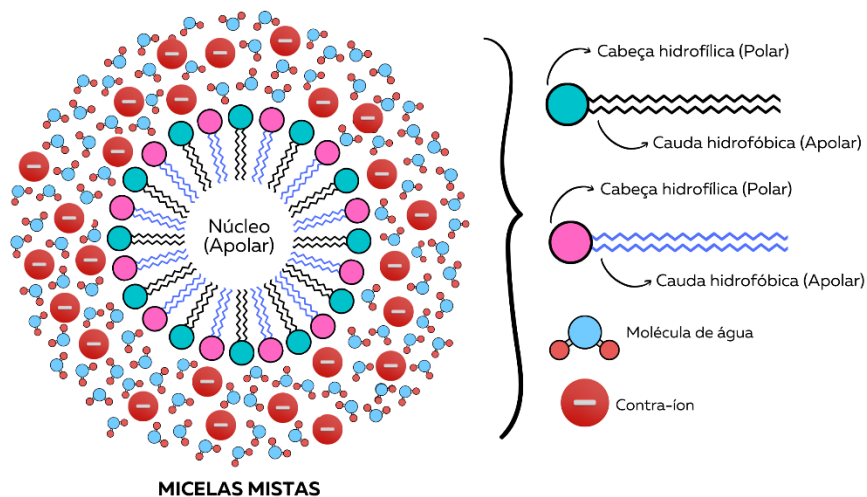
A principal vantagem das micelas poliméricas é a sua capacidade de controlar e sustentar a liberação dos fármacos no tecido-alvo. Como já dito anteriormente, as micelas são estruturas que se formam e se desfazem espontaneamente de acordo com a diluição do meio. Por conta disso, conforme as micelas são desfeitas, o fármaco é liberado aos poucos. Outras características que tornam as micelas poliméricas interessantes são seu alto peso molecular, baixa taxa de dissociação, melhor retenção do fármaco e acumulação sítio específica. De acordo com literatura, o diâmetro médio de micelas poliméricas para aplicações farmacêuticas se encontra na faixa de 10 a 100 nm (ZHANG; HUANG; LI, 2014; CAGEL et al., 2017; DESHMUKH et al., 2017).

O segmento hidrofílico de micelas mais comumente usados para liberação de fármacos é o poli (etilenoglicol) (PEG), com um peso molecular de 2 a 15 kDa. O PEG forma uma coroa hidrofílica na superfície das micelas que minimiza a interação inespecífica com os componentes



do sangue e prolonga o tempo de circulação. O PEG é altamente solúvel em água, não tóxico e com carga neutra proporcionando estabilidade ao sistema e reduzindo a agregação micelar (HWANG; RAMSEY; KABANOV, 2020; MAKHMALZADE; CHAVOSHY, 2018).

Outra estratégia utilizada para melhorar a estabilidade do sistema e a eficácia da encapsulação do fármaco é o uso de uma formulação micelar mista. As micelas mistas são formadas a partir de dois ou mais copolímeros em bloco diferentes e possibilitam uma abordagem direta e conveniente para melhorar a estabilidade física e aumentar as capacidades de carregamento de fármacos (Figura 9). Além disso, os sistemas de micelas mistas podem ser facilmente otimizados em relação ao tamanho e carga superficial, bem como à taxa de liberação do fármaco (SOBCZYŃSKI; CHUDZIK-RZAÐ, 2018; ATTIA et al., 2011).



**Figura 9. Representação gráfica da estrutura de micelas mistas.**

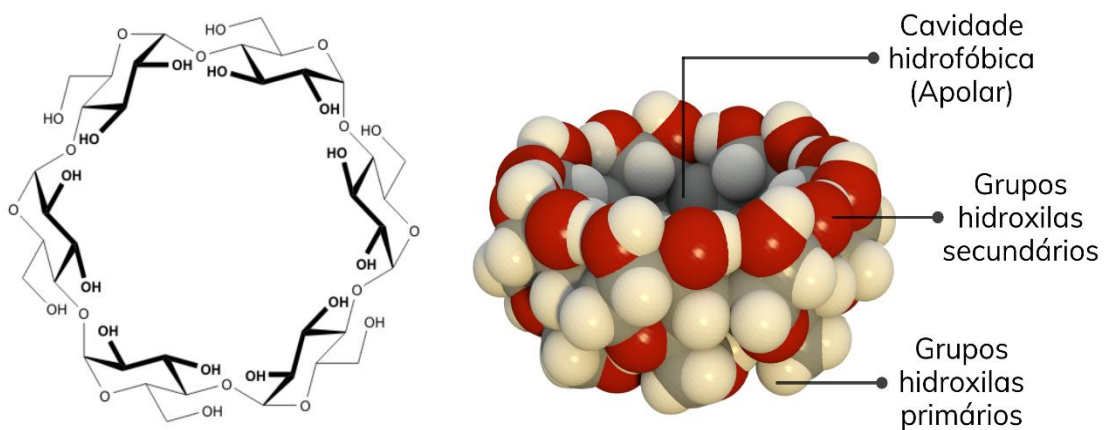
### 3.3.2 Sistemas supramoleculares

Um sistema supramolecular é um conjunto de subunidades moleculares que são organizadas por meio de interações intermoleculares que podem ser iônicas ou covalentes. Essas interações incluem ligações de hidrogênio, coordenação metálica, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e interações iônicas (CHEN et al., 2019; DOMINSKI; KONIECZNY; KURCOK, 2019; MANTOOTH; MUNOZ-ROBLES; WEBBER, 2019).

Os hidrogéis são utilizados como sistemas carreadores de fármacos, devido suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, permeabilidade e de intumescimento, assim como sua sensibilidade a estímulos. Os hidrogéis são redes tridimensionais insolúveis em água de cadeias poliméricas capazes de reter grandes quantidades de água. Os hidrogéis supramoleculares, também conhecidos como “hidrogéis físicos”, diferem dos “hidrogéis

químicos” tradicionais principalmente em suas ligações cruzadas intermoleculares reversíveis e não covalentes que podem ser formadas por diferentes tipos de interações, como a interação hóspede-hospedeiro (DOMINSKI; KONIECZNY; KURCOK, 2019; MANTOOTH; MUNOZ-ROBLES; WEBBER, 2019).

As ciclodextrinas (CDs) são os macrocíclicos hospedeiros mais utilizados em hidrogéis supramoleculares. A CD é uma família de oligossacarídeos cíclicos que são compostos de subunidades de glucopiranosose ligadas por  $\alpha$ -(1,4). As subunidades são compostas por  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD que contêm seis, sete e oito moléculas de glicose, respectivamente. O CD atua como uma molécula hospedeira formando um complexo de inclusão com um hóspede específico através de sua cavidade hidrofóbica (Figura 10) (HUANG et al., 2020; CONCHEIRO; ALVAREZ-LORENZO, 2013; DHIMAN; BHATIA, 2020; JACOB; NAIR, 2018).



**Figura 10. Estrutura funcional (à esquerda) e estrutura molecular (à direita) da  $\alpha$ CD.**

Com polímeros como o PEG, o encadeamento da cadeia através das cavidades dos  $\alpha$ CDs permite a formação de hidrogéis de polipseudorotaxano que exibem propriedades como comportamento tixotrópico de afinamento ao cisalhamento e injetabilidade após a gelificação, devido à natureza dinâmica dos complexos de inclusão. Para formar um hidrogel, as cadeias de PEG precisam ser longas o suficiente para que as regiões dos complexos de inclusão de CD tenham comprimento suficiente para formação da estrutura supramolecular (LORENZO-VEIGA et al., 2019; SIMÕES et al., 2015).

A formação de géis supramoleculares à base de PPR apresenta inúmeras vantagens que estão associadas principalmente a sua biocompatibilidade. Os géis supramoleculares como a possibilidade de serem preparados com diferentes tipos e combinações de polímeros, maior estabilidade da formulação, controle da liberação do fármaco, além de proporcionar maior tempo de permanência e prolongar a permeação de fármacos no local de aplicação devido à

viscosidade proporcionada pelo sistema de liberação (MARCOS et al., 2016; SIMÕES et al., 2015; TAVEIRA et al., 2018).

### 3.3.3 Géis micelares e supramoleculares de terbinafina

Um estudo realizado por Krawczyk-Santos (2021) propôs encapsular a terbinafina (TB) em micelas e géis supramoleculares de poli(pseudo)rotaxanos (PPR) para aumentar a solubilidade do fármaco e obter uma formulação de base aquosa capaz de proporcionar viscosidade adequada para uma melhor permeação ungueal. Os tensoativos Kolliphor RH40 (RH40) e Gelucire 48/16 (GEL) foram utilizados para obtenção de micelas, e a  $\alpha$ CD foi adicionada para formar os PPR. Ambos tensoativos e sua mistura (RH40: GEL, na proporção 1:1) formaram micelas de cerca de 10 nm e um potencial zeta próximo de zero. As formulações mostraram transição sol/gel observada pela inversão dos valores de  $G'$  e  $G''$  nos estudos de reologia. Além disso, a formação da estrutura supramolecular não afetou a solubilidade de TB. As formulações se mostraram seguras através da realização do teste de hemólise de acordo com a ISSO 10993. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram fluxo diminuído para as formulações de PPR comparado às micelas, independente da concentração de  $\alpha$ CD utilizada, como esperado devido a viscosidade aumentada dos sistemas. O estudo de hidratação mostrou a habilidade das formulações de interagir com a membrana ungueal, o que foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura, e refletiu em ótimos resultados de permeação, principalmente para micelas de GEL e PPR (RH40: GEL) obtido com 10%  $\alpha$ CD, que proporcionaram permeação de cerca de 3 vezes mais TB às regiões mais profundas dos cascos comparado às demais formulações. Formulações versáteis à base de água foram desenvolvidas e revelaram o potencial do uso de micelas e PPR como veículos para o tratamento tópico de onicomicose.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Material

Os insumos farmacêuticos utilizados neste trabalho foram: terbinafina (Sigma Aldrich, EUA), fluconazol (Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda, Brasil) e o itraconazol (Roche, Suíça). Os solventes, acetonitrila e metanol, grau CLAE foram adquiridos da J.T Barker (Philisburg, USA). As formulações foram preparadas com Kolliphor RH40® (Ashland, EUA), Gelucire® 48/16 (Gatté Fossé, França) e CAVAMAX® W6 (Ashland, EUA). As correções de pH foram realizadas com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). A Mucina tipo II crua de estômago suíno foi obtida na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para preparação do tampão citrato foram utilizados citrato de sódio e ácido cítrico foram obtidos da Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda (Suzano, São Paulo). As mucosas vaginais suínas foram gentilmente cedidas pelo Via Carnes Indústria e Comércio Eireli (Formosa, Goiás, Brasil). Filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 µm, hidrofóbicos e hidrofílicos, foram comprados de Analítica (São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas utilizando água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Os demais reagentes e matérias-primas utilizados em ensaios específicos estão descritos em suas respectivas seções.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparo da solução estoque de TB

As soluções de estoque de TB (100 µg/mL) foram preparadas dissolvendo 5 mg do fármaco em 50 mL de acetonitrila. As soluções de estoque foram utilizadas para a padronização do método analítico.

#### 4.2.2 Padronização de método analítico para quantificação da TB por CLAE

O método analítico foi desenvolvido com o objetivo de obter a melhor resolução dos picos cromatográficos de TB com desempenho analítico aceitável. O método analítico foi padronizado e validado por um único analista. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema CLAE (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-20AS), um detector DAD espectrofotométrico

(modelo SPDM20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A obtenção dos dados, análises e relatórios foram realizados usando o software Shimadzu LC.

#### **4.2.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da TB**

O espectro de varredura de comprimento de onda para cada fármaco foi obtido individualmente a partir da solução estoque utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800). Foram realizadas varreduras na faixa de 210nm e 260 nm, da solução estoque de TB, preparada a uma concentração igual a 100 µg/mL em acetonitrila, para se determinar o comprimento de onda de maior absorção do fármaco.

#### **4.2.4 Validação do método analítico**

A confiabilidade e o desempenho analítico do método por CLAE foram validados avaliando os parâmetros de linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão, seletividade e recuperação de acordo com as diretrizes da RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção. As soluções estoque de TB (100,0µg/mL) foram utilizadas para a validação do método analítico.

##### **4.2.4.1 Linearidade**

A linearidade do método proposto foi avaliada por meio da construção de uma curva analítica utilizando a solução estoque de TB (100 µg/mL) e a acetonitrila como solvente de diluição. A partir da respectiva solução estoque de TB, obteve-se as concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 µg/mL. Tais soluções foram, então, analisadas por CLAE e os valores de área de seus picos foram plotados em uma curva, correlacionando a área de cada pico (eixo das abcissas) com sua respectiva concentração (eixo das ordenadas). Do gráfico foram extraídos os valores da equação da reta construída que, posteriormente, foram utilizados nas análises para a determinação das concentrações reais de fármaco nas amostras das formulações testadas nos diferentes ensaios, considerando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) = 0,999.

#### 4.2.4.2 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-dia e intra-dia. A precisão foi verificada analisando as diluições de 2,0; 5,0 e 30,0 µg/mL e preparadas a partir das soluções de estoque de TB (100 µg/mL). Foram realizadas triplicatas de cada uma das três concentrações, totalizando nove resultados a serem analisados. Os resultados foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), calculado através da fórmula:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100$$

(Equação 1),

onde: O Desvio Padrão representa a estimativa do desvio padrão da média dos resultados e a Concentração Média representa a média das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

#### 4.2.4.3 Exatidão

A exatidão representa o quão próximo os resultados individuais das amostras analisadas estão de um valor de referência. A exatidão foi verificada da mesma forma que a precisão e utilizou-se as mesmas concentrações já descritas com análises inter- e intra-dia. Os resultados foram expressos em função da porcentagem do erro relativo (E%), de acordo com a fórmula:

$$E\% = \frac{\text{Valor}_{\text{obtido}} - \text{Valor}_{\text{Real}}}{\text{Valor}_{\text{Real}}} \times 100$$

(Equação 2),

onde: Valor<sub>obtido</sub> corresponde à concentração obtida na análise e Valor<sub>real</sub> corresponde à concentração que deveria ser encontrada na análise.

#### 4.2.4.4 Limite de quantificação (LQ)

Para a obtenção do limite de quantificação (LQ) empregou-se a concentração de TB correspondente a 100 µg/mL, as quais foram analisadas por CLAE. Os resultados foram então analisados e o LQ foi definido como a menor concentração com precisão e exatidão dentro dos

parâmetros aceitáveis, que permitem uma variação máxima de até 5%. No presente trabalho foi considerado aceitável  $CV < 5\%$ . O LQ foi determinado através de cálculos baseados na curva de calibração representada pela Equação 3 que segue:

$$LQ = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 10}{\text{Inclinação da curva de calibração}}$$

(Equação 3),

Onde: O desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

#### 4.2.4.5 Limite de detecção (LD)

Para a obtenção do limite de detecção (LD), empregou-se a concentração de TB correspondente a 100 µg/mL, as quais foram analisadas por CLAE. Os resultados foram então analisados e o LQ o menor pico detectável (3 vezes maior que a linha de base) com precisão e exatidão dentro dos parâmetros aceitáveis, que permitem uma variação máxima de até 5%. No presente trabalho foi considerado aceitável  $CV < 5\%$ . O LD foi determinado através de cálculos baseados na curva de calibração representada pela Equação 4 que segue:

$$LD = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 3,3}{\text{Inclinação da curva de calibração}}$$

(Equação 4),

Onde: O desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de detecção.

#### 4.2.4.6 Seletividade

A seletividade dos métodos representa a sua capacidade em dosar uma determinada substância mesmo na presença de outros compostos. Foram preparadas soluções contendo os contaminantes da mucosa vaginal suína, mas sem a contaminação das amostras com o fármaco. Uma alíquota dessas três soluções foi adicionada a uma solução de TB (100 µg/mL). Em seguida, as amostras, contaminadas ou não, foram filtradas em membranas de 0,45 µm e levadas para análise seguindo o método por CLAE, de forma a verificar a capacidade de quantificar e distinguir os fármacos dos interferentes da mucosa vaginal suína.

#### 4.2.4.7 Recuperação do fármaco

Inicialmente, foram extraídas áreas de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup> de mucosa com auxílio de uma tesoura e esses fragmentos foram colocados em frascos de vidro. As mucosas foram então contaminadas com a solução de TB (100 µg/mL) em acetonitrila, correspondendo às concentrações de 2,0; 10,0 e 30,0 µg/mL, respectivamente.

Após a total evaporação do solvente, foram adicionados 5 mL de acetonitrila. Os fragmentos da mucosa vaginal suína ficaram imersos sob agitação por um período de 16h 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. Os resultados foram expressos em função da porcentagem do valor de concentração recuperado (Recuperação%), representada pela Equação 5 que segue:

$$\text{Recuperação\%} = \frac{\text{Concentração}_{\text{obtida}}}{\text{Concentração}_{\text{Real}}} \times 100$$

(Equação 5),

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.

#### 4.2.5 Produção das micelas e dos géis supramoleculares de TB

As dispersões micelares de Kolliphor® RH40 e Gelucire® 48/16 foram preparadas conforme o protocolo a seguir. Primeiramente, foi adicionado a quantidade necessária de polímero para obter a concentração de 20% (p/v) em tampão citrato (pH 5,0) das dispersões de RH40, GEL e da mistura de ambos na proporção 1:1 (RH40:GEL). Em seguida, a TB (2%, p/v) foi adicionada e os sistemas foram mantidos sob agitação magnética por 24 h a 25 ± 2°C. Em seguida, a αCD foi adicionada nas dispersões em diferentes concentrações (5% e 10%, p/v). A mistura foi homogeneizada para formação dos PPR (KRAWCZYK-SANTOS, 2021).

##### 4.2.5.1 Caracterização das micelares de TB

As micelas desenvolvidas foram caracterizadas por meio da determinação do seu diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (PDI) e do potencial zeta. no equipamento ZetaSizer Nano-ZS® pela técnica de espalhamento dinâmico de luz e velocidade



de migração eletroforética, respectivamente. As análises foram realizadas a partir da diluição das dispersões em água destilada (1:5) e filtração em filtros descartáveis de 0,45  $\mu\text{m}$ . Todos os experimentos de caracterização foram realizados em triplicata para cada formulação. Os dados da caracterização das micelas foram analisados no software DesignExpert®.

#### 4.2.5.2 Determinação da viscosidade das formulações

A viscosidade foi determinada utilizando viscosímetro rotacional (Viscosímetro Digital MVS-8, Marte), empregando-se o spindle 1 para os géis sem  $\alpha\text{CD}$ , spindle 3 para os géis com 5%  $\alpha\text{CD}$  e spindle 4 para géis com 10%  $\alpha\text{CD}$ . Os resultados foram expressos em milipascal (m.Pa). A leitura foi realizada no próprio recipiente em que as formulações foram acondicionadas. O spindle foi incorporado à amostra de modo a evitar a formação de bolhas de ar em contato com a superfície do mesmo. As velocidades do rotor empregadas para análise da viscosidade das amostras, com torque próximo a 50%, foram: 15 rpm para os géis sem  $\alpha\text{CD}$ , 60 rpm para os géis com 5%  $\alpha\text{CD}$  e 60 rpm para géis com 10%  $\alpha\text{CD}$ .

#### 4.2.5.3 Estudo *in vitro* de mucoadesão

Foi preparada uma solução de mucina 8% (p/v) em água Milli-Q para o preparo dos discos de mucina. Os discos de mucinas foram preparados utilizando 250mg de mucina e 50  $\mu\text{g/mL}$  da dispersão de mucina (8%, p/v) formando discos com diâmetro de 9mm. O método empregado para caracterizar as propriedades mecânicas de cada formulação foi a análise do perfil de textura (APT) das formulações utilizando um analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems), no modo de força em compressão (Figura 10).

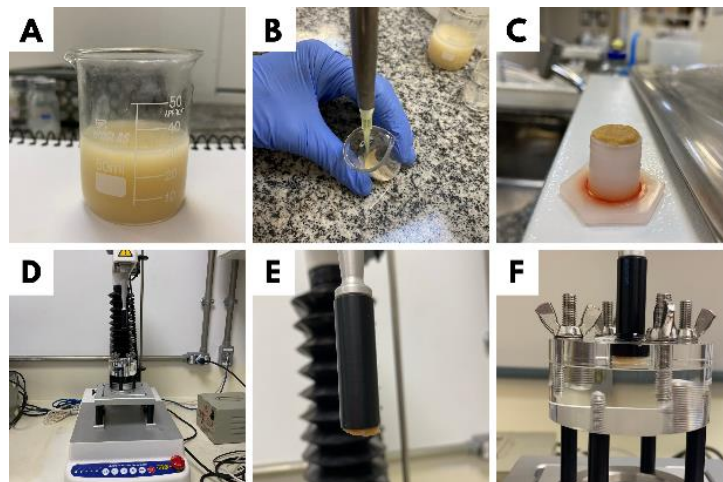
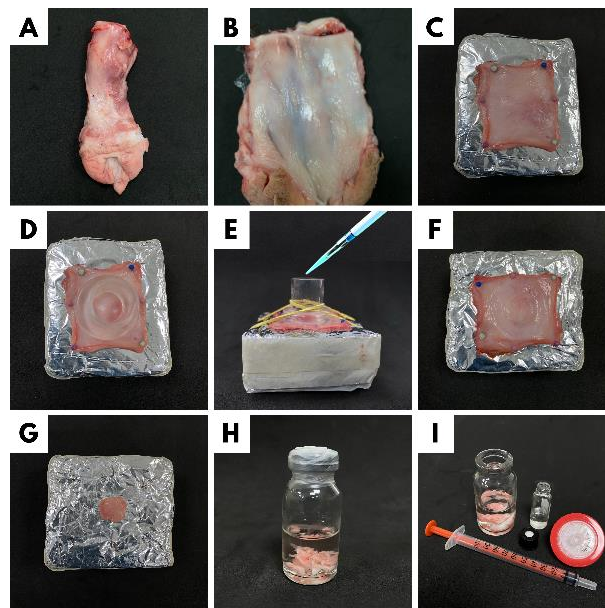


Figura 11. Esquema do ensaio de mucoadesão.

Legenda: (a) solução de mucina 8% (p/v); (b) preparo do disco de mucina; (c) disco de mucina pronto; (d) texturômetro; (e) disco de mucina no probe; (f) ensaio de mucoadesão.

#### 4.2.5.4 Estudo de permeação estática *ex vivo*

Os fragmentos mucosos foram firmemente fixados em um suporte contendo papel filtro embebido em 1 mL de tampão fosfato 0,01 mol/L, pH 7,4, a fim de evitar a desidratação da mucosa. Um compartimento doador de células de difusão de Franz (área de difusão = 1,3 cm<sup>2</sup>) determinou a área de permeação na superfície. O compartimento foi preenchido com 500 µL de cada formulação previamente desenvolvida. Todos os experimentos foram conduzidos por 3 h, em quintuplicata. Ao final do experimento, a mucosa foi retirada do suporte, o excesso de formulação foi removido com papel absorvente e água. A TB contida na mucosa foi extraída por 16h com 5 mL de acetonitrila sob constante agitação e posteriormente a amostra foi filtrada para leitura no CLAE (Figura 12) (PEREIRA et al., 2017).



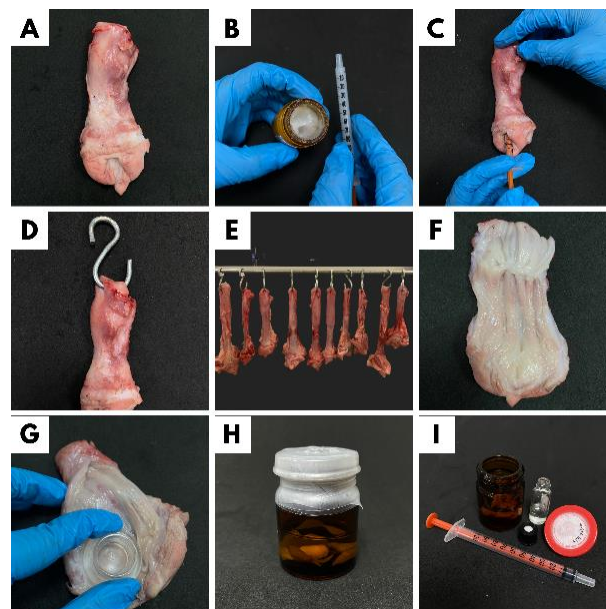
**Figura 12. Esquema do ensaio de permeação estática.**

Legenda: (a) canal vaginal; (b) canal vaginal com corte longitudinal; (c) fragmento da mucosa preso ao suporte; (d) delimitação da área de permeação; (e) aplicação da formulação; (f) área difusional esférica após o experimento; (g) recorte da área permeada; (h) amostra preparada para recuperação; (i) amostra filtrada.

#### 4.2.5.5 Estudo de permeação vertical *ex vivo*

Os ganchos foram colocados a aproximadamente 10 cm da abertura vaginal em todos os ensaios. Em seguida, as vaginas foram colocadas horizontalmente. Em cada canal vaginal, foi inserido uma seringa com 2 mL de cada formulação previamente desenvolvida. O pH das formulações foram ajustados para 4,5–5 para imitar o pH do ambiente vaginal. As vaginas

permaneceram mantidas na posição horizontal por 10 min, permitindo que as formulações interajam com as mucosas. Após esse período, todas as vaginas foram penduradas, simultaneamente, na posição vertical no suporte e mantidas nessa posição por 3h. Após as 3h, as vaginas suínas foram removidas do suporte e colocadas em uma superfície plana. As vaginas suínas receberam cortes longitudinais no canal vaginal para remover fragmentos mucosos. Um compartimento doador de células de difusão de Franz (área de difusão = 1,3 cm<sup>2</sup>) determinou a área de remoção dos fragmentos da mucosa. Os fragmentos foram colocados em um recipiente com 5 mL de acetonitrila sob agitação por 16h. As alíquotas resultantes foram filtradas em filtros de 0,45 m e quantificadas seguindo um método de CLAE para detectar a quantidade de TB extraído da mucosa (Figura 13) (PEREIRA et al., 2017).



**Figura 13. Esquema do ensaio de permeação vertical.**

(a) canal vaginal; (b) formulação e seringa; (c) administração da formulação; (d) mucosa presa ao gancho; (e) mucosas suspensas no suporte; (f) corte longitudinal no canal vaginal após o experimento; (g) delimitação da área de permeação; (h) amostra preparada para recuperação; (i) amostra filtrada para leitura no CLAE.

## 4.2.6 Estudos *in vitro* da atividade antifúngica da TB

### 4.2.6.1 Origem dos microrganismos e aspectos éticos

Foi utilizada, nesta pesquisa, a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 90030 gentilmente cedida pela professora *Yanna Karla de Medeiros Nóbrega e Rosane Mansan Almeida*, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS-UnB). Por ser tratar de uma pesquisa *in vitro* com uso de cepas ATCC, não foi necessário solicitar aprovação do comitê de ética em pesquisa.

#### **4.2.6.2 Manutenção e cultivo de *Candida* spp.**

Todas as amostras empregadas foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 10% e congeladas a -20°C em microtubos de 1,5mL até utilização na pesquisa. Em momento oportuno, os isolados fúngicos foram cultivados a 35°C ( $\pm$  2°C) por 24 horas, em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) para emprego nos ensaios realizados.

#### **4.2.6.3 Padronização do inóculo**

A partir de subcultivos das cepas padrões de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 90030 em SDA a 35°C ( $\pm$  2°C) por 24 a 48 horas, foram preparados inóculos fúngicos. Para isto, foram suspensas colônias em 5mL de solução salina estéril 0,85%, contidas em tubos de ensaios, até obter uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL). O inóculo foi utilizado em até 15 minutos após seu preparo para evitar possível perda de atividade por parte do fungo.

#### **4.2.6.4 Preparo das suspensões de trabalho**

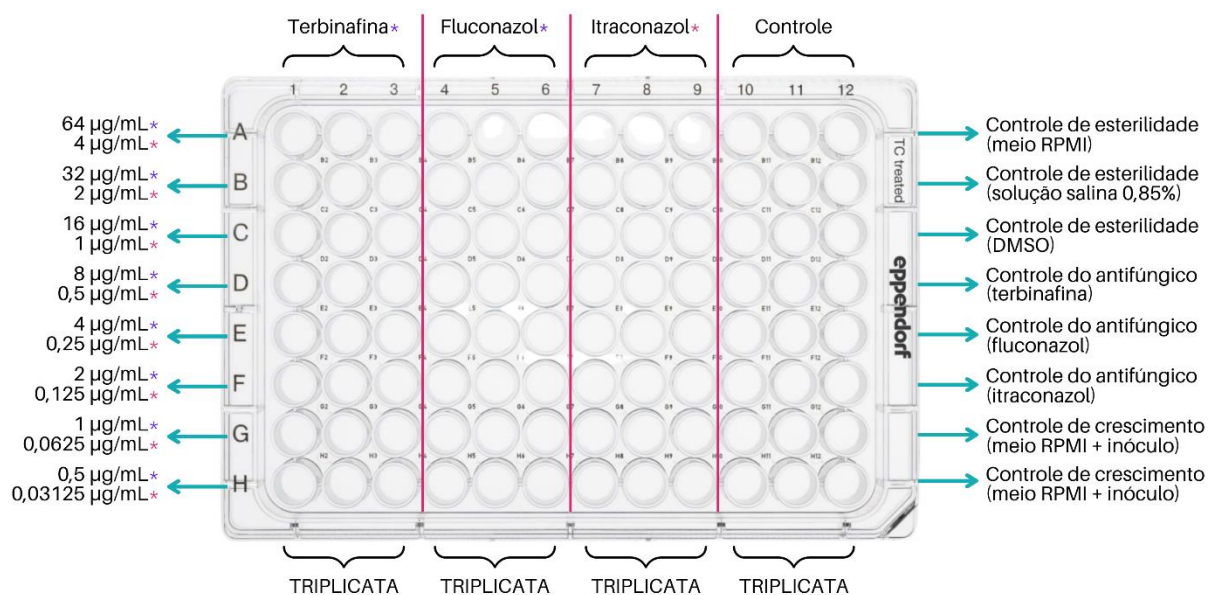
Para que as concentrações de terbinafina (TB), fluconazol (FLU) e itraconazol (ITZ) nos poços da placa de microdiluição estivessem em uma faixa que possibilitasse a visualização dos pontos de concentração inibitória mínima (CIM) do fungo pelo fármaco foram preparadas suspensões de trabalho 200x mais concentradas a concentração final a ser testada. A TB (0,128g), FLU (0,128g) e ITZ (0,008g) foram diluídos em 10mL de DMSO. Em seguida, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:1000 resultando em 2x a concentração final do antifúngico em meio RPMI.

#### **4.2.6.5 Inoculação da placa de microdiluição**

O método de microdiluição obedeceu aos critérios descritos na norma M27-A3 da Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2008).

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços de fundo chato, com tampa individual. Cada coluna da placa representava, ou a replicata de uma diluição seriada, ou um controle de esterilidade ou crescimento. Primeiramente, em todos

os poços da placa foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do inóculo. Em seguida, apenas no primeiro poço de cada triplicata, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do fármaco 2x a concentração final do antifúngico. O inóculo, somado a amostra, foi homogeneizado e, então, transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  para os poços da segunda coluna. Novamente, homogeneizou-se os poços da segunda coluna e transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  para os poços da terceira coluna. Este procedimento foi repetido até a última coluna, onde 200  $\mu\text{L}$  foram descartados, de forma que a concentração em cada poço fosse sempre a metade da concentração do poço anterior. As três últimas colunas foram utilizadas para o controle de esterilidade e de crescimento. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 35° C, por 24 horas. A placa com 96 poços foi retirada da estufa, após incubação por 22 h e, em cada poço, foi colocado 30  $\mu\text{L}$  da solução de resazurin 0,01%. Após 2h, os resultados foram analisados visualmente, com a coloração rosa indicando a proliferação do fungo e a cor azul indicando que o fármaco eliminou o fungo inoculado. Após a incubação final, foi retirada uma alíquota de 10 $\mu\text{L}$  de cada poço que não apresentou crescimento da levedura. Esta alíquota foi semeada em placa contendo o meio Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid Ltda) e incubadas a 37°C por 24h. Ao final do período de incubação, verificou-se o número de CFUs para confirmação da inibição do crescimento de leveduras, quando houve ausência total de crescimento microbiano (Figura 14).



**Figura 14. Representação gráfica do teste de suscetibilidade.**

Legenda: Placa de microdiluição de 96 poços com a designação dos poços reservados para os fármacos e os controles utilizados.

#### 4.2.6.6 Método de difusão em poço

O método de difusão em poço é uma adaptação do método de disco-difusão. Para este método, foram preparadas placas de SDA. As suspensões foram padronizadas de acordo com a turbidez da escala McFarland correspondendo a aproximadamente  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) e inoculadas com o auxílio de alças de Drigalski. A remoção do meio de cultura sólido foi realizada com auxílio de cilindros de 4mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas. Os poços foram preenchidos com 30  $\mu\text{L}$  das formulações de TB 2%. O controle positivo foi o fluconazol e controle negativo foi a solução salina 0,85%. As placas foram incubadas em estufa a  $35^\circ\text{C}$  por 24h. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade antifúngica de cada formulação foi representada na forma de halos de inibição, que foram medidos com auxílio de uma régua milimetrada. A zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço até a margem onde há crescimento de microrganismos (OSTROSKY et al., 2008).

#### **4.2.7 Análise estatística**

Serão utilizados os testes de análise de variância (ANOVA), t-student para amostras pareadas e não pareadas na avaliação de possíveis diferenças entre médias. O valor de  $p < 0,05$  será utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 Método analítico para quantificação da TB por CLAE

O método analítico avaliado neste estudo teve como objetivo a quantificação de TB na presença de contaminantes presentes na mucosa vaginal suína, de onde o fármaco foi extraído para a realização de experimentos de permeação vaginal. Assim, partiu-se de diferentes variações nas condições cromatográficas para otimização do método analítico para a determinação de TB e realizou-se validação do método escolhido em termos de linearidade, seletividade, precisão e exatidão, limite de quantificação (LQ) e limite de Detecção (LD), seletividade e recuperação.

#### 5.1.1 Determinação do Comprimento de Onda ( $\lambda$ ) do TB

A varredura da solução de TB (100  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou dois picos de absorção: o primeiro em 210 nm e o segundo, com maior intensidade, em 260 nm. Inicialmente, os dois comprimentos de onda foram utilizados para as análises realizadas no CLAE. No entanto, verificou-se que em 260 nm os picos referentes a TB nos cromatogramas eram mais intensos, simétricos e proporcionais, sendo, portanto, selecionado para detecção do fármaco em estudo.

#### 5.1.2 Condições cromatográficas para quantificação do TB por CLAE

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-20AS), um detector DAD espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A aquisição de dados, análise e relatórios foram realizados usando o software Shimadzu LC. Utilizou-se uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (150mmx4,6mmx3 $\mu\text{m}$ , Discovery, Supelco) com a fase móvel composta por acetonitrila, metanol e água (60:30:10, v/v), fluxo de injeção de 0.800mL/min, forno na temperatura de 40°C, com volume de injeção correspondente à 5  $\mu\text{L}$  e detecção UV à  $\lambda$  260 nm. O método desenvolvido no próprio laboratório (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições cromatográficas para quantificação do TB por CLAE

Parâmetros do método analítico	Condições cromatográficas
Coluna	Coluna de fase reversa C <sub>18</sub> (150mmx4,6mmx3µm, Discovery, Supelco)
Fase móvel	Acetonitrila, metanol e água (60:30:10)
Fluxo de injeção	0.800mL/min
Temperatura do forno	40°C
Volume de injeção	5 mL
Deteção UV	λ 260 nm
Tempo de corrida	15 minutos
Tempo de retenção	7,5 minutos

### 5.1.3 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). As áreas dos picos plotadas em relação à concentração dos fármacos foram consideradas lineares na faixa de concentração de 2,0 a 30,0 µg/m representada pela figura 15.

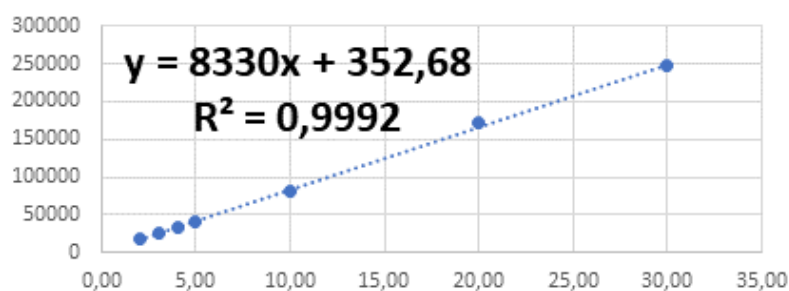


Figura 15. Representação gráfica da curva analítica de TB.

A equações de regressão foi  $y = 8330x + 352,68$  e o coeficiente de correlação da curva padrão foi 0,9992, mostrando alta probabilidade de correlação. Observou-se que o coeficiente de correlação e a análise de regressão estão dentro dos limites estabelecidos tanto pela ANVISA (2017). O método proposto mostrou-se linear, mesmo em uma faixa estendida de sua curva analítica, garantindo mais confiabilidade nos resultados das análises realizadas.



### 5.1.4 Precisão e Exatidão

A precisão de um procedimento analítico é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em análises repetidas e independentes, a partir de um mesmo método (ANVISA, 2017). Ambos os métodos propostos se mostraram precisos e exatos em relação às concentrações analisadas inter- e intra-dia (Tabela 2), levando-se em consideração as especificações estabelecidas pela ANVISA (2017), que estabelecem como aceitáveis valores de precisão e exatidão com variação máxima de 5%.

**Tabela 2 – Análise dos parâmetros de precisão e exatidão intra-dia e inter-dia.**

	<b>Concentração teórica (µg/ml)</b>	<b>Concentração experimental (µg/ml)</b>	<b>Precisão (CV %)</b>	<b>Exatidão (E %)</b>
<b>intra-dia</b> <b>(n = 9)</b>	2,0	2,05	4,14	102,34
	5,0	4,99	3,72	99,74
	30,0	29,06	2,98	96,88
<b>inter-dia</b> <b>(n = 9)</b>	2,0	2,06	1,80	102,80
	5,0	4,96	3,99	99,24
	30,0	29,93	4,60	99,78

A precisão foi avaliada para identificar erros aleatórios que não podem ser controlados, como por exemplo tempo de análise, reagentes, acurácia das vidrarias e preparo de amostras. Para intra-dia e inter-dia, os coeficientes de variação (CV%) variaram entre 1,80% e 4,60%. Esses valores estão de acordo com o máximo limite de 5% proposto pelos órgãos nacionais e internacionais de validação. O método apresentou bons valores de exatidão, estando dentro dos limites aceitáveis para validação de métodos bioanalíticos entre 85% e 115%.

### 5.1.5 Limite de quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

O LD diz respeito à menor concentração do analito na amostra que pode ser detectado, entretanto o valor não necessariamente pode ser quantificado com exatidão (ANVISA, 2017). Já o LQ é referente à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser

analisada com precisão e exatidão aceitáveis considerando as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

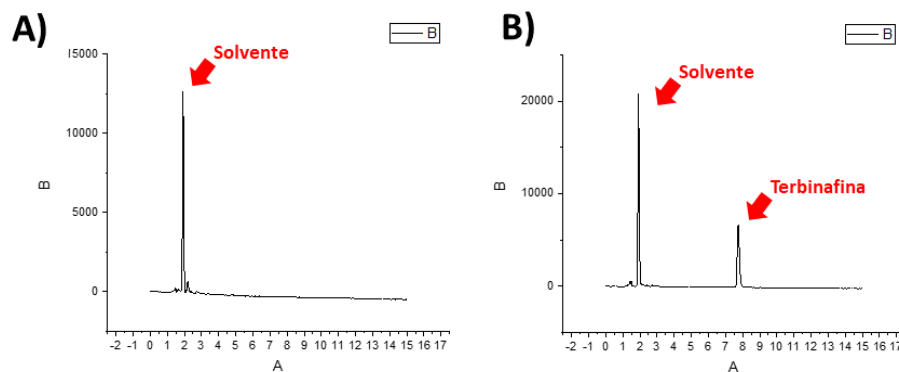
Utilizando-se a metodologia proposta pela ANVISA (2017) obteve-se o valor do desvio padrão (DP) do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Portanto, substituindo-se este valor nas equações 3 e 4, o LQ da TB foi de 0,810  $\mu\text{g/mL}$  e o LD de 0,267  $\mu\text{g/mL}$ .

Os limites foram inferiores ao menor ponto da curva analítica. Dessa forma, o método analítico proposto é sensível para detectar e quantificar, com precisão e exatidão, a TB nos ensaios de permeação realizados.

### 5.1.6 Seletividade (estudo dos interferentes)

A seletividade de um método analítico é a capacidade de identificar e quantificar os fármacos inequivocamente, mesmo em meio à possíveis interferentes presentes na amostra (ANVISA, 2017). A metodologia utilizada para a detecção do fármaco em amostras contendo os diversos meios em que o fármaco se encontrava diluído, ao longo dos experimentos retratados neste trabalho (água MilliQ, acetonitrila e variações destes, somados a filtrado de mucosa vaginal) se mostrou adequadamente seletiva.

Nas condições de análise, os possíveis interferentes não apresentaram resposta detectável e, conseqüentemente, não foram verificadas alterações nos tempos de eluição, ou mesmo alterações nas formas e área dos picos do fármaco, quando comparados aos dados do fármaco em solução (Figura 16). Dessa forma, o método analítico pode ser considerado seletivo para quantificação da TB na mucosa vaginal suína.



**Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE com detecção em 260 nm.**

Legenda: cromatograma referente a mucosa vaginal suína em acetonitrila (à esquerda) e mucosa vaginal suína contaminada com TB em acetonitrila (à direita).

### 5.1.7 Recuperação do fármaco a partir da mucosa vaginal suína

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada em termos de recuperação do fármaco da matriz biológica (mucosa vaginal suína). Os fármacos podem interagir de diversas formas com os componentes da mucosa vaginal e, assim, a recuperação dos fármacos a partir dessa matriz tem como objetivo verificar a capacidade de extração do solvente empregado. Essa etapa permite padronizar o método extrativo, o que garante a quantificação adequada e eficiente dos fármacos (PEREIRA et al., 2017). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de recuperação do TB, em diferentes concentrações, extraídos com 5 mL do solvente selecionado.

**Tabela 3 - Porcentagem de recuperação da TB da mucosa vaginal suína.**

<b>Concentração teórica (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Concentração recuperada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>% de recuperação*</b>
2,0	2,39 $\pm$ 0,54	119,47
10,0	13,45 $\pm$ 0,89	134,49
30,0	41,04 $\pm$ 1,28	136,79

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 3 acima, conclui-se que o processo de extração se mostrou eficiente na quantificação do TB retido na mucosa. Nas três concentrações analisadas, recuperou-se 100% do fármaco adicionado à mucosa e as porcentagens de erro estão dentro do limite aceito para validação de métodos envolvendo processos extrativos ( $\pm 15\%$ ).

### 5.2 Desenvolvimento das micelas e dos géis supramoleculares de TB

As formulações foram preparadas conforme descrito na seção 4.2.5 resultando em 3 grupos de 3 formulações: RH40 sem  $\alpha\text{CD}$ , RH40 com 5%  $\alpha\text{CD}$  e RH40 com 10%  $\alpha\text{CD}$ ; GEL sem  $\alpha\text{CD}$ , GEL com 5%  $\alpha\text{CD}$  e GEL com 10%  $\alpha\text{CD}$ ; RH40: GEL sem  $\alpha\text{CD}$ , RH40: GEL com 5%  $\alpha\text{CD}$  e RH40: GEL com 10%  $\alpha\text{CD}$  (Tabela 4).

Tabela 4. Representação das formulações desenvolvidas à base de TB.

Sistema de liberação de fármacos	Formulação
Micelas simples	RH40 sem $\alpha$ CD e GEL sem $\alpha$ CD
Micelas Mistas	RH40:GEL sem $\alpha$ CD
Sistema supramolecular	RH40 com 5% $\alpha$ CD; RH40 com 10% $\alpha$ CD; GEL com 5% $\alpha$ CD; GEL com 10% $\alpha$ CD; RH40:GEL com 5% $\alpha$ CD e RH40:GEL com 10% $\alpha$ CD

As formulações apresentaram aparência e consistência diversa. A avaliação das propriedades das formulações desenvolvidas é importante para prever e entender o comportamento *in vivo* dos sistemas bioadesivos propostos.

### 5.2.1 Caracterização das micelas de TB

Na Tabela 5 estão os resultados da caracterização das micelas de TB, sendo que o diâmetro médio está representado com os valores da distribuição de tamanho por volume, e, além disso, constam os valores de PDI, e potencial zeta das dispersões contendo os tensoativos ou a mistura deles a 20% (p/v).

Tabela 5 - Caracterização das micelas simples e mistas de TB.

FORMULAÇÃO	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	PDI	POTENCIAL ZETA (mV)
Micelas de RH40	13,54 $\pm$ 0,138	0,042 $\pm$ 0,009	2,17 $\pm$ 0,452
Micelas de GEL	11,83 $\pm$ 0,416	0,172 $\pm$ 0,042	2,36 $\pm$ 0,175
Micelas de RH40:GEL	14,38 $\pm$ 0,202	0,206 $\pm$ 0,021	2,93 $\pm$ 0,252

O baixo peso molecular dos tensoativos e a sua composição semelhante, levou a obtenção de micelas pequenas, com tamanho inferior a 15 nm. O tamanho das micelas pode ser influenciado pela diminuição da agregação micelar ou pela interação que pode acontecer entre as cargas negativas das micelas e as cargas positivas do fármaco levando à diminuição do diâmetro médio (AHMAD; SHAH; SIDDIQ; KRAATZ, 2014; SHARMA; BHATIA, 2004).

O tamanho apresentado pelas micelas somado à outras características possibilitam maior afinidade e penetração das micelas em biofilmes de *C. albicans* tornando a atividade antifúngica mais pronunciada. Além disso, a atividade antifúngica pode ser mais intensificada de acordo com o polímero usado na formação da micela, levando em consideração que a carga catiônica pertencente ao polímero pode levar ao direcionamento das micelas para a parede do biofilme devido à presença de componentes glicoproteicos aniônicos em sua superfície, resultando em interações eletrostáticas (ALBAYATY, Y. N. et al., 2020).

A distribuição do tamanho das partículas, chamado de índice de polidispersividade (PDI), também é um dos parâmetros para analisar a estabilidade física das micelas. O PDI variando de 0.1 a 0.3 indica uma distribuição homogênea de micelas, enquanto que valores acima de 0.3 indicam uma distribuição heterogênea (PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; PINA-BARRERA et al., 2019). O ideal para sistemas micelares é que o PDI se mantenha entre 0,1 a 0,4 (BHATTACHARJEE, 2016), mantendo-se características monodispersas. Os valores de PDI de todas as formulações foram baixos, indicando a uniformidade dos sistemas.

O potencial zeta (ZP) é uma medida da magnitude da repulsão/atração eletrostática ou de carga entre partículas e é um dos parâmetros fundamentais conhecidos por afetar a estabilidade representando a carga presente na superfície das micelas. O alto valor absoluto de ZP pode proporcionar boa estabilidade para o sistema, enquanto essas dispersões apresentam agregação moderada. Se o valor absoluto de ZP for baixo, as forças atrativas podem ultrapassar esta barreira e a dispersão pode quebrar e flocular. Os sistemas micelares apresentaram o potencial zeta de  $\pm 3$  mV que pode estar relacionado à ionização da TB no meio de dispersão, uma vez que apresenta valor de pKa 7,1 e no pH das dispersões a ionização da TB gera cargas positivas. A carga elétrica reduz a tendência de agregação e aumenta a estabilidade da formulação por promover a estabilidade no sistema micelar (KISS et al., 2020; ABDELSAMIE et al., 2016).

Em resumo, as micelas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 15nm, PDI abaixo de 0,3 e residual médio de carga positivo de aproximadamente +3 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.

### 5.2.2 Determinação do pH e da viscosidade das formulações

A consistência da formulação é uma das características-chave mais importantes para a aplicação em mucosas ou pele, portanto, a viscosidade do gel desempenha um papel fundamental pois ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada para o controle da permeação do fármaco.

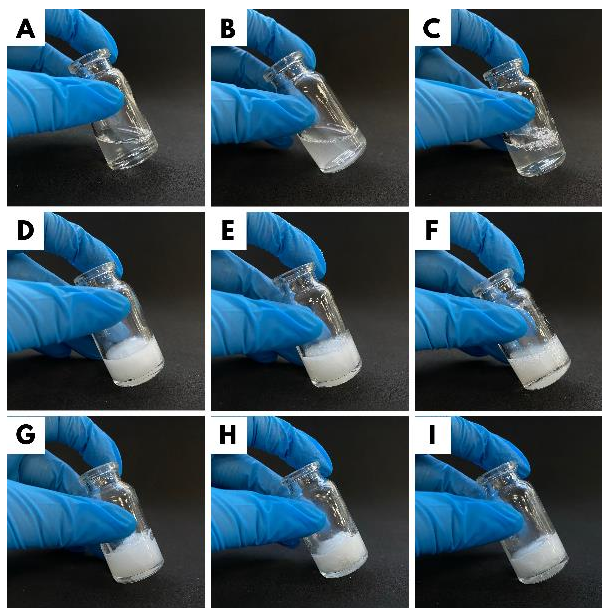
Os sistemas micelares e supramoleculares resultaram em formulações com características semelhantes, embora algumas diferenças de viscosidade e pH tenham sido notadas como mostra a tabela 6.

**Tabela 6 - Viscosidade e pH das formulações de TB.**

FORMULAÇÕES	VISCOSIDADE (mPa.s)	pH
RH40 sem $\alpha$ CD	2796,833 $\pm$ 79,06	4,6
RH40 5% $\alpha$ CD	3269,233 $\pm$ 61,36	4,5
RH40 10% $\alpha$ CD	4954,5 $\pm$ 66,74	4,3
GEL sem $\alpha$ CD	2852,167 $\pm$ 44,40	4,6
GEL 5% $\alpha$ CD	3225,367 $\pm$ 52,8	4,4
GEL 10% $\alpha$ CD	4914,867 $\pm$ 10,45	4,2
RH40:GEL sem $\alpha$ CD	2755,733 $\pm$ 67,34	4,5
RH40:GEL 5% $\alpha$ CD	3210,667 $\pm$ 72,67	4,2
RH40:GEL 10% $\alpha$ CD	5072,733 $\pm$ 71,19	4,2

Os sistemas micelares apresentaram a viscosidade aparente semelhante, porém ao adicionar  $\alpha$ CD aos sistemas para formação de PPR ocorreram mudanças significativas ( $P < 0.05$ ) no perfil de viscosidade. As formulações com 5% e 10%  $\alpha$ CD apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viscosidade em comparação com as dispersões sem  $\alpha$ CD.

A adição de  $\alpha$ CD nas formulações resultou na transição sol-gel e, conseqüentemente, na alteração do aspecto visual das formulações. As formulações de RH40, GEL e RH40:GEL apresentavam aspecto translúcido e levemente opacos, respectivamente, no entanto, ao adicionar  $\alpha$ CD, os sistemas passaram a apresentar um aspecto turvo e esbranquiçado devido o complexo de inclusão decorrente do encadeamento da cadeia dos tensoativos através da cavidade da  $\alpha$ CD (Figura 17) (LORENZO-VEIGA et al., 2019; SIMÕES et al., 2015).



**Figura 17. Sequência ilustrativa do aspecto visual das formulações de TB.**

Legenda: (a) RH40 sem  $\alpha$ CD; (b) RH40 5%  $\alpha$ CD; (c) RH40 10%  $\alpha$ CD; (d) GEL sem  $\alpha$ CD; (e) GEL 5%  $\alpha$ CD; (f) GEL 10%  $\alpha$ CD; (g) RH40:GEL sem  $\alpha$ CD; (h) RH40:GEL 5%  $\alpha$ CD; (i) RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD.

Outro fator importante que pode influenciar no aumento da viscosidade do sistema é a concentração e o peso molecular do PEG utilizado nas formulações. O Kolliphor® RH40 e Gelucire® 48/16 possuem PEG com peso molecular menor que 4000 (SIMÕES et al., 2015; ZHENG; WYMAN, 2016; ROWE et al., 2005).

O pH é uma característica determinante para a estabilidade e para o uso de uma formulação para aplicação cutânea. O uso de tampão citrato para preparar as formulações foi capaz de manter o pH das dispersões próximo a 5,0 sendo compatível com o pH vaginal (GODHA et al., 2018; MILLER et al., 2016).

### 5.2.3 Estudo *in vitro* de mucoadesão

A adesão pode ser definida como a capacidade de um material aderir a uma superfície mucosa. A mucoadesão baseia-se na interação entre os polímeros presentes nas formulações e a camada de mucina que reveste a superfície da mucosa vaginal. Os sistemas mucoadesivos são necessários para aumentar o tempo de retenção de uma forma farmacêutica na membrana mucosa vaginal (PEREIRA; BRUSCHI, 2012; SHAIKH et al., 2011; QI et al., 2007).

A avaliação do potencial mucoadesivo foi conduzido por um teste utilizando disco mucina. A força necessária para separar o disco de mucina da superfície do gel está descrita na Tabela 7.

**Tabela 7 - Força mucoadesiva dos géis micelares e supramoleculares de TB.**

FORMULAÇÕES	FORÇA (GN/cm <sup>2</sup> )
RH40 sem $\alpha$ CD	5,5 $\pm$ 1,60
RH40 5% $\alpha$ CD	15,03 $\pm$ 0,55
RH40 10% $\alpha$ CD	36,43 $\pm$ 3,70
GEL sem $\alpha$ CD	6,23 $\pm$ 0,55
GEL 5% $\alpha$ CD	11,56 $\pm$ 1,71
GEL 10% $\alpha$ CD	17,63 $\pm$ 1,40
RH40:GEL sem $\alpha$ CD	5,36 $\pm$ 0,75
RH40:GEL 5% $\alpha$ CD	9,26 $\pm$ 1,15
RH40:GEL 10% $\alpha$ CD	17,20 $\pm$ 1,96

Todas as formulações demonstraram propriedades mucoadesivas, porém os géis supramoleculares, formulações com  $\alpha$ CD, apresentaram maior adesividade em comparação com os sistemas micelares, sem  $\alpha$ CD. De fato, o que se observou foi que as formulações com 10%  $\alpha$ CD apresentaram a força mucoadesiva estatisticamente superior as demais formulações ( $p < 0,05$ ). Este resultado é mais um indício de as formulações desenvolvidas apresentam propriedades mucoadesivas, aumentando o tempo de permanência da formulação na mucosa vaginal, e que seriam um sistema adequado para tornar possível a terapia tópica de CVV.

As moléculas anfifílicas híbridas, como Kolliphor RH40 e Gelucire 48/16, apresentam propriedades físicas e químicas que aumentam a resistência do material, estabilidade térmica e física, além da possibilidade de modulação da forma farmacêutica e apresentar características de mucoadesão, aumentando o tempo de contato da formulação com a mucosa vaginal (OSHIRO et al., 2018).

#### **5.2.4 Estudo de permeação em mucosa vaginal suína a partir das formulações**

A permeação do fármaco pelo tecido vaginal pode ser estimada por meio de modelos, *ex vivo* e *in vivo*. Estes últimos, embora mais realistas, assumem limitações éticas e biológicas devido ao manejo animal. Portanto, modelos *ex vivo* foram desenvolvidos para prever a absorção do fármaco pela vagina (MACHADO et al., 2015).

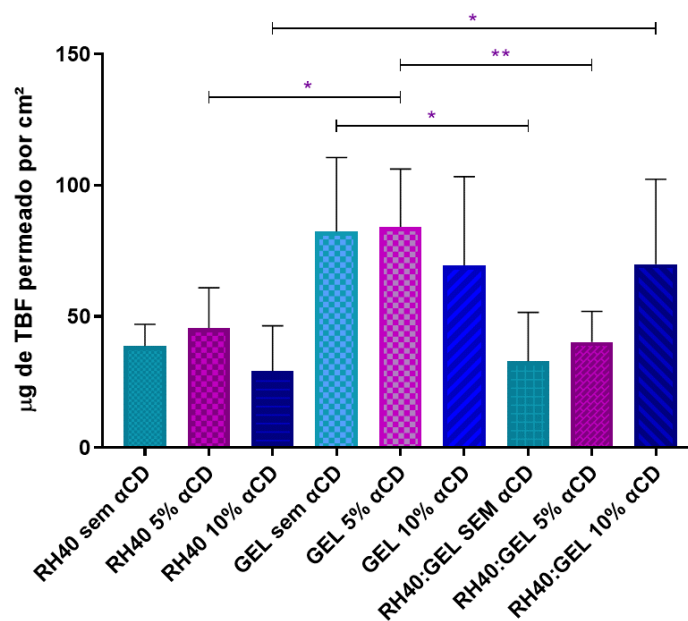


Para os estudos de permeação, em substituição a vagina humana, a espécie suína revelou ser vantajosa frente a outras espécies. A vagina suína é notavelmente similar à vagina humana devido às semelhanças relacionadas a anatomia, fisiologia, metabolismo e patologia conforme evidenciado na literatura (VAN EYK; VAN DER BIJ et al., 2005; SQUIER et al., 2008).

#### 5.2.4.1 Estudo de permeação estática *ex vivo*

Os estudos de permeação estática *ex vivo*, utilizando mucosa vaginal suína, foram realizados por um período máximo de 3h, garantindo a integridade e a confiabilidade dos resultados (PEREIRA et al., 2017).

A Figura 18 apresenta os dados de recuperação do fármaco retido na mucosa vaginal suína após o ensaio de permeação e posterior extração do fármaco da matriz biológica. Não houve diferença estatística, na permeação do fármaco, quando comparados os grupos de formulações separadamente (RH40, GEL e RH40:GEL) ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, houve diferença significativa ao comparar o desempenho das formulações entre si, na permeação do fármaco (ex: RH40 5%  $\alpha$ CD, GEL 5%  $\alpha$ CD e RH40:GEL 5%  $\alpha$ CD) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18. Permeação estática da TB através da mucosa vaginal suína.**

Legenda: \*diferença estatística ( $p < 0,05$ ) da permeação estática.

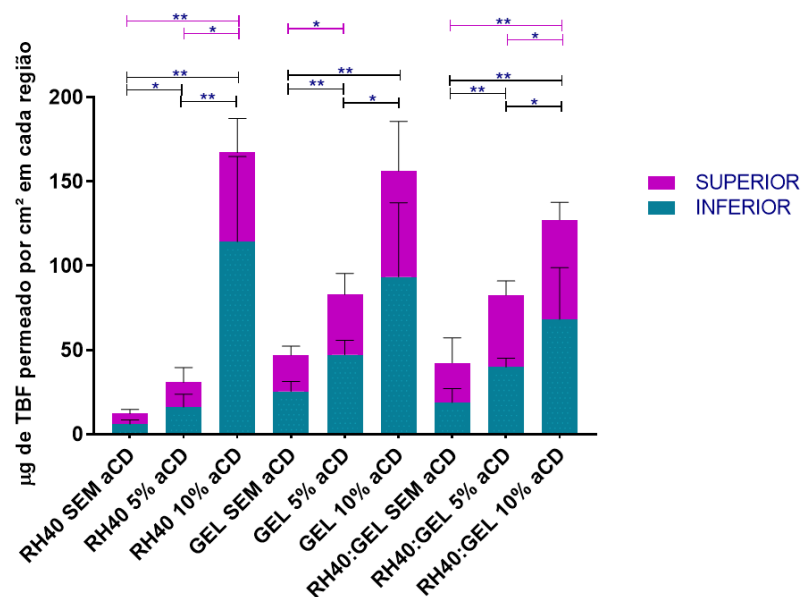
Conforme explicitado anteriormente, o grande diferencial dos géis supramoleculares desenvolvidos é a sua maior viscosidade e mucoadesividade que poderiam garantir um melhor desempenho dessas formulações quando aplicados em uma condição fisiológica natural. O modelo de permeação estática, apesar de ser uma ferramenta útil na comparação da

permeabilidade das formulações, não foi capaz de diferenciar os sistemas desenvolvidos, tendo em vista suas limitações em comparar a mucoadesividade das formulações ou seu comportamento *in vivo* previsto pois as formulações permanecem em plano estático desconsiderado os fatores fisiológicos da vagina. Além disso, este modelo pode superestimar a quantidade de fármaco permeada (PEREIRA et al., 2017). Estes dados justificam, portanto, a necessidade de avaliação em um modelo que simule, pelo menos parcialmente, a condição *in vivo*.

#### 5.2.4.2 Estudo de permeação vertical *ex vivo*

O modelo de permeação vertical *ex vivo* foi desenvolvido com o objetivo de contornar algumas limitações apresentadas pelo modelo de permeação estática. A permeação vertical promove uma condição mais próxima da circunstância biológica além de possibilitar a comparação entre formulações mucoadesivas e não mucoadesivas (PEREIRA et al., 2017).

A mucosa vaginal suína permaneceu em posição vertical por 3 h em contato direto com as diferentes formulações. A quantidade de TB que permeou a mucosa vaginal foi recuperada para quantificação em CLAE. Ao término do experimento, os resultados obtidos referente ao fármaco recuperado da mucosa, a partir das nove formulações desenvolvidas, foram descritos na Figura 19.



**Figura 19. Permeação vertical da TB através da mucosa vaginal suína.**

Legenda: \*diferença estatística ( $p < 0,05$ ) da permeação vertical superior

\*diferença estatística ( $p < 0,05$ ) da permeação vertical inferior

Todas as formulações apresentaram diferenças estatísticas quando recuperadas da zona inferior da mucosa vaginal ( $p < 0,05$ ) enquanto que, na zona superior da mucosa vaginal, apenas o GEL 5%  $\alpha$ CD não apresentou diferença estatística com as formulações do mesmo grupo.

Comparando-se as três formulações entre si, que propiciaram a maior permeação de fármaco, RH40 10%  $\alpha$ CD, GEL 10%  $\alpha$ CD e RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD é possível concluir que não houve diferença significativa em relação ao excipiente utilizado para formação das micelas, mas que a concentração de  $\alpha$ CD é o fator preponderante para o desempenho da formulação. O resultado era esperado tendo em vista que, ao adicionar  $\alpha$ CD nas dispersões micelares, ocorre a interação da cadeia de PEG com a cavidade da  $\alpha$ CD permitindo a formação de um sistema supramolecular. De fato, a força mucoadesiva das formulações aumenta à medida que a concentração de  $\alpha$ CD aumenta (Tabela 7). No entanto, apenas a força mucoadesiva não explica o desempenho semelhante das três formulações em relação à permeação vaginal do fármaco, visto que a força mucoadesiva da formulação RH40 5%  $\alpha$ CD se aproxima dos valores obtidos para as formulações GEL 10%  $\alpha$ CD e RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD. Notoriamente, a viscosidade desses sistemas, ou seja, a consistência, deve explicar a semelhança do desempenho (Tabela 6). A transição de micelas para PPR é marcada pelo aumento da viscosidade aparente do sistema que, por consequência, proporciona o aumento do tempo de permanência da formulação no canal vaginal o que ocasiona maior permeação do fármaco (MARCOS et al., 2016; SIMÕES et al., 2015; TAVEIRA et al., 2018).

### **5.3 Estudos *in vitro* da atividade antifúngica da TB**

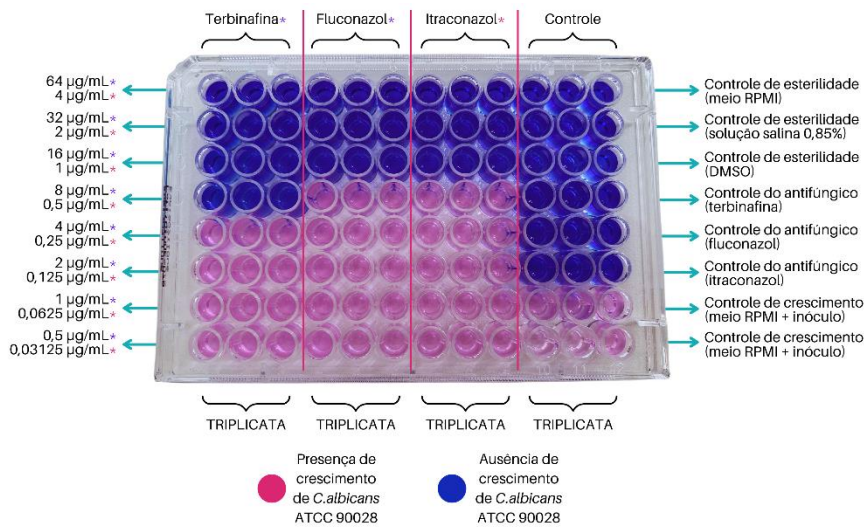
#### **5.3.1 Determinação do perfil de sensibilidade da TB**

Os métodos de diluição são usados para determinar o CIM de fármacos antimicrobianos e são os métodos de referência para testes de suscetibilidade antimicrobiana contra os quais outros métodos, como a difusão em disco, são calibrados. O CIM define os níveis *in vitro* de suscetibilidade ou resistência do microrganismo ao fármaco aplicado. Um valor de CIM mais baixo indica que menos fármaco é necessário para inibir o crescimento do fungo; portanto, fármacos com escores de CIM mais baixos são antifúngicos mais eficazes (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021).

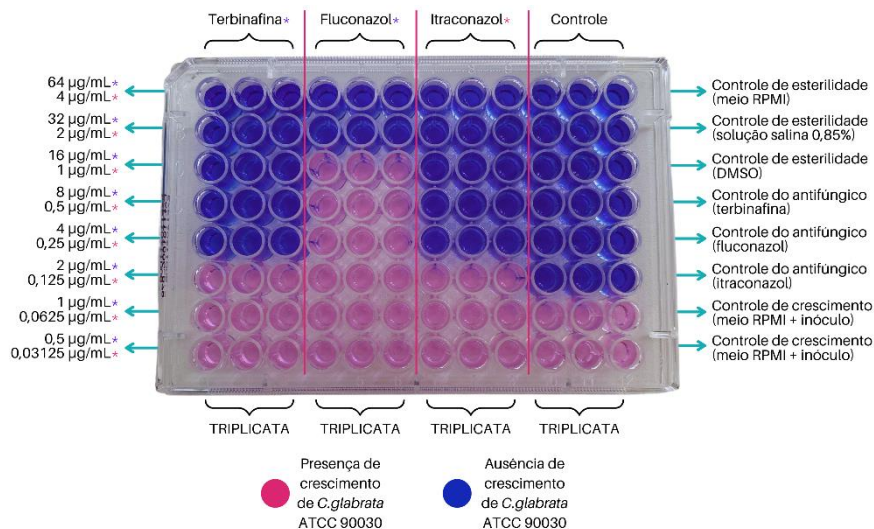
Os protocolos e parâmetros definidos pelo CLSI são considerados o "padrão ouro" em muitos países, incluindo o Brasil, e são usados por autoridades regulatórias, como a ANVISA

e o FDA, para fazer avaliações microbiológicas, por conta disso, a etapa microbiológica deste estudo foi baseada de acordo com a norma M27-A3 da CLSI (CLSI, 2008).

Os resultados envolvendo cultura de *Candida* spp. foram analisados visualmente, utilizando a solução reveladora de resazurina 0,01%. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento fúngico. O CIM corresponde à primeira concentração do fármaco na diluição seriada que não apresenta crescimento visível, representado pela coloração azul (resofurina) (Figura 20 e 21).



**Figura 20. Representação de ensaio revelado com resazurina a 0,01% frente à *C. albicans* ATCC 90028.**



**Figura 21. Representação de ensaio revelado com resazurina a 0,01% frente à *C. glabrata* ATCC 90030.**

Os resultados foram expressos em: sensível (S), sensível dependente de dose (SDD) e resistente (R). Os critérios de interpretação foram baseados no documento M27-A3 do CLSI: fluconazol CIM  $\leq$  8 µg/ml (S), CIM 16- 32 µg/ml (SDD), CIM  $\geq$  64 µg/ml (R); itraconazol

CIM  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/ml}$  (S), CIM 0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$  (SDD), CIM  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  (R). Atualmente, o CLSI não tem pontos de corte definidos para a TB. Neste estudo, a TB foi analisada com base nos pontos de cortes do FLU pois uma correlação entre o CIM e o resultado do tratamento fornece um ponto de interrupção interpretativo semelhante ao do FLU (GARG et al., 2006).

**Tabela 8 – Perfil de suscetibilidade da TB, FLU e ITZ frente as cepas de *Candida*.**

	FÁRMACO LIVRE	CIM	INTERPRETAÇÃO
<i>C. albicans</i> 90028 ATCC	Terbinafina (TB)	8 $\mu\text{g/mL}$ -64 $\mu\text{g/mL}$	Sensível (S)
	Fluconazol (FLU)	16 $\mu\text{g/mL}$ -64 $\mu\text{g/mL}$	Sensível Dose-Dependente (S-DD)
	Itraconazol (ITZ)	1 $\mu\text{g/mL}$ -4 $\mu\text{g/mL}$	Resistente (R)
<i>C. glabrata</i> 90030 ATCC	Terbinafina (TB)	4 $\mu\text{g/mL}$ -64 $\mu\text{g/mL}$	Sensível (S)
	Fluconazol (FLU)	32 $\mu\text{g/mL}$ -64 $\mu\text{g/mL}$	Resistente (R)
	Itraconazol (ITZ)	0,25 $\mu\text{g/mL}$ -4 $\mu\text{g/mL}$	Resistente (R)

A cepa de *C. albicans* apresentou CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$  para terbinafina (S). Na suscetibilidade para o FLU, o CIM foi de 16 $\mu\text{g/mL}$  (SDD). Já o ITZ apresentou CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$  (R). Da mesma forma, a cepa de *C. glabrata* apresentou CIM de 4  $\mu\text{g/mL}$  para TB (S), 32 $\mu\text{g/mL}$  para FLU (R) e 0,25 $\mu\text{g/mL}$  para ITZ (R). Assim, dentro do grupo dos fármacos testados, a TB apresentou, maior inibição sobre as cepas de *Candida*. Além disso, a TBF apresentou valores de CIM menores para *C. glabrata* em comparação com *C. albicans*. Dessa forma, a TB demonstrou ter efeito inibitório e esse efeito é fungistático.

Resultados similares foram obtidos por Perea e colaboradores (2002) que avaliou a suscetibilidade de isolados clínicos de *C. glabrata* frente à TB (>8 $\mu\text{g/mL}$ ), FLU (>16 $\mu\text{g/mL}$ ) e ITZ (>0,125 $\mu\text{g/mL}$ ). Outros estudos determinaram a suscetibilidade de *C. albicans* na presença de TB (CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ), FLU (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ) e ITZ (4 $\mu\text{g/mL}$ ) (SHARAFUTDINOV et al., 2020; WANG et al., 2018).

### 5.3.2 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em poço

O método de difusão em ágar é utilizado para determinar a suscetibilidade de isolados clínicos de fungos a diferentes antifúngicos. Um antifúngico eficaz produz uma grande zona de

inibição, enquanto um antifúngico ineficaz pode não afetar o crescimento fúngico. A técnica utilizada neste estudo, difusão em poço, é uma adaptação ao teste de disco-difusão do CLSI.

Um estudo realizado por Maia-Araújo e colaboradores (2011) demonstrou que tanto a técnica de difusão em discos com a de difusão em poços são confiáveis para avaliação antifúngica de diferentes fármacos. Além disso, os resultados apresentados pelos autores sugerem que a técnica de difusão em poço apresenta maior confiabilidade e pode substituir a técnica de difusão em discos nas análises microbiológicas.

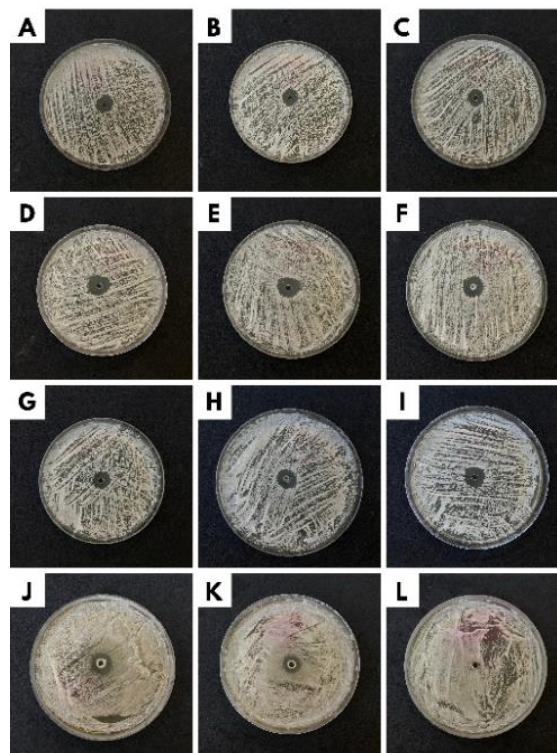
Neste estudo, além das formulações, a TB foi testada isoladamente para determinar se as micelas e os PPR's mantêm a atividade antifúngica do fármaco sobre as espécies de *Candida*. Todas as formulações de TB inibiram o crescimento das cepas de *Candida* demonstrado pela formação de halos de inibição ao redor dos poços onde foram depositadas as formulações testadas. Os grupos de controle apresentaram resultados esperados, onde as placas referentes ao controle negativo houve crescimento microbiológico, atuando como o controle de crescimento do microrganismo, e a placa referente ao controle positivo apresentou halo de inibição sobre as cepas de *Candida* (Tabela 9).

**Tabela 9 – Diâmetro dos halos de inibição formados frente as cepas de *Candida*.**

FORMULAÇÃO	HALO DE INIBIÇÃO (mm)	
	<i>C. albicans</i> 90028 ATCC	<i>C. glabrata</i> 90030 ATCC
<b>RH40 sem <math>\alpha</math>CD</b>	14 $\pm$ 1 <sup>*a</sup>	14,33 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>
<b>RH40 com 5% <math>\alpha</math>CD</b>	13 $\pm$ 0 <sup>*</sup>	13,33 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>
<b>RH40 com 10% <math>\alpha</math>CD</b>	11,66 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	11,66 $\pm$ 0,57 <sup>*ab</sup>
<b>GEL sem <math>\alpha</math>CD</b>	16,66 $\pm$ 1,15 <sup>*bc</sup>	18 $\pm$ 2 <sup>*c</sup>
<b>GEL com 5% <math>\alpha</math>CD</b>	13 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	17 $\pm$ 2,64
<b>GEL com 10% <math>\alpha</math>CD</b>	13,33 $\pm$ 0,57 <sup>c</sup>	13,33 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>
<b>RH40:GEL sem <math>\alpha</math>CD</b>	14,33 $\pm$ 2,88	14,66 $\pm$ 0,57
<b>RH40:GEL com 5% <math>\alpha</math>CD</b>	13,33 $\pm$ 0,57 <sup>*</sup>	13,33 $\pm$ 1,15
<b>RH40:GEL com 10% <math>\alpha</math>CD</b>	11,33 $\pm$ 0,57	12,33 $\pm$ 0,57
<b>Solução TB 2%</b>	12,66 $\pm$ 1,15	12,66 $\pm$ 0,57
<b>Controle Positivo (Solução FLU 2%)</b>	11,66 $\pm$ 0,57 <sup>*</sup>	13,33 $\pm$ 0,57 <sup>*</sup>
<b>Controle negativo</b>	-	-

Legenda: \*diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle positivo. Letras iguais na mesma coluna representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

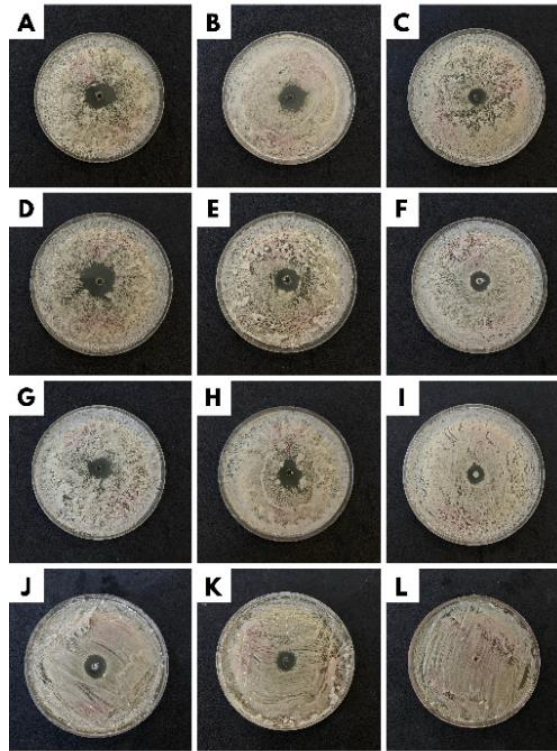
As formulações de RH40 sem  $\alpha$ CD, RH40 5%  $\alpha$ CD, GEL sem  $\alpha$ CD e RH40:GEL 5%  $\alpha$ CD apresentaram diferença estatística em comparação com o controle positivo ( $p < 0,05$ ) demonstrando que a TB incorporada nos géis se sobressai sobre o controle, possuindo uma maior zona de inibição. Em contrapartida, todas as formulações mantiveram a mesma inibição da *C. albicans* em comparação com os halos obtidos pela solução de TB 2%. Foi possível observar que, as formulações sem  $\alpha$ CD, RH40 sem  $\alpha$ CD e GEL sem  $\alpha$ CD, apresentaram zona inibição superior aos mesmos sistemas com 5% e 10% de  $\alpha$ CD ( $p < 0,05$ ) (Figura 22).



**Figura 22. Sequência ilustrativa dos halos de inibição formados frente à *C. albicans* ATCC 90028.**

Legenda: (a) RH40 sem  $\alpha$ CD; (b) RH40 5%  $\alpha$ CD; (c) RH40 10%  $\alpha$ CD; (d) GEL sem  $\alpha$ CD; (e) GEL 5%  $\alpha$ CD; (f) GEL 10%  $\alpha$ CD; (g) RH40:GEL sem  $\alpha$ CD; (h) RH40:GEL 5%  $\alpha$ CD; (i) RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD; (j) solução TB 2%; (k) solução FLU 2%; (l) solução salina 0,85%.

As formulações de RH40 10%  $\alpha$ CD e GEL sem  $\alpha$ CD apresentaram diferença estatística em comparação com o controle positivo ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma que o observado com a *C. albicans*, as formulações de RH40 sem  $\alpha$ CD e GEL sem  $\alpha$ CD, apresentaram zona inibição superior aos mesmos sistemas com 5% e 10% de  $\alpha$ CD ( $p < 0,05$ ). Nenhuma formulação apresentou diferença significativa quando comparadas com a solução de TB 2% ( $p > 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23. Sequência ilustrativa dos halos de inibição formados frente à *C. glabrata* ATCC 90030.**

Legenda: (a) RH40 sem  $\alpha$ CD; (b) RH40 5%  $\alpha$ CD; (c) RH40 10%  $\alpha$ CD; (d) GEL sem  $\alpha$ CD; (e) GEL 5%  $\alpha$ CD; (f) GEL 10%  $\alpha$ CD; (g) RH40:GEL sem  $\alpha$ CD; (h) RH40:GEL 5%  $\alpha$ CD; (i) RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD; (j) solução TB 2%; (k) solução FLU 2%; (l) solução salina 0,85%.

Yassin e colaboradores (2020) evidenciaram, em condições *in vitro*, diâmetros de zona de inibição de  $27.27 \pm 0.08$  mm e  $11.73 \pm 0.91$  de TB frente à *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente. Em outros estudos, halos de inibição de 12mm e  $14,67 \pm 3,06$  mm de TB foram registrados frente à *C. albicans* (NEHMATULLAH, 2019; LAM et al., 2016). Estes resultados se assemelham aos resultados obtidos pelos controles deste experimento.

As formulações sem  $\alpha$ CD foram as que apresentaram o maior halo de inibição pois provavelmente propiciaram a interação do fármaco com os microrganismos. Com a formação do PPR e o aumento da viscosidade, a difusão do fármaco no meio de cultura pode ser dificultada, interferindo na formação do halo de inibição (MARCOS et al., 2016; SIMÕES et al., 2015; TAVEIRA et al., 2018).

No entanto, o que se nota no presente estudo é que tal dificuldade de difusão do fármaco imposta pelos sistemas PPR foi contrabalanceada pela melhor interação dos sistemas com os microrganismos, de maneira que as formulações que apresentaram o melhor desempenho *ex vivo* em relação à permeação vaginal, RH40 10%  $\alpha$ CD, GEL 10%  $\alpha$ CD e RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD, mantiveram a mesma inibição dos controles.



## 6 CONCLUSÃO

---

As formulações desenvolvidas com  $\alpha$ CD apresentaram-se como um sistema de liberação promissor com propriedades mucoadesivas, e potencial para permanecer no ambiente vaginal por períodos mais longos proporcionando maior tempo de contato entre as formulações e a camada superficial da mucosa controlando a liberação de TB. Os géis supramoleculares apresentaram uma maior adesão à mucosa vaginal o que está relacionado a uma maior contribuição da propriedade viscosa sobre as propriedades elásticas proporcionada pela interação da  $\alpha$ CD com as cadeias de PEG dos sistemas. Assim, as formulações RH40 10%  $\alpha$ CD, GEL 10%  $\alpha$ CD e RH40:GEL 10%  $\alpha$ CD demonstraram desempenho *ex vivo* superior quanto à permeação na mucosa vaginal, sendo, a concentração de  $\alpha$ CD o fator preponderante para tal desempenho. Os estudos microbiológicos de avaliação da suscetibilidade de *C. albicans* e *C. glabrata* às formulações demonstrou que a atividade antifúngica dessas formulações foi mantida, visto que todas as formulações foram capazes de formar halos de inibição comparáveis àqueles formados pelos controles antifúngicos em solução aquosa.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDELSAMIE, Sara M. et al. Terbinafine hydrochloride nanovesicular gel: In vitro characterization, ex vivo permeation and clinical investigation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 91-100, 2016.
- ADNANE, Mounir; MEADE, Kieran G.; O'FARRELLY, Cliona. Cervico-vaginal mucus (CVM)—an accessible source of immunologically informative biomolecules. **Veterinary research communications**, v. 42, n. 4, p. 255-263, 2018.
- AGGARWAL, Rohan et al. Onychomycosis: Novel strategies for treatment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101774, 2020.
- AHMAD, Zaheer et al. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. **Rsc Advances**, v. 4, n. 33, p. 17028-17038, 2014.
- AJIT, Challa et al. Terbinafine-associated hepatotoxicity. **The American journal of the medical sciences**, v. 325, n. 5, p. 292-295, 2003.
- ALBAYATY, Yassamin N. et al. pH-Responsive copolymer micelles to enhance itraconazole efficacy against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 8, p. 1672-1681, 2020.
- ALONSO-MONGE, Rebeca et al. *Candida albicans* colonization of the gastrointestinal tract: A double-edged sword. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 7, p. e1009710, 2021.
- ALSHIEK, Jonia et al. Vaginal energy-based devices. **Female pelvic medicine & reconstructive surgery**, v. 26, n. 5, p. 287-298, 2020.
- ALVAREZ-LORENZO, Carmen; CONCHEIRO, Angel. Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1065-1074, 2008.
- ALVES, Carlos Tiago et al. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. **Journal of Infection**, v. 69, n. 4, p. 396-407, 2014.
- AMARAL, Andre Correa et al. Miconazole loaded chitosan-based nanoparticles for local treatment of vulvovaginal candidiasis fungal infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 409-415, 2019.
- APPELBAUM, Alan H. et al. Vaginal anatomy on MRI: new information obtained using distention. **Southern Medical Journal**, v. 111, n. 11, p. 691, 2018.
- ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_3, p. S445-S451, 2017.
- ATTIA, Amalina Bte Ebrahim et al. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 182-194, 2011.

BANSIL, Rama; TURNER, Bradley S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. **Advanced drug delivery reviews**, v. 124, p. 3-15, 2018.

BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana BG. Candidíase. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARNES, Kylie N.; YANCEY, Abigail M.; FORINASH, Alicia B. Ibrexafungerp in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Annals of Pharmacotherapy**, p. 10600280221091301, 2022.

BERKOW, Elizabeth L.; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in Candida species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BLOSTEIN, Freida et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Annals of Epidemiology**, v. 27, n. 9, p. 575-582. e3, 2017.

BORST, Annemarie et al. Rapid acquisition of stable azole resistance by Candida glabrata isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 783-787, 2005.

BOSKEY, E. R. et al. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1809-1813, 2001.

BRADFORD, L. L.; RAVEL, J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases, **Virulence**, v.8, n.3, p.342-351, 2017.

BRANDOLT, Tchana Martinez et al. Prevalence of Candida spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, p. 145-150, 2017.

BRASIL, **Resolução RDC. Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Anvisa, Ed. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada: Brasília, 2017.

BRUSCHI, Marcos Luciano; DE FREITAS, Osvaldo. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 293-310, 2005.

BUSCHELMAN, Barry et al. Colony morphology of Candida spp. as a guide to species identification. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 35, n. 1, p. 89-91, 1999.

CAGEL, Maximiliano et al. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 211-228, 2017.

CAROLUS, Hans et al. Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CARVALHO, Flávia Chiva et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of pharmaceutical sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, Newton Sergio de et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecções que causam corrimento vaginal. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2021.

CAUCHIE, Mathieu; DESMET, Stefanie; LAGROU, Katrien. Candida and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 802-810, 2017.

CAVALHEIRO, Mafalda; TEIXEIRA, Miguel Cacho. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CAZORLA-LUNA, Raúl et al. Chitosan-based mucoadhesive vaginal tablets for controlled release of the anti-HIV drug tenofovir. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 20, 2019.

CHEN, Shanjuan et al. Comparison of the effects of three different anti-fungus drugs on Candida albicans of murine vaginal mucosa. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 209-212, 2007.

CHEN, Yanmei et al. Water-soluble supramolecular polymers constructed by macrocycle-based host-guest interactions. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 1, p. 37-43, 2019.

CHOUDHARY, Narendra S. et al. Terbinafine induced liver injury: a case report. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 264-265, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **References methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27-A3**, 3rd ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

CONCHEIRO, Angel; ALVAREZ-LORENZO, Carmen. Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: From nanostructures to drug-eluting medical devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1188-1203, 2013.

COSTA-DE-OLIVEIRA, Sofia et al. Determination of chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. **Cytometry Part A**, v. 83, n. 3, p. 324-328, 2013.

DARWESH, Bayan; ALDAWSARI, Hibah M.; BADR-ELDIN, Shaimaa M. Optimized chitosan/anion polyelectrolyte complex based inserts for vaginal delivery of fluconazole: In vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 227, 2018.

DE ARAUJO PEREIRA, Raphaela Regina; BRUSCHI, Marcos Luciano. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n. 6, p. 643-652, 2012.

DE ARAUJO, Yzila Liziane Farias Maia et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011.

DE BRITO MUNIZ, Sthefany Dantas. Prevalência de Candidíase vulvovaginal recorrente em mulheres com idade entre 18 a 30 anos em uma unidade básica de saúde no município de cajazeiras-PB. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 1, 2018.

DE GROOT, Piet WJ et al. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 11, p. 1951-1964, 2008.

DE MEDEIROS, M. Araújo Paulo et al. Characterization of virulence factors of vaginal and anal isolates of *Candida albicans* sequentially obtained from patients with vulvovaginal candidiasis in north-east Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 4, p. 567-572, 2017.

DENNING, David W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. e339-e347, 2018.

DESHMUKH, Anand S. et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. **International journal of pharmaceuticals**, v. 532, n. 1, p. 249-268, 2017.

DHIMAN, Priya; BHATIA, Meenakshi. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 171-186, 2020.

DOMIŃSKI, Adrian; KONIECZNY, Tomasz; KURCOK, Piotr.  $\alpha$ -cyclodextrin-based polypseudorotaxane hydrogels. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 133, 2019.

DREISS, Cécile A. Hydrogel design strategies for drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 1-17, 2020.

ENGGI, Cindy Kristina et al. Development of thermosensitive and mucoadhesive gels of cabotegravir for enhanced permeation and retention profiles in vaginal tissue: A proof of concept study. **International journal of pharmaceuticals**, v. 609, p. 121182, 2021.

FERAHBAS, Ayten et al. Terbinafine versus itraconazole and fluconazole in the treatment of Vulvovaginal candidiasis. **American journal of therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 332-336, 2006.

FF, Muhammad et al. Efficacy of Topical Terbinafine and Topical Clotrimazole in the treatment of Dermatophytosis and Skin Candidiasis; an Observational Study. **Biostatistics and Biometrics Open Access Journal**, v. 4, n. 3, p. 51-54, 2018.

GARG, S. et al. In vitro activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* and non-*albicans* using a macrodilution method. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, n. 3, p. 119-125, 2006.

GHOSH, Sampad; RAY, Anirban; PRAMANIK, Nabakumar. Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. **Biophysical Chemistry**, v. 265, p. 106429, 2020.

GODHA, Keshav et al. Human vaginal pH and microbiota: an update. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 6, p. 451-455, 2018.

GOLD, Joann M.; SHRIMANKER, Isha. Physiology, vaginal. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2021.

GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology, and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GRALLERT, Sibila Roberta Marques et al. Polymeric micelles and molecular modeling applied to the development of radiopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 1-16, 2012.

GRIMAUDO, Maria A. et al. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles as promising carriers for cyclosporine ocular delivery. **Molecular pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 571-584, 2018.

GUNTHER, Luciene Setsuko Akimoto et al. Prevalência de *Candida albicans* e não *albicans* isoladas de secreção vaginal: avaliação comparativa entre colonização, candidíase vaginal e candidíase vaginal recorrente em mulheres diabéticas e não diabéticas. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 132, p. 116-120, 2014.

GUPTA, Aditya K.; VERSTEEG, Sarah G.; SHEAR, Neil H. Common drug-drug interactions in antifungal treatments for superficial fungal infections. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 14, n. 4, p. 387-398, 2018.

HEITMANN, R. J. **Anatomia do Sistema Genital Feminino**. In: CURRENT Diagnóstico e Tratamento em Ginecologia e Obstetrícia. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 36–37.

HOSSEINI, Seyededeh Sedigheh et al. Antifungal activity of ZnO nanoparticles and nystatin and downregulation of SAP1-3 genes expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidiasis. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 385, 2020.

HOU, Xin et al. Rapid detection of ERG11-associated azole resistance and FKS-associated echinocandin resistance in *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01811-18, 2019.

HUANG, Guanghua. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2012.

HUANG, Shaoshan et al. Functionalized GO nanovehicles with nitric oxide release and photothermal activity-based hydrogels for bacteria-infected wound healing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 26, p. 28952-28964, 2020.

HUSSAIN, Alamdar; AHSAN, Fakhrul. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 103, n. 2, p. 301-313, 2005.

HWANG, Duhyeong; RAMSEY, Jacob D.; KABANOV, Alexander V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. **Advanced drug delivery reviews**, v. 156, p. 80-118, 2020.

JACKSON, Lindsey A. et al. Anatomy, histology, and nerve density of clitoris and associated structures: clinical applications to vulvar surgery. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 221, n. 5, p. 519. e1-519. e9, 2019.

JACOB, Shery; NAIR, Anroop B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug development research**, v. 79, n. 5, p. 201-217, 2018.

KANAKAPURA, Basavaiah; PENMATSA, Vamsi Krishna. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 3, p. 137-149, 2016.

KANG, Chang-Ho et al. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* MG242 isolated from human vagina. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 2, p. 343-349, 2018.

KAUSHAL, Madhu et al. Terbinafine-induced liver injury. **Natl Med J India**, v. 30, p. 321-3, 2017.

KENECHUKWU, Franklin C. et al. Surface-modified mucoadhesive microgels as a controlled release system for miconazole nitrate to improve localized treatment of vulvovaginal candidiasis. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 111, p. 358-375, 2018.

KISS, Eszter L. et al. Development and Characterization of Potential Ocular Mucoadhesive Nano Lipid Carriers Using Full Factorial Design. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 682, 2020.

KOWALSKA-KROCHMAL, Beata; DUDEK-WICHER, Ruth. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

KRAMER, O. N.; ALBRECHT, J. Clinical presentation of terbinafine-induced severe liver injury and the value of laboratory monitoring: a Critically Appraised Topic. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 5, p. 1279-1284, 2017.

KRAWCZYK-SANTOS, Anna Paula. **Micelas e géis supramoleculares para permeação ungueal de terbinafina**. 2021. 118f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal de Goiás, 2021.

KUMAR, L. et al. Preparation and characterisation of fluconazole vaginal films for the treatment of vaginal candidiasis. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 75, n. 5, p. 585, 2013.

LACROIX, Guillaume et al. The cervicovaginal mucus barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8266, 2020.

LAM, Pikling et al. Sensitization of *Candida albicans* to terbinafine by berberine and berberrubine. **Biomedical reports**, v. 4, n. 4, p. 449-452, 2016.

LIN, Yen-Pin et al. Vaginal pH Value for Clinical Diagnosis and Treatment of Common Vaginitis. **Diagnostics**, v. 11, n. 11, p. 1996, 2021.

LORENZO-VEIGA, Blanca et al. Cyclodextrin–amphiphilic copolymer supramolecular assemblies for the ocular delivery of natamycin. **Nanomaterials**, v. 9, n. 5, p. 745, 2019.

LOURENÇO, Ana Rita Nunes. **Administração tópica de fármacos–das restrições aos desafios**. 51f. 2013. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.

LUCENA, Percília A. et al. In vivo vaginal fungal load reduction after treatment with itraconazole-loaded polycaprolactone-nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 7, p. 1347-1358, 2018.

MACHADO, Rita Monteiro et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 92, p. 14-26, 2015.

MAJUMDAR, Tapan et al. Determination of virulence factors and biofilm formation among isolates of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Medical Sciences**, v. 36, n. 2, p. 53, 2016.

MAKHMALZADE, Behzad Sharif; CHAVOSHY, Fateme. Polymeric micelles as cutaneous drug delivery system in normal skin and dermatological disorders. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 9, n. 1, p. 2, 2018.

MANTOOTH, Siena M.; MUNOZ-ROBLES, Brizzia G.; WEBBER, Matthew J. Dynamic hydrogels from host–guest supramolecular interactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 19, n. 1, p. 1800281, 2019.

MARCOS, Xelhua et al. Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- $\alpha$ -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 500, n. 1-2, p. 11-19, 2016.

MARTINEZ, R. C. R. **Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidos por infecções bacterianas e fúngicas**. Tese (Doutorado) (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Ribeirão Preto, USP, 2008.

MASCARENHAS, Rita Elizabeth Moreira et al. Prevalence and risk factors for bacterial vaginosis and other vulvovaginitis in a population of sexually active adolescents from Salvador, Bahia, Brazil. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2012, 2012.

MASONE, Maria Chiara. Ibrexafungerp to treat acute vulvovaginal candidiasis. **Nature Reviews Urology**, v. 18, n. 11, p. 638-638, 2021.

MCKENZIE, Matthew et al. Hydrogel-based drug delivery systems for poorly water-soluble drugs. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20397-20408, 2015.

MILLER, Elizabeth A. et al. Lactobacilli dominance and vaginal pH: why is the human vaginal microbiome unique?. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1936, 2016.

MISHRA, Animesh A.; KOH, Andrew Y. Adaptation of *Candida albicans* during gastrointestinal tract colonization. **Current clinical microbiology reports**, v. 5, n. 3, p. 165-172, 2018.



MTIBAA, L. et al. Vulvovaginal candidiasis: etiology, symptomatology and risk factors. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 2, p.153-158, jun. 2017.

MUÑOZ, E. et al. Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú, 2012. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú**, v. 32, n. 1, p. 42-103, 2012.

NEHMATULLAH, Vian B. The minimum inhibitory concentration of different antifungal agents against *Candida* species. **ZJPAS**, v. 31, n. 4, p.36-41, 2019.

OLIVEIRA, Paula Matos et al. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 239-244, 2011.

OLSON, Michelle L.; JAYARAMAN, Arul; KAO, Katy C. Relative abundances of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in in vitro coculture biofilms impact biofilm structure and formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 8, p. e02769-17, 2018.

OSHIRO, João Augusto et al. Study of triamcinolone release and mucoadhesive properties of macroporous hybrid films for oral disease treatment. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 4, n. 3, p. 035009, 2018.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OTAŠEVIĆ, S. et al. Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 2, p. 236-248, 2018.

PATRAVALE, V. B.; DATE, Abhijit A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-840, 2004.

PEREA, Sofia et al. In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1831-1833, 2002.

PEREIRA, Maíra N. et al. Novel ex vivo protocol using porcine vagina to assess drug permeation from mucoadhesive and colloidal pharmaceutical systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 222-228, 2017.

PERLIN, David S. Echinocandin resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl\_6, p. S612-S617, 2015.

PERVEZE, Zeeshan et al. Terbinafine-induced hepatic failure requiring liver transplantation. **Liver transplantation**, v. 13, n. 1, p. 162-164, 2007.

PETRANYI, Gabor; RYDER, Neil S.; STÜTZ, Anton. Allylamine derivatives: new class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. **Science**, v. 224, n. 4654, p. 1239-1241, 1984.

PIÑA-BARRERA, Andrés M. et al. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). **IEEE Transactions on NanoBioscience**, v. 18, n. 4, p. 549-557, 2019.

POULAIN, Daniel. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2015.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

PUSHPAKOM, Sudeep et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2019.

QI, Hongyi et al. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International journal of pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 178-187, 2007.

RATHOD, Sujit D.; BUFFLER, Patricia A. Highly-cited estimates of the cumulative incidence and recurrence of vulvovaginal candidiasis are inadequately documented. **BMC Women's Health**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2014.

RENÇBER, Seda et al. Mucoadhesive in situ gel formulation for vaginal delivery of clotrimazole: formulation, preparation, and in vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutical development and technology**, v. 22, n. 4, p. 551-561, 2017.

RENÇBER, Seda et al. Preparation and characterization of mucoadhesive gels containing pentoxifylline loaded nanoparticles for vaginal delivery of genital ulcer. **Iranian Polymer Journal**, v. 30, n. 6, p. 569-582, 2021.

REYNAUD, A. Infecciones vaginales por *Candida*: diagnóstico y tratamiento. **Rev Per Ginecol**, v. 53, p. 159-166, 2007.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, Carmen et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 110-125, 2019.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. Pharmaceutical handbook of pharmaceutical excipients. **London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA**, v. 615, 2005.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**, v. 126, p. 2-7, 1992.

RYDER, N. S. The mechanism of action of terbinafine. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 98-100, 1989.

SALEHEI, Zahra; SEIFI, Zahra; ZAREI, Mahmoudabadi Ali. Sensitivity of vaginal isolates of *Candida* to eight antifungal drugs isolated from Ahvaz. **Jundishapur J Microbiol**, v.5, n.4, p.574-577, 2012.

SCHWIERTZ, Andreas et al. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2006.

SHAIKH, Rahamatullah et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89, 2011.

SHARAFUTDINOV, Irshad S. et al. Increasing susceptibility of drug-resistant *Candida albicans* to fluconazole and terbinafine by 2 (5H)-furanone derivative. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 642, 2020.

SHARMA, Deepak et al. Novel paradigms in mucoadhesive drug delivery system. **Int J Pharm Sci Res**, v. 3, p. 2455-2471, 2012.

SIMÕES, Susana M.N et al. Supramolecular cyclodextrin-based drug nanocarriers. **Chemical Communications**, v. 51, n. 29, p. 6275-6289, 2015.

SOBCZYŃSKI, Jan; CHUDZIK-RZAÐ, Beata. Mixed micelles as drug delivery nanocarriers. In: **Design and development of new nanocarriers**. William Andrew Publishing, 2018. p. 331-364.

SOBEL, Jack D. et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 9, p. 876-883, 2004.

SOBEL, Jack D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOBEL, Jack D. Ibrexafungerp for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 58, n. 4, p. 149-158, 2022.

SOBEL, Jack D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.

SOBEL, Jack D.; NYIRJESY, Paul. Oteseconazole: an advance in treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Future microbiology**, v. 16, n. 18, p. 1453-1461, 2021.

SONG, Jessica C.; DERESINSKI, Stanley. Hepatotoxicity of antifungal agents. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 6, n. 2, p. 170-177, 2005.

SONG, Ruiteng et al. Ultrasound-assisted preparation of exopolysaccharide/nystatin nanoemulsion for treatment of vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2027, 2020.

SQUIER, Christopher A. et al. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.

TAKALKAR, Dnyanesh; DESAI, Namita. Nanolipid gel of an antimycotic drug for treating vulvovaginal candidiasis—development and evaluation. **AAPS pharmscitech**, v. 19, n. 3, p. 1297-1307, 2018.

TAVEIRA, Stephânia Fleury et al. Cyclodextrin-based poly (pseudo) rotaxanes for transdermal delivery of carvedilol. **Carbohydrate polymers**, v. 200, p. 278-288, 2018.

THATAI, Purva; SAPRA, Bharti. Terbinafine hydrochloride nail lacquer for the management of onychomycosis: Formulation, characterization and in vitro evaluation. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 2, p. 99-119, 2018.

TIAN, Chunling et al. Physicochemical evaluation and pharmacodynamics of itraconazole-loaded liquid crystal precursor for vaginal delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, p. 1-12, 2022.

TRAGIANNIDIS, Athanasios et al. Antifungal agents and the kidney: pharmacokinetics, clinical nephrotoxicity, and interactions. **Expert opinion on drug safety**, v. 20, n. 9, p. 1061-1074, 2021.

TURNER, Siobhán A.; BUTLER, Geraldine. The Candida pathogenic species complex. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 9, p. a019778, 2014.

TVERDEK, Frank P.; KOFTERIDIS, Diamantis; KONTOYIANNIS, Dimitrios P. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 14, n. 8, p. 765-776, 2016.

UNEMO, Magnus et al. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization**, [s. l.], p. 244, 2013.

VALDERRAMA, S. Otálora et al. Micosis sistémicas em pacientesno inmunocomprometidos. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 12, n. 57, p. 3349-3356, 2018.

VALENTA, Claudia. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1692-1712, 2005.

VAN EYK, Armorél D.; VAN DER BIJL, Pieter. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. **International journal of pharmaceutics**, v. 305, n. 1-2, p. 105-111, 2005.

VIGANI, Barbara et al. Development of a mucoadhesive in situ gelling formulation for the delivery of Lactobacillus gasseri into vaginal cavity. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 511, 2019.

WANG, Jiun-Ling et al. Systematic review and meta-analysis of the tolerability and hepatotoxicity of antifungals in empirical and definitive therapy for invasive fungal infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2409-2419, 2010.

WANG, Tianming et al. Strong synergism of palmatine and fluconazole/itraconazole against planktonic and biofilm cells of Candida species and efflux-associated antifungal mechanism. **Frontiers in Microbiology**, p. 2892, 2018.

WHALEY, Sarah G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L. Beyond *Candida albicans*: mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

YANO, Junko et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC women's health**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2019.

YASSIN, Mohamed T. et al. In vitro antifungal resistance profile of *Candida* strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. **European journal of medical research**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2020.

YEUNG, Jennifer; PAULS, Rachel N. Anatomy of the vulva and the female sexual response. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, v. 43, n. 1, p. 27-44, 2016.

ZHANG, Yifei; HUANG, Yixian; LI, Song. Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. **Aaps Pharmscitech**, v. 15, n. 4, p. 862-871, 2014.

ZHENG, Yue; WYMAN, Ian W. Supramolecular nanostructures based on cyclodextrin and poly (ethylene oxide): Syntheses, structural characterizations and applications for drug delivery. **Polymers**, v. 8, n. 5, p. 198, 2016.