

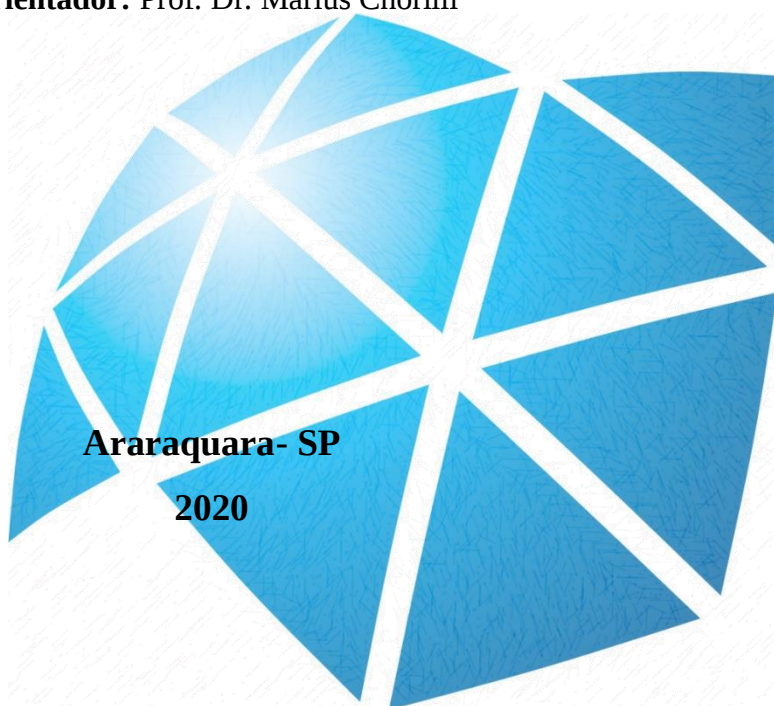
**Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em
hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal
de hipericina associados à terapia fotodinâmica no
tratamento da candidíase vulvovaginal**

Mariana Rillo Sato

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara- SP

2020



**Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em
hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal
de hipericina associados à terapia fotodinâmica no
tratamento da candidíase vulvovaginal**

Mariana Rillo Sato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara- SP

2020

S253c Sato, Mariana Rillo.
Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal de hipericina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal / Mariana Rillo Sato. – Araraquara: [S.n.], 2020.
121 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. *Candida albicans*. 2. Hipericina. 3. Atividade antifúngica. 4. Terapia fotodinâmica. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal de hipericina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal

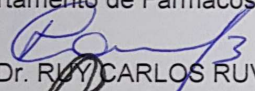
AUTORA: MARIANA RILLO SATO

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

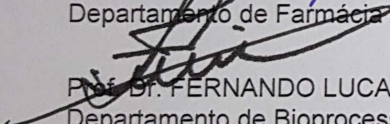
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



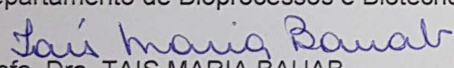
Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF - UNESP - Araraquara



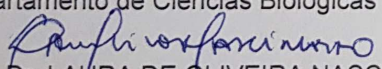
Prof. Dr. RUY CARLOS RUVER BECK
Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCF- UNESP - Araraquara



Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB
Departamento de Ciências Biológicas / FCF- UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO
Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 30 de janeiro de 2020

DEDICATÓRIA

*À meus pais **Roberto e Maria Helena** por estarem sempre presentes apoiando e dando suporte as minhas decisões... são exemplos e inspirações de vida para mim! Amo vocês incondicionalmente!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e à Santa Luzia, pelas bênçãos e vitórias concebidas em minha vida. À minha abençoada família, Roberto Sato (pai), Maria Helena (mãe), Matheus (irmão), Luana (cunhada) e Bernardo (sobrinho), que mesmo distantes sempre estiveram presentes expressando toda forma de amor. Aos meus avôs maternos Maria e Aléssio, e paternos, Nobuco e Geraldo (in memorian), por serem meus exemplos de caráter!

Ao meu marido, companheiro e amigo João Augusto, por me apoiar e sempre caminhar ao meu lado, incentivando-me a ser uma profissional melhor a cada dia!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marlus Chorilli pelos momentos de compreensão e amplos ensinamentos prestados ao longo desta carreira, que me fizeram crescer profissionalmente e como ser humano. Saiba que tens minha eterna admiração!

Aos colegas do laboratório da Farmacotécnica (sem nomes para não esquecer ninguém), por toda ajuda e companhia diária ao longo dos anos. Em especial à Giovana e a Francesca pelo auxílio nos dados de reologia, e ao Victor, Paula e Gabriela pelo ensaio in vivo.

Às melhores amigas presenteadas por Deus: Aline P., Camila, Fernanda, Jéssica, Karen, Leda e Natália, pelas incansáveis discussões e conhecimentos que foram essenciais para este trabalho, e por todos os momentos em que prontamente me estenderam uma mão amiga.

Aos queridos amigos do laboratório CMAF (sem nomes para não esquecer ninguém), por estarem de “portas abertas”, sobretudo, pelos inesquecíveis momentos de descontração.

À Prof.^a Dr.^a Leila Aparecida Chiavacci Favorin da UNESP - Araraquara pelo auxílio de matérias-primas e conselhos prestados em diversas situações. Carinhosamente, a toda sua família e em especial ao Sérgio e ao Vitor por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos professores de Farmacotécnica Dr.^a Maria Palmira D. Gremião, Dr. Anselmo G. Oliveira e Dr.^a Beatriz S. F. Cury, pelas contribuições, matérias-primas e equipamentos, além dos inúmeros conselhos ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Marcelo O. Orlandi e ao técnico Diego Tita, do laboratório LMA-IQ do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e aos técnicos de laboratório de Microscopia Eletrônica, pela colaboração na análise de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro e seu grupo de pesquisa, da Universidade Federal do ABC pelo fornecimento da hipericina sintetizada.

Aos professores Dr. Celso V. Santilli e Dr.^a Sandra H. Pulcinelli, bem como à técnica Danúbia, do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, pela colaboração nas análises térmicas e reológicas.

Aos professores Dr.^a Natália V. de Moraes e Dr. André G. dos Santos, e ao técnico Vinicius, do laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pela colaboração e auxílio na análise cromatográfica.

Ao Prof. Dr. Fernando R. Pavan e a todos do seu grupo de pesquisa, em especial a pós-doutoranda Isabel do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Araraquara, pela colaboração no ensaio biológico *in vitro*.

À Prof.^a Dr.^a Taís M. Bauab do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP - Araraquara, a todos integrantes do seu grupo de pesquisa, especialmente a doutora Luciani, pela colaboração em forma de materiais, estrutura e ensinamentos para a realização dos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

À Prof.^a Dr.^a Carla Raquel F. Mendonça, a todos do seu grupo de pesquisa, em especial ao doutor Lucas do Departamento de Análises Clínicas da UNESP - Araraquara, pela colaboração no ensaio biológico *in vitro* associado à terapia fotodinâmica.

Aos professores John F. Callan e Anthony McHale, ao seu grupo de pesquisa, especialmente ao pós-doutorando Dean Nicholas, e os funcionários da Ulster University (Coleraine, Irlanda do Norte) pela estrutura, materiais e conhecimentos adquiridos na inexplicável experiência BEPE.

Às técnicas de laboratório Natália, Margareth e Maria de Fátima, e todos os funcionários da UNESP - Araraquara, por toda assistência e bons momentos de convivência.

A equipe da Seção Técnica de Pós-graduação da UNESP - Araraquara, por toda atenção e serviços prestados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP. À Prof.^a Dr.^a Rosemeire C. L. R. Pietro, coordenadora do programa de Ciências Farmacêuticas e aos demais membros do conselho do programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2016/11198-4 (Brasil) e Processo BEPE nº 2018/17573-7, pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de doutorado, que me possibilitou dedicação exclusiva a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) código de financiamento 01, pelo financiamento as pesquisas.

Agradeço de coração a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica nesta jornada, assim como para o desenvolvimento deste trabalho!

EPÍGRAFE

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica causada tipicamente por *Candida albicans*, a qual apresenta resistência aos fármacos utilizados no tratamento. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com hipericina (HIP) encapsulada dispersos em hidrogéis (HG) de geleificação *in situ* demonstram ser uma opção interessante para viabilizar o tratamento da CVV, associada a métodos alternativos, como a terapia fotodinâmica (TFD). Este trabalho visa avaliar o potencial dos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos em HG, associados à TFD para administração vaginal. Os CLN sem (F6.5) e com HIP encapsulada (F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5) foram obtidos por sonicação a 35% de amplitude por 5min, contendo poloxamer 407 e na fase oleosa, estearato de polioxietileno, triglicérides do ácido cáprico/caprílico, óleo de rícino hidrogenado, etoxilado e/ou HIP. Os HG foram constituídos de poloxamer 407 e quitosana, sendo acrescidos de CLN com e sem HIP encapsulada em diferentes proporções de CLN:HG dando origem às formulações CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5. Os sistemas F6.5, F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5 caracterizados por espalhamento de luz dinâmico, apresentaram diâmetros nanométricos com baixa polidispersão, e revelaram excelente estabilidade física. A formulação F6.5 apresentou na análise de rastreamento de nanopartículas distribuição unimodal com predominância de partículas de 151 nm. Na microscopia eletrônica de transmissão foram observadas partículas de morfologias praticamente esféricas e em escalas nanométricas. A eficiência de encapsulação da HIP foi de 89,3%. A microscopia eletrônica de varredura dos HG acrescidos de CLN com HIP encapsulada obtidos em diferentes proporções, revelou valores médios de rugosidade superficial sem diferença estatística entre os sistemas. A reologia contínua mostrou que praticamente todos os sistemas tiveram um comportamento Newtoniano; enquanto na reologia oscilatória a maioria dos sistemas apresentou valores de G' superiores a G'' , com exceção de CLN_HIP-HG1. O HG livre e os sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 apresentaram satisfatórias propriedades mucoadesivas, além de valores de seringabilidade que comparados a relatos da literatura podem conferir a facilidade de estes serem aplicados na via vaginal. O ensaio de calorimetria exploratória diferencial evidenciou eventos endotérmicos com picos similares e característicos a componentes presentes nas formulações. Os dois métodos analíticos validados para quantificar a HIP (HIP solubilizada em metanol e HIP na solução receptora composta de meio tampão fosfato com 3% de Tween 80) mostraram-se condizentes aos valores preconizados pela ANVISA. O perfil de liberação *in vitro* da HIP liberada a partir de CLN_HIP-HG1, indicou comportamento de liberação sustentada do composto ativo durante as 12h de análise, e que os principais mecanismos de liberação seguem os modelos de Peppas e de Higuchi. Tais sistemas não apresentaram permeação na mucosa vaginal suína, além de baixos valores de retenção. Os CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG revelaram potente ação antifúngica frente à cepa de *C. albicans* ATCC 10231 e comportamento fungistático frente à levedura. Os CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG, tratados com TFD, reduziram significativamente as culturas planctônicas de *C. albicans* variando de aproximadamente 1 a 2 log₁₀ (UFC/mL) comparados ao YNB; enquanto a TFD mediada pelos sistemas F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1 apresentaram diminuições na viabilidade do biofilme de *C. albicans* de 2 e 1,2 log₁₀ (UFC/mL), respectivamente, em relação ao PBS. Na análise de SOSG, a solução de HIP livre, bem como os CLN com HIP encapsulada dispersos em HG foram capazes de fornecer efetivamente oxigênio à solução de metanol. Na análise antifúngica *in vivo* associada ou não à TFD, o antifúngico e os grupos tratados com TFD apresentaram uma

predominância de células fúngicas de diferentes tamanhos, além disso, CLN_HIP-HG1/TFD se destacou entre os grupos tratados com TFD obtendo uma melhora significativa do perfil terapêutico comparado ao grupo infectado. Assim, os resultados evidenciaram o potencial antifúngico dos sistemas *in situ* para a administração vaginal da HIP demonstrando serem capazes de contribuir no tratamento da CVV.

Palavras-chave: *Candida albicans*; hipericina; atividade antifúngica; terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a fungal infection typically caused by *Candida albicans*, which is resistant to the drugs used in the treatment. The hypericin (HYP)-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) dispersed *in situ* hydrogels (HG) proves to be an interesting option for the treatment of VVC, associated to alternative methods such as photodynamic therapy (PDT). This work aims to evaluate the potential of HYP-loaded and empty NLC or NLC dispersed in the HG, associated to PDT for vaginal administration. The empty NLC (F6.5) and HYP-loaded NLC (F6.5_0.05, F6.5_0.25 and F6.5_0.5) and were obtained by sonication at 35% amplitude for 5min, containing poloxamer 407 the aqueous phase and in the oil phase, polyoxyethylene stearate, capric/caprylic acid triglycerides, ethoxylated hydrogenated castor oil and/or HYP. The HG were composed of poloxamer 407 and chitosan, being incorporated into HYP-loaded and empty NLC in different proportions of NLC:HG giving rise to formulations NLC_HYP-HG1, NLC_HYP-HG2, NLC_HYP-HG3, NLC_HYP-HG4 and NLC_HYP-HG5. The F6.5, F6.5_0.05, F6.5_0.25 and F6.5_0.5 systems, characterized by dynamic light scattering, presented nanometric diameters with low polydispersity and showed excellent physical stability. Formulation F6.5 showed unimodal distribution in the nanoparticle screening with predominance of 151 nm particles. Transmission electron microscopy showed particles of practically spherical morphologies and nanometric scales. The HYP encapsulation efficiency was 89.3%. Scanning electron microscopy of the HG and HYP-loaded NLC in different proportions of NLC:HG, revealed average values of surface roughness without statistical difference between the systems. Continuous rheology showed that all systems had Newtonian behavior; while in oscillatory rheology most systems showed G' values higher than G'' , except of NLC_HYP-HG1. The HG and the NLC_HYP-HG1 and NLC_HYP-HG2 systems showed satisfactory mucoadhesive properties, in addition to syringability values that, compared to reports in the literature, showed their ease of application in the vaginal route. Differential scanning calorimetry showed endothermic events with similar peaks and characteristics to components present in the formulations. Two analytical methods were validated to quantify the HYP (HYP solubilized in methanol and HYP in the receiving solution of phosphate buffered medium with 3% Tween 80), being consistent with the values recommended by ANVISA. The *in vitro* release profile of HYP released from NLC_HYP-HG1, indicated a sustained drug release behavior during the 12h of analysis, and that the main release mechanisms follow the Peppas and Higuchi models. Such systems showed no permeation in the porcine vaginal mucosa, in addition to low retention values. The NLC with encapsulated HYP dispersed or not in HG, showed potent antifungal action against the strain of *C. albicans* ATCC 10231 and fungistatic behavior against yeast. The HG incorporated into HYP-loaded and empty NLC in different proportions, treated with PDT, significantly reduced the planktonic cultures of *C. albicans* ranging from approximately 1 to 2 log₁₀ (CFU/mL) compared to YNB; while the PDT mediated by the F6.5_0.05 and NLC_HYP-HG1 systems showed decreases in the viability of the *C. albicans* biofilm of 2 and 1.2 log₁₀ (CFU/mL), respectively, in relation to the PBS. In the SOSG analysis, the free HYP solution, as well as the HYP-loaded NLC dispersed in HG were able to effectively supply oxygen to the methanol solution. In the *in vivo* antifungal analysis associated or not with PDT, the antifungal and groups treated with PDT showed a predominance of fungal cells of different sizes, in addition, NLC_HYP-HG1/PDT stood out among the groups treated with PDT, obtaining a significant improvement in the therapeutic profile compared to the infected group. Thus, the results showed the antifungal potential of *in situ* systems

for the vaginal administration of HYP, demonstrating that they are capable of contributing to the treatment of VVC.

Keywords: *Candida albicans*; hypericin; antifungal activity; photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da hipericina.....	33
Figura 2. Cronograma do modelo de ensaio terapêutico <i>in vivo</i> de CVV utilizando camundongos fêmeas linhagem C5BL/6.....	57
Figura 3. Sistemas (HG, CLN-HG e F6.5_0,05) administrados no canal vaginal dos camundongos fêmeas.....	57
Figura 4. Diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd dos CLN sem HIP encapsulada, desenvolvidos em diferentes amplitudes e tempos de sonicação <i>versus</i> tempo em dia. Média±D.P; n=3.....	60
Figura 5. Potencial zeta dos CLN sem HIP encapsulada, desenvolvidos em diferentes amplitudes e tempos de sonicação <i>versus</i> tempo em dia. Média±D.P; n=3.....	64
Figura 6. Relação entre distribuição de tamanho de partículas e concentração, medida por NTA (diluição de 2000 x).....	66
Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd dos CLN com HIP encapsulada <i>versus</i> tempo em dias. Média±D.P; n=3.....	67
Figura 8. Potencial zeta dos CLN com HIP encapsulada <i>versus</i> tempo em dia. Média±D.P; n=3.....	68
Figura 9. Fotomicrografias de F6.5 (A), F6.5_0,05 (B), F6.5_0,25 (C) e F6.5_0,5 (D). A e C em aumento de 50x. B e D em aumento de 100x.....	69
Figura 10. Fotomicrografias dos sistemas CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5. Aumento de 150x.....	71
Figura 11. Reogramas dos sistemas. Símbolos cheios indicam curvas ascendentes e símbolos vazios, curvas descendentes.....	72
Figura 12. Comportamento reológico oscilatório dos valores de G' e G'' em função da frequência (Hz) para os sistemas. Símbolos cheios indicam módulo elástico (G') e símbolos vazios, módulo viscoso (G'')	74
Figura 13. Resultados de trabalho de força de mucoadesão (N.sec) e de força de mucoadesão (N) do HG e dos sistemas. Média±D.P; n=6.....	76
Figura 14. Trabalho de seringabilidade (N.mm) para extrusão de sistemas através de seringas plásticas de 3 mL. Média±D.P; n=6.....	78
Figura 15. Termogramas dos componentes analisados individualmente.....	79
Figura 16. Termogramas dos sistemas.....	80

Figura 17. Cromatograma de HIP por CLAE.....	82
Figura 18. Representação gráfica da curva analítica do método I para quantificação de HIP por CLAE	81
Figura 19. Representação gráfica da curva analítica do método II para quantificação de HIP por CLAE.....	83
Figura 20. Gráfico de dispersão de resíduo padrão derivado da curva analítica I.....	84
Figura 21. Gráfico de dispersão de resíduo padrão da curva analítica II.....	85
Figura 22. Cromatogramas dos sobrenadantes das diferentes amostras.....	88
Figura 23. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da HIP livre e do CLN_HIP-HG1.....	91
Figura 24. Crescimento das colônias de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 após 48h de incubação.....	95
Figura 25. Valores médios e DP do Log ₁₀ (UFC/mL) de culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> analisadas no escuro e tratadas com TFD, mediados pelos diferentes grupos.....	96
Figura 26. Valores médios e DP do Log ₁₀ (UFC/mL) de biofilmes de <i>C. albicans</i> analisados no escuro e tratados com TFD, mediados pelos diferentes grupos.....	98
Figura 27. Curvas de aumento percentual da fluorescência do SOSG para as amostras submetidas ao escuro e a TFD <i>versus</i> tempo em minutos.....	99
Figura 28. Células do epitélio vaginal dos camundongos fêmeas. Aumento de 40x...101	
Figura 29. Imagens de lavados vaginais com presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas, corados por meio da coloração de <i>Giemsa</i> . Aumento de 40x...101	
Figura 30. Lavados vaginais dos grupos controles com presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas oito dias após a infecção fúngica. Aumento de 40x...102	
Figura 31. Lavados vaginais dos grupos tratados com sistemas na presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas oito dias após a infecção fúngica. Aumento de 40x.....	103
Figura 32. Valores médios e DP dos números de leveduras em Log ₁₀ (UFC) dos grupos controles e de tratamento no escuro e mediado pela TFD.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura dos CLN sem HIP encapsulada submetidos a diferentes amplitudes (%) e tempos de sonicação (minutos).....	39
Tabela 2. Nomenclatura e composição dos CLN com três diferentes concentrações de HIP encapsulada.....	39
Tabela 3. Nomenclatura dos HG acrescidos de CLN com HIP, em diferentes proporções de mistura (% , m/v).....	42
Tabela 4. Parâmetros empregados na metodologia analítica.....	45
Tabela 5. Especificações dos grupos experimentais e respectivos tratamentos do ensaio biológico <i>in vitro</i> realizado no escuro e associado à TFD, frente as culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	52
Tabela 6. Especificações dos grupos experimentais e respectivos tratamentos do ensaio biológico <i>in vitro</i> realizado no escuro e associado à TFD, contra biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	53
Tabela 7. Grupos experimentais e respectivas especificações de tratamentos do ensaio terapêutico de CVV causado por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 em camundongos fêmeas.....	56
Tabela 8. Índice de consistência do fluxo (<i>K</i>) e índice do comportamento do fluxo (<i>n</i>) do HG e dos HG acrescidos de CLN com HIP, analisados a 37°C. Média±D.P; n=3.....	73
Tabela 9. Valores de temperaturas de fusão dos picos da HIP e da QS analisados individualmente.....	79
Tabela 10. Valores de temperatura de fusão dos picos dos sistemas: F6.5, F6.5_0,05, HG e CLN_HIP-HG1.....	80
Tabela 11. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica I....	84
Tabela 12. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica II....	85
Tabela 13. Precisão intracorrida para quantificação de HIP por CLAE – método I.....	86
Tabela 14. Precisão intracorrida para quantificação de HIP por CLAE – método II.....	86
Tabela 15. Precisão intercorrida para quantificação de HIP por CLAE – método I.....	86
Tabela 16. Precisão intercorrida para quantificação de HIP por CLAE – método II.....	87
Tabela 17. Percentual de exatidão obtido entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de HIP – método I.....	87

Tabela 18. Percentual de exatidão obtido entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de HIP – método II.....	87
Tabela 19. Alterações para a avaliação da robustez – método I.....	89
Tabela 20. Estabilidade da solução analítica analisada por 96h – método I.....	90
Tabela 21. Modelos matemáticos aplicados para a análise cinética de liberação.....	92
Tabela 22. Retenção vaginal de HIP e de CLN_HIP-HG1	93
Tabela 23. Atividade antifúngica contra a cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	94

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- $\% EE = \frac{HIP (total) - HIP (livre solúvel)}{HIP (total)} \times 100$	41
Equação 2- $\tau = k \cdot (\gamma)^\eta$	43
Equação 3- $\% Recuperação = \frac{Concentração\ média\ experimental \times 100}{Concentração\ teórica}$	47
Equação 4- $LD = \frac{DP\alpha \times 3}{IC}$	47
Equação 5- $LQ = \frac{DP\alpha \times 10}{IC}$	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ASD+clo	Ágar Sabouraud + Cloranfenicol
MOP's	Ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico
CVV	Candidíase Vulvovaginal
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FS	Composto Fotossensibilizante
LED	Diodo emissor de luz
D.P	Desvio Padrão
D.P.R	Desvio Padrão Relativo
%EE	Eficiência de Encapsulação
EP	Estearato de Polioxietileno 40
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ICH	Guia <i>Harmonised Tripartite Guideline</i>
HIP	Hipericina
HG	Hidrogéis
Hz	Hertz
h	Hora
Ipd	Índice de Polidispersidade
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
Método I	Método Analítico Constituído de Solução de HIP em Metanol
Método II	Método Analítico Constituído da Solução de HIP em Meio Tampão Fosfato com 3% de Tween 80
G'	Módulo Elástico
G''	Módulo Viscoso
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução

μm	Micrometro
μM	Micromolar
μL	Microlitros
min	Minuto
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
nm	Nanômetro
OE	Óleo de Rícino Hidrogenado, Etoxilado 40
OMS	Organização Mundial da Saúde
³ O ₂	Oxigênio no Estado Fundamental
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
PES	Poliétersulfona
PZ	Potencial Zeta
P407	Poloxamer 407
QS	Quitosana
qsp	Quantidade Suficiente Para
RES	Resazurina
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
s	Segundos
TGACC	Triglicérides do Ácido Cáprico/Caprílico
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Candidíase vulvovaginal e <i>C. albicans</i>	27
2.2 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal	288
2.2.1 Hidrogel	30
2.3 Terapia fotodinâmica e Hipericina	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos gerais	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Material	36
4.1.1 Principais reagentes e matérias-primas	36
4.1.2 Principais equipamentos	37
4.2 Métodos	38
4.2.1 Síntese da HIP	38
4.2.2 Desenvolvimento dos CLN com e sem HIP encapsulada	38
4.2.3 Caracterização físico-química dos CLN com e sem HIP encapsulada ...	40
4.2.3.1 Análise de espalhamento de luz dinâmico	40
4.2.3.2 Análise de rastreamento das nanopartículas	40
4.2.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão	41
4.2.3.4 Eficiência de encapsulação da HIP	41
4.2.4 Desenvolvimento dos HG de geleificação <i>in situ</i> acrescidos de CLN com e sem HIP	41
4.2.5 Caracterização físico-química dos HG de geleificação <i>in situ</i> acrescidos de CLN com e sem HIP	42
4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução	42
4.2.5.2 Análises reológicas contínuas e oscilatórias	43
4.2.5.2.1 Reologia continua	43
4.2.5.2.2 Reologia oscilatória	43
4.2.5.3 Ensaio de mucoadesão <i>in vitro</i>	44
4.2.5.4 Determinação de seringabilidade	44

4.2.5.5 <i>Análise de calorimetria exploratória diferencial</i>	45
4.2.6 Validação da metodologia analítica para quantificação de HIP por cromatografia líquida de alta eficiência	45
4.2.6.1 <i>Conformidade do sistema cromatográfico</i>	46
4.2.6.2 <i>Linearidade</i>	46
4.2.6.3 <i>Precisão</i>	46
4.2.6.4 <i>Exatidão/Recuperação</i>	47
4.2.6.5 <i>Especificidade/Seletividade</i>	47
4.2.6.6 <i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	47
4.2.6.7 <i>Robustez</i>	48
4.2.7 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> de HIP	48
4.2.7.1 <i>Estudo de solubilidade da HIP</i>	48
4.2.7.2 <i>Perfil de liberação <i>in vitro</i> de HIP</i>	48
4.2.7.3 <i>Ensaio de permeação e de retenção <i>in vitro</i> da HIP</i>	49
4.2.8 Ensaios antifúngicos <i>in vitro</i>	50
4.2.8.1 <i>Concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima</i>	50
4.2.8.2 <i>Leitura com revelador</i>	51
4.2.9 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> associados à terapia fotodinâmica	51
4.2.9.1 <i>Cepa de <i>C. albicans</i></i>	51
4.2.9.2 <i>Eficácia da terapia fotodinâmica contra culturas planctônicas</i>	51
4.2.9.3 <i>Eficácia da terapia fotodinâmica contra biofilmes</i>	53
4.2.10 Produção de oxigênio singlete	54
4.2.11 Ensaios antifúngicos <i>in vivo</i> associados ou não à terapia fotodinâmica	55
4.2.11.1 <i>Cepa de <i>C. albicans</i> e Linhagem animal</i>	55
4.2.11.2 <i>Ensaio terapêutico <i>in vivo</i> de CVV</i>	55
4.2.11.3 <i>Análise da eficácia do tratamento</i>	58
4.2.12 Análise estatística	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Desenvolvimento dos CLN com e sem HIP encapsulada	59
5.2 Caracterização físico-química dos CLN com e sem HIP encapsulada	59
5.2.1 Análise de espalhamento de luz dinâmico dos CLN	60

5.2.2	Análise de rastreamento das nanopartículas	66
5.2.3	Análise de espalhamento de luz dinâmico dos CLN contendo HIP	67
5.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão	69
5.2.5	Eficiência de encapsulação da HIP	70
5.3	Caracterização físico-química dos HG de geleificação <i>in situ</i> acrescidos de CLN com e sem HIP	70
5.3.1	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução	70
5.3.2	Análises reológicas contínuas e oscilatórias	72
5.3.2.1	Reologia contínua	72
5.3.2.2	Reologia oscilatória	74
5.3.3	Ensaio de mucoadesão <i>in vitro</i>	75
5.3.4	Determinação de seringabilidade	77
5.3.5	Análise de calorimetria exploratória diferencial	79
5.3.6	Seleção dos HG de geleificação <i>in situ</i> acrescidos de CLN com HIP ..	81
5.4	Validação da metodologia analítica para quantificação da HIP por CLAE	82
5.4.1	Conformidade do sistema.....	82
5.4.2	Linearidade	83
5.4.3	Precisão	86
5.4.4	Exatidão/Recuperação.....	87
5.4.5	Especificidade/Seletividade.....	88
5.4.6	Limite de detecção e limite de quantificação	89
5.4.7	Robustez	89
5.5	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> de HIP	90
5.5.1	Estudo de solubilidade da HIP	90
5.5.2	Perfil de liberação <i>in vitro</i> de HIP.....	91
5.5.3	Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da HIP	93
5.6	Ensaio antifúngicos <i>in vitro</i>	94
5.6.1	Concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima	94
5.7	Ensaio biológicos <i>in vitro</i> associados à terapia fotodinâmica.....	95
5.7.1	Eficácia da TFD contra culturas planctônicas.....	95
5.7.2	Eficácia da TFD contra biofilmes.....	97
5.8	Produção de oxigênio singlete	99

5.9 Ensaios antifúngicos <i>in vivo</i> associados ou não à terapia fotodinâmica	100
6 CONCLUSÕES	107
7 REFERÊNCIAS	109
8 ANEXO 1	121

1 INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é responsável por aproximadamente 95% das infecções do trato genital feminino. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 75% das mulheres entre a fase da puberdade e a menopausa são acometidas pela infecção ao menos uma vez durante a vida, sendo que 40 a 50% destas apresentam pelo menos um episódio de recidiva da doença (LEAL *et al.*, 2016).

Esta alta incidência pode ser justificada pela flexibilidade morfológica da *Candida albicans*, o principal agente etiológico responsável pela doença. *C. albicans* é um organismo eucariótico, de morfologia esférica, ovóide ou alongada de aspecto rugoso, no qual sua proliferação é favorecida em temperaturas que variam entre 20°C e 38°C e em pH ácido (SANTANA *et al.*, 2013).

Nos estágios de infecção, *C. albicans* se adere à superfície da mucosa na forma de leveduriforme ou em formas filamentosas denominadas hifas, as quais se aderem às células epiteliais e causam danos, induzidos provavelmente por enzimas hidrolíticas (ZHU; FILLER, 2010).

O tratamento de escolha para a CVV emprega o uso de antifúngicos como os fármacos azólicos (fluconazol, cetoconazol e miconazol) e os poliênicos (nistatina e anfotericina B). Contudo, o uso indiscriminado pode apresentar risco de resistência antifúngica e toxicidade especialmente nefrotoxicidade, comprometendo a utilização na terapia antifúngica (ZHANG *et al.*, 2006; VIEIRA; SANTOS, 2017).

Dessa forma, as pesquisas estão sendo direcionadas na busca de novas moléculas bioativas para desenvolver preparações farmacêuticas que apresentem menores efeitos adversos que os fármacos convencionais. As fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem ótimas possibilidades de compostos de interesse terapêutico (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Neste contexto, a espécie *Hypericum perforatum* L. popularmente conhecida como Erva de São João, é uma planta herbácea perene da família Hypericaceae encontrada na Ásia, Europa e Norte da África (PENG *et al.*, 2005).

Dentre as classes de compostos biologicamente ativos do *H. perforatum* destaca-se a hipericina (HIP), uma naftodiantrona derivada da antraquinona (FIGUEIRÓ *et al.*, 2010). A HIP é um composto fotossensibilizante (FS) natural de caráter hidrofóbico que têm apresentado atividade terapêutica antidepressiva, antitumoral, antiviral e antimicrobiana (KARIOT; BILIA, 2010). Assim, sua incorporação em sistemas de

liberação sustentada objetivando administração vaginal, demonstra ser uma opção interessante para viabilizar o tratamento da doença em questão.

A via vaginal é uma atrativa rota de administração de fármaco ou compostos ativos, por apresentar uma elevada permeabilidade do epitélio vaginal e área de superfície da mucosa vaginal, ótimo fornecimento de sangue, além de ausência do efeito hepático de primeira passagem (SILVA *et al.*, 2014; ENSIGN *et al.*, 2014).

No entanto, as principais formas farmacêuticas destinadas à aplicação vaginal (principalmente cremes, pomadas e géis) apresentam limitações como desconforto ao paciente relacionado à baixa distribuição e retenção no epitélio vaginal, à auto-inserção de objetos na vagina, a remoção involuntária da forma farmacêutica após a sua administração, além de prolongado tempo de tratamento, os quais podem influenciar na aceitabilidade da forma farmacêutica, comprometendo a eficácia da terapia (KESHWANI *et al.*, 2014; JOHAL *et al.*, 2016).

Logo, visando superar as limitações terapêuticas relacionadas ao tratamento convencional da CVV e assim, garantir uma maior adesão do paciente ao tratamento, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) dispersos em hidrogéis (HG) de geleificação *in situ* pode ser uma promissora estratégia para a liberação sustentada de HIP na terapia antifúngica.

Os CLN apresentam uma matriz composta por uma mistura de lipídio líquido e lipídio sólido à temperatura ambiente, dando origem a uma matriz lipídica imperfeita com cristais estruturalmente desorganizados, os quais proporcionam maiores espaços para a compartimentalização de fármacos ou compostos ativos hidrofóbicos (DAS *et al.*, 2012; KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014). Neste requisito, podem ser excelentes sistemas de liberação sustentada para a encapsulação da HIP.

Os HG constituem-se de redes poliméricas tridimensionais formadas por macromoléculas interligadas por meio de interações físicas (emaranhados moleculares, cristalitos, ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals) ou químicas (ligações covalentes). Este sistema possui a capacidade de se expandir em contato com a água, ser biocompatível, apresentar elevada porosidade, auxiliar na liberação controlada de fármacos ou compostos ativos, além de incorporar polímeros sintéticos e naturais (PEPPAS *et al.*, 2000; HOFFMAN, 2012).

Neste contexto, a associação de polímeros sintéticos como P407 e naturais como a QS que apresentam propriedades termo-reversíveis e mucoadesivas, respectivamente,

pode ser uma excelente estratégia para desenvolver HG de geleificação *in situ* para contribuir na terapia da CVV (CHOI; YOO, 2010; LIU *et al.*, 2017).

Desta forma, os CLN com HIP encapsulada dispersos em HG geleificação *in situ* normalmente se apresentam fluidos no momento da administração, mas sofrem transição de fase mediante a temperatura do meio fisiológico vaginal, tendo sua viscosidade alterada (CARVALHO *et al.*, 2014).

Em virtude de suas propriedades termo-reversíveis e mucoadesivas podem apresentar uma adequada viscosidade para aplicação tópica, capaz de facilitar a adesão do sistema ao local de aplicação, prolongar seu tempo de permanência na mucosa vaginal, liberar de forma sustentada fármacos ou compostos hidrofóbicos e assim, reduzir a frequência de administração (HANI; SHIVAKUMARAN, 2013; JOHAL *et al.*, 2016).

Logo, a combinação de terapias adjuvantes, como a terapia fotodinâmica (TFD) para os pacientes com CVV pode ser uma alternativa a ser explorada para potencializar o tratamento de infecções fúngicas induzida por *C. albicans*.

A TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um FS que estimulado por uma fonte de luz em um comprimento de onda apropriado, reage com o oxigênio presente nos tecidos, induzindo a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reações catalíticas, as quais conduzem a inativação celular e/ou à morte do microrganismo (PERUSSI, 2007; MACHADO-DE-SENA *et al.*, 2014).

Além de apresentar atividade terapêutica antimicrobiana, estudos demonstram que a HIP apresenta efeitos fototóxicos provavelmente devido ao elevado rendimento quântico do estado triplete e geração de oxigênio singlete após a estimulação de luz (KARIOTI; BILIA, 2010; BORGHI-PANGONI *et al.*, 2017). Com isto, o potencial FS pode contribuir no tratamento de infecções fúngicas como a CVV utilizando como estratégia alternativa a TFD.

Portanto, buscando otimizar tal infecção fúngica, este estudo objetivou desenvolver CLN dispersos ou não em HG de geleificação *in situ* associados à aplicação da TFD, para administração vaginal de HIP.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Candidíase vulvovaginal e *C. albicans*

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica oportunista do trato geniturinário inferior feminino, caracterizada principalmente por corrimento vaginal, prurido, edema e eritema na vulva e na vagina (BOATTO *et al.*, 2007).

Tido como um dos problemas ginecológicos mais frequentes, a CVV é a segunda infecção genital mais comum no Brasil, ficando atrás da vaginose bacteriana (ROBATTO *et al.*, 2017). Neste caso, microrganismos como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* e *Mobiluncus mulieri* substituem as espécies de *Lactobacillus* presentes na microbiota normal (GAYDOS *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 75% das mulheres entre a fase da puberdade e a menopausa são acometidas pela infecção ao menos uma vez na vida, sendo que 40 a 50% dessas apresentam pelo menos um episódio de recidiva da doença (LEAL *et al.*, 2016).

A microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus*, responsável pela produção de ácido láctico, o qual propicia um pH vaginal ácido que mantém as secreções vaginais e protege o ambiente vaginal de microrganismos patogênicos (SHIOZAWA *et al.*, 2007).

A infecção é comumente causada por leveduras comensais que fazem parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis e permanecem na mucosa vaginal como colonizantes. Determinadas condições tendem a perturbar o ambiente vaginal e a *Candida* pode se tornar patogênica. Assim, a CVV sintomática ocorre em virtude de a *Candida* acelerar seu processo de multiplicação e invadir a mucosa oral, gastrointestinal e vaginal (FURTADO *et al.*, 2018).

Estima-se que cerca de 60 a 90% dos casos de CVV são causados pela espécie *Candida albicans*. Esta é caracterizada como um organismo eucariótico, em que as células leveduriformes apresentam forma esférica, ovóide ou alongada de aspecto rugoso, cujo seu crescimento é favorecido em pH ácido e temperaturas que variam entre 20°C e 38°C (SANTANA *et al.*, 2013).

A aderência da *C. albicans* na superfície das mucosas é um fator preocupante ao considerar que morfológicamente, a levedura pode se desenvolver como leveduriforme ou hifa. Na infecção, suas formas filamentosas denominadas de pseudo-hifas e/ou hifas,

.....*Mariana Rillo Sato*.....

tendem a se aderir às células epiteliais causando danos, induzidos provavelmente por enzimas hidrolíticas; além de proporcionar o aumento da resistência à fagocitose quando comparada à forma leveduriforme (ZHU; FILLER, 2010; TSANG *et al.*, 2012).

Embora os agentes antifúngicos poliênicos (nistatina e anfotericina B) e azólicos (fluconazol, cetoconazol e miconazol) empregados na terapia de escolha sejam eficazes, o uso indiscriminado pode apresentar toxicidade, especialmente nefrotoxicidade e risco de resistência da levedura aos antifúngicos (ZHANG *et al.*, 2006; VIEIRA; SANTOS, 2017). Tais limitações comprometem a utilização destes fármacos e conseqüentemente, a eficácia do tratamento da CVV, o que reforça a necessidade de promissoras estratégias terapêuticas e nanotecnológicas.

2.2 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal

A vagina é um importante órgão do sistema reprodutor feminino, que promove a capacidade reprodutiva. Caracterizada como um canal fibromuscular, anatomicamente a vagina se estende do colo uterino a vulva, sendo localizada entre o reto, a bexiga e a uretra (FERREIRA *et al.*, 2015).

Histologicamente a parede vaginal é composta por três camadas celulares que lhe confere uma extensa elasticidade, vascularização e permeabilidade. O epitélio vaginal mucosal é uma camada revestida internamente com numerosas pregas e rugas, constituída por um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado. A camada muscular é composta de duas camadas de músculo liso, circular interna e longitudinal externa contendo colágeno e elastina. Enquanto o tecido adventício é o revestimento externo constituído de um tecido conjuntivo denso rico em vasos sanguíneos, feixes de nervos e fibras elásticas (NAYAK *et al.*, 2010; ARAÚJO-PEREIRA; BRUSCH, 2012; BRAY *et al.*, 2017).

Assim, a via vaginal para administração de fármacos ou compostos ativos de efeito tópico ou sistêmico vem se destacando, por apresentar elevada permeabilidade do epitélio vaginal e área superfície da mucosa, além de ótimo suprimento sanguíneo (SILVA *et al.*, 2014).

Comparada à via de administração oral, a administração vaginal é vantajosa por impedir o efeito hepático de primeira passagem e a interferência na absorção de fármaco pelo trato gastrointestinal, além de possibilitar uma menor frequência de doses e de

efeitos adversos dos fármacos (ENSIGN *et al.*, 2014; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2017).

No entanto, limitações como desconforto ao paciente relacionado à baixa distribuição e retenção no epitélio vaginal, à auto-inserção de objetos na vagina, remoção involuntária da forma farmacêutica convencional após a sua administração (principalmente cremes, pomadas e géis), e prolongado tempo de tratamento são fatores que podem influenciar na aceitabilidade da forma farmacêutica e então, comprometer à adesão ao tratamento (KESHWANI *et al.*, 2014; JOHAL *et al.*, 2016).

Na tentativa de contornar tais problemas de forma a contribuir na terapia antifúngica, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos em escalas nanométricas, para administração vaginal têm sido alvo de pesquisas (ANTIMISSIONIS; MOURTAS, 2015).

Entre os sistemas, as nanopartículas lipídicas de primeira e de segunda geração como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), respectivamente, têm atraído notável interesse na comunidade científica (CASSANO *et al.*, 2016; MOAZENI *et al.*, 2016).

As NLS são obtidas por lipídios sólidos à temperatura ambiente, estabilizadas por agentes tensoativos que formam uma matriz com estruturas cristalinas ordenadas. Deste modo, permitem uma liberação sustentada de fármaco/compostos ativos hidrofóbicos, apresentam estabilidade físico-química e produção em larga escala (NASERI *et al.*, 2015).

Entretanto, as estruturas cristalinas ordenadas das NLS possibilitam uma baixa encapsulação de fármaco, devido a uma eventual transição polimórfica. Após a sua formação os lipídios se auto organizam em uma estrutura de alta energia (α ou β') com imperfeições, assim, durante o período de armazenamento tendem a entrar em uma conformação de baixa energia e mais organizada (β), que ocasiona a expulsão do fármaco/compostos ativos (MÜLLER *et al.*, 2002; JAISWAL *et al.*, 2014).

Proposto como uma alternativa para melhorar a estabilidade físico-química e a eficiência de encapsulação de fármacos devido à possível transição polimórfica, os CLN foram desenvolvidos a partir da mistura de lipídios líquidos e sólidos à temperatura ambiente, formando uma matriz lipídica imperfeita com cristais estruturalmente desordenados. Com isto, a transição polimórfica tende a ser retardada, o que minimiza a expulsão de fármaco durante o armazenamento, possibilitando uma excelente

estabilidade físico-química ao CLN (MÜLLER *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Neste contexto, os CLN apresentam-se como vantajosos sistemas de liberação para administração vaginal de fármacos/compostos ativos, devido principalmente ao rearranjo da composição lipídica, que proporciona uma maior compartimentalização do fármaco na matriz e consequentemente, uma eficiente encapsulação, além de redução da toxicidade e das reações adversas do fármaco, proteção da degradação, liberação sustentada do fármaco no seu sítio de ação e excelente estabilidade físico-química (SOUTO *et al.*, 2007; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012; KOLENYAK-SANTOS *et al.*, 2014).

2.2.1 Hidrogel

Os hidrogéis (HG) constituem-se de redes poliméricas tridimensionais formadas por macromoléculas interligadas por meio de interações físicas que surgem a partir de entrelaçamentos da cadeia polimérica (emaranhados moleculares, cristalitos, interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas) ou químicas por meio de ligações covalentes ou ligações “permanentes”. Este sistema possui a capacidade de se expandir em contato com a água, ser biocompatível, apresentar elevada porosidade, auxiliar na liberação controlada de fármacos/compostos ativos, podendo incorporar polímeros sintéticos e naturais (PEPPAS *et al.*, 2000; HOFFMAN, 2012).

Em virtude a tais características, os HG têm sido consideravelmente investigados para aplicação farmacêutica após sua expansão em contato com a água ou em resposta a estímulos fisiológicos como força iônica, pH e temperatura. Os HG formados *in situ* são líquidos no momento da administração, mas sofrem transição de fase à medida que a temperatura aumenta, de modo a formar um gel viscoelástico (MOON *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014).

Podem ser constituídos por polímeros sintéticos como os poliésteres e/ou naturais como os polissacarídeos (CHOI; YOO, 2010). A afinidade do HG às moléculas de água pode ser atribuída principalmente a grupamentos hidrofílicos (OH, CONH, CONH₂ e SO₃H) normalmente presentes no interior dos polímeros, que formam estruturas de HG (HAMADI *et al.*, 2008).

Entre os polímeros sintéticos mais utilizados para a obtenção de sistemas termoreversíveis dependente da temperatura, destaca-se o poloxamer 407 (P407). Este é um

copolímero não iônico estruturalmente formado por dois blocos hidrofílicos poli-(oxietileno) (PEO) e um bloco hidrofóbico poli-(oxipropileno) (PPO). Abaixo da temperatura de transição, apresenta-se como solução, mas à medida que a temperatura aumenta a região hidrofóbica do bloco PPO se desidrata em que os monômeros do P407 se arranjam podendo formar micelas constituídas por um núcleo de PPO e uma superfície de PEO e assim, ocasionar a transição do estado sol para gel (UR-REHMAN *et al.*, 2011; DEVI *et al.*, 2013).

No entanto, os HG a base de P407 normalmente apresentam propriedades mucoadesivas restrita. Visando aumentar o tempo de permanência do sistema no ambiente vaginal, o P407 pode ser associado à quitosana (QS).

A QS é um polissacarídeo catiônico natural obtido a partir da quitina pela reação de desacetilação. Apresenta propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, uma potencial atividade antimicrobiana e antifúngica, além de mucoadesiva de caráter catiônico pH-dependente. A protonação dos grupos amino possibilita se manter insolúvel em meio aquoso neutro, mas solúvel em meio ácido. Neste contexto, tais propriedades conferem a QS um potencial uso para aplicação biomédica e farmacêutica para veiculação de liberação de fármacos (PATEL *et al.*, 2010; BOSTAN *et al.*, 2013).

Em virtude de suas propriedades termos-reversíveis e mucoadesivas, o desenvolvimento de HG de geleificação *in situ* pode ser uma excelente estratégia terapêutica, uma vez tende a apresentar mudança da sua viscosidade com a geleificação *in situ* no meio fisiológico. Assim, poder ser capaz de facilitar a adesão ao local de aplicação, liberar de forma sustentada fármacos/compostos ativos hidrofóbicos, prolongar seu tempo de permanência na mucosa vaginal e com isto, reduzir os efeitos adversos, bem como sua frequência de administração (HANI; SHIVAKUMARAN, 2013; KLOUDA, 2015; JOHAL *et al.*, 2016).

2.3 Terapia fotodinâmica e Hipericina

A terapia fotodinâmica (TFD) baseia-se em reações de oxidação induzidas por uma fonte de luz, que conduzem à foto-inativação do microrganismo. Para que essas reações ocorram, é necessário que um composto fotossensibilizante (FS) seja estimulado por uma fonte de luz em um comprimento de onda apropriado, onde ocorre a absorção pelo FS utilizado (KHARKWAL *et al.*, 2011).

.....*Mariana Rillo Sato*.....

A combinação FS e luz na presença de oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), induz a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reações catalíticas, que conduz a inativação celular e/ou à morte do microrganismo por dano oxidativo (PERUSSI, 2007; MACHADO-DE-SENA *et al.*, 2014).

Neste contexto, o mecanismo da TFD tende a atuar por duas vias. Na reação do Tipo I, o FS no estado triplete excitado reage diretamente com o substrato ou uma moléculapor transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, podendo produzir radicais livresou íons radicais. Deste modo, têm-se comoprincipais produtos desta reduçãoas ROS, como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila. Na reação do Tipo II ocorreà transferência de energia do FS no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio, ocasionado como principal produto a obtenção de oxigênio singlete no estado excitado. Embora ambos os mecanismos possam ocasionar a destruição celular, este último normalmente é o principal responsável pela foto-inativação de microorganismos (CASTANO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Dessa forma, muitas pesquisas estão sendo direcionadas no sentido de desenvolver estratégias alternativas no tratamento da CVV, dentre elas a busca de novos compostos bioativos (WILLIAMS *et al.*, 2011). As fontes naturais podem oferecer ótimas possibilidades de substâncias de interesse terapêutico, inclusive para o tratamento de infecções fúngicas.

O *Hypericum perforatum* L. popularmente conhecido como Erva de São João, é uma planta herbácea perene da família Hypericaceae, encontrada na natureza no Norte da África, Ásia e Europa (PENG *et al.*, 2005).

Dentre as classes de compostos biologicamente ativos do *H. perforatum* encontra-se a hipericina (HIP), a qual se situa principalmente no interior das glândulas escuras das pétalas edas folhas do *H. perforatum* (SOUZA *et al.*, 2006). A Figura 1 representa a estrutura química da HIP obtida pelo *Software Advanced Chemistry Development/Structure Elucidator* (versão 2017).

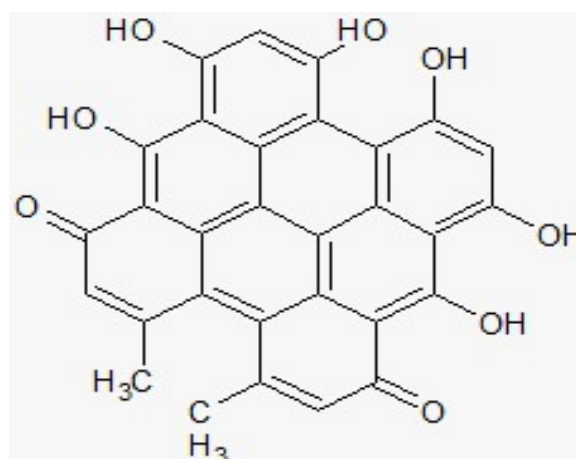


Figura 1. Estrutura química da hipericina.

Fonte: National Center for Biotechnology Information (2020).

A HIP pertence ao grupo das naftodiantronas derivada da antraquinona, possuindo como propriedades físico-químicas, massa molecular 504,4 g/mol e LogP de 5,7 (National Center for Biotechnology Information, 2020). A intensa absorção na região visível do espectro eletromagnético da HIP apresenta o pico de absorção principal em cerca de 590 nm (WANG *et al.*, 2019).

A HIP tem apresentado atividade terapêutica antitumoral, antiretroviral, antidepressiva, antiviral antibacteriano (GUEDES *et al.*, 2005). Seu efeito fototóxico tem sido relatado em diversos estudos antimicrobianos demonstrando sua capacidade em inativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de cepas de *C. albicans* (REZUSTA *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2013; NAFEE *et al.*, 2013; PAZ-CRISTOBAL *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2018).

O mecanismo de atividade biológica da HIP ainda não está elucidado, todavia, sugere-se que seus efeitos fototóxicos provavelmente se devam ao elevado rendimento quântico do estado tripleto e formação de oxigênio singleto (predominantemente reação do Tipo II) (KARIOTI; BILIA, 2010; BORGHI-PANGONI *et al.*, 2017). Mediante tais características, a HIP tem se apresentado um promissor FS natural a ser utilizado na TFD.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados com hipericina dispersos em hidrógeis de geleificação *in situ*, bem como verificar a potencialização do efeito antifúngico destes sistemas, associado ou não à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem hipericina encapsulada e caracterizá-los por espalhamento de luz dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão, rastreamento das nanopartículas e calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliar a eficiência de encapsulação da hipericina;
- Desenvolver hidrogéis acrescidos de carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem hipericina e caracterizá-los por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, reologia contínua e oscilatória, mucoadesão *in vitro*, seringabilidade e calorimetria exploratória diferencial;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para quantificação da hipericina por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar a solubilidade da hipericina na solução receptora constituída de tampão fosfato (pH 5) com 3 % de Tween 80, e o perfil de liberação *in vitro* da hipericina livre e do carreador lipídico nanoestruturado com hipericina encapsulada disperso em hidrogel;
- Realizar o ensaio de permeação e de retenção *in vitro* da hipericina livre e do carreador lipídico nanoestruturado com hipericina encapsulada disperso em hidrogel utilizando mucosas vaginais suínas;
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima da hipericina livre e do carreador lipídico nanoestruturado com hipericina encapsulada disperso ou não em hidrogel, frente a *C. albicans* ATCC 10231;

.....*Mariana Rillo Sato*.....

- Medir indiretamente a produção de oxigênio singleto aplicando a terapia fotodinâmica na solução de hipericina livre e nos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem hipericina encapsulada dispersos ou não em hidrogéis;
- Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica a solução de hipericina livre e aos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem hipericina encapsulada dispersos ou não em hidrogéis, frente a culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028;
- Realizar o ensaio antifúngico *in vivo* associado ou não à terapia fotodinâmica (linhagem de camundongo C57BL/6) na solução de hipericina livre e nos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem hipericina encapsulada dispersos ou não em hidrogéis, contra biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Principais reagentes e matérias-primas

- Água ultrapura (Milli-Q[®] Merck Millipore);
- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker[®]);
- Acetato de amônio P.A (Dinâmica);
- Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico (Sigma Aldrich[®]);
- Anfotericina B (Sigma Aldrich[®]);
- Ágar sabouraud dextrose (Sigma Aldrich[®]);
- Ágar sabouraud dextrose +cloranfenicol (Difco[®]);
- Base de nitrogênio para levedura suplementado com D-(+)-glicose (Sigma Aldrich[®]);
- Corante *May-Grünwald giemsa* (Merck);
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich[®]);
- Estearato de polioxietileno 40 (Sigma Aldrich[®]);
- Fluconazol (Sigma-Aldrich[®]);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth[®]);
- Fosfato de potássio monobásico (Synth[®]);
- Hipericina (*Hypericin*, pureza 98,7% - Hangzhou APIChem Technology Co);
- Metanol grau CLAE (J.T. Baker[®]);
- Membrana de polissulfona 0,45 µm (Tuffryn[®] Polysulfone Membrane);
- Meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich[®]);
- Óleo de rícino hidrogenado, etoxilado (Eumulgin HRE[®] 40, PharmaSpecial);
- Poloxamer 407 (Pluronic[®] F-127, Sigma Aldrich[®]);
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich[®]);
- Rosa bengala (Sigma-Aldrich[®]);
- Solução de resazurina (Sigma Aldrich[®]);
- Sensor de oxigênio singlete (*Singlet Oxygen Sensor Green*, Invitrogen[®]);

.....*Mariana Rillo Sato*.....

- Triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Via Farma);
- Tween™ 80 (Synth®)

4.1.2 Principais equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, modelo 752 (Fisatom);
- Analisador de textura, modelo TA-XTplus (Stable Micro Systems®) ;
- Balança semi-analítica, modelo AW220 (Shimadzu);
- Banho ultra-sônico, Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Calorímetro exploratório diferencial, modelo DSC Q100 (TA Instruments®);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis (PerkinElmer®);
- Coluna C18 (Luna® Phenomenex);
- Célula de difusão modificada de Franz, modelo Microette-Plus (Hanson Research Corporation®);
- Centrífuga Sorvall®, modelo TC6 (Sorvall);
- Estufa microbiológica (Fanem®);
- Espectrofotômetro Cytation 3 (Biotek®);
- Espectrofotômetro modelo Cary Eclipse (Agilent Technologies®);
- Homogeneizador (Phoenix® AP22);
- Incubadora Function Line CO₂ (Heraeus®);
- LED LD01 (LED Fenix™);
- Microcentrífuga, modelo Spectrafuge™ 16M (Labnet®);
- Microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEOL JEM-100 CXII;
- Microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-7500F (JEOL);
- Microplaca de 96 poços (Kasvi®);
- Microplaca de 96 poços (Sarstedt);
- NanoSight NS300 (Malvern Instruments);
- Reômetro, modelo AR2000 (TA Instruments®);
- Sonicador, modelo Q700 (Qsonica);
- Ultra-Turrax, modelo T25 (Ika®);
- ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments)

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese da HIP

A HIP foi sintetizada e fornecida pelo grupo de pesquisa do Prof. Anderson Orzari Ribeiro, da Universidade Federal do ABC (AIGNER; FALK, 2008).

4.2.2 Desenvolvimento dos CLN com e sem HIP encapsulada

A metodologia de obtenção e os parâmetros experimentais dos CLN foram delineados no mestrado da candidata (SATO *et al.*, 2017). Concentrações fixas da fase lipídica composta do lipídio sólido, estearato de polioxietileno 40 (EP, 2,07%) e dos lipídios líquidos, triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC, 2,05%) e óleo de rícino hidrogenado, etoxilado 40 (OE, 0,88%), foram pesados em uma balança semi-analítica (modelo AW220, Shimadzu) em béqueres separados do componente da fase aquosa, poloxamer 407 (P407, 3,50%) e água ultrapura.

A fase aquosa foi aquecida em aproximadamente 70°C e vertida sob constante agitação na fase lipídica aquecida a 5°C-10°C acima do ponto de fusão dos lipídios (agitador magnético com aquecimento, modelo 752, Fisatom), dando origem a pré-emulsão. Durante todo o processo de sonicação (Sonicator Qsonica, modelo Q700), as formulações foram mantidas em banho de gelo, de forma a ocasionar a cristalização lipídica e consequentemente, originar os CLN.

Em seguida foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10min (microcentrífuga, modelo Spectrafuge™ 16M, Labnet®), acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira (4°C±2°C), para eliminar possíveis resíduos de titânio desprendido da haste do sonicador, e visualizar presença ou ausência de separação de fase (RIGON *et al.*, 2016).

Seguindo tal metodologia de obtenção, os CLN sem HIP encapsulada foram desenvolvidos em diferentes amplitudes e tempos de sonicação como 8, 15, 20, 25, 30 e 35% durante 5, 10, 15 e 20 min., respectivamente, utilizando uma probe $1/16$ de diâmetro, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Nomenclatura dos CLN sem HIP encapsulada submetidos a diferentes amplitudes (%) e tempos de sonicação (minutos).

Grupo de sistema	Sigla do CLN	Amplitude do sonicator (%)	5min	10min	15 min	20 min
F1	F1.20	8				x
F2	F2.5	15	x			
	F2.10	15		x		
	F2.15	15			x	
	F2.20	15				x
F3	F3.5	20	x			
	F3.10	20		x		
	F3.15	20			x	
	F3.20	20				x
F4	F4.5	25	x			
	F4.10	25		x		
	F4.15	25			x	
	F4.20	25				x
F5	F5.5	30	x			
	F5.10	30		x		
	F5.15	30			x	
	F5.20	30				x
F6	F6.5	35	x			
	F6.10	35		x		

Na sequência os CLN foram avaliados quanto à estabilidade física através da técnica de espalhamento de luz dinâmico e posteriormente, F6.5 foi selecionada para a incorporação da HIP. Esta foi incorporada na fase lipídica do CLN durante a etapa de pré-emulsão (LIMA *et al.*, 2013), seguindo a mesma metodologia de obtenção dos CLN. Três diferentes concentrações de HIP foram testadas, sendo 0,05%, 0,25% e 0,5% (m/v), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Nomenclatura e composição dos CLN com três diferentes concentrações de HIP encapsulada.

Sigla do CLN	Concentração de componente (% , m/v)					
	EP*	TGACC*	OE*	P407*	HIP*	Água ultrapura
F6.5_0,05	2,07	2,05	0,88	3,50	0,05	qsp*
F6.5_0,25	2,07	2,05	0,88	3,50	0,25	qsp*
F6.5_0,5	2,07	2,05	0,88	3,50	0,50	qsp*

Abreviação: EP, estearato de polioxietileno 40; TGACC, triglicérides do ácido cáprico/caprílico; OE, óleo de rícino hidrogenado, etoxilado 40; P407, poloxamer 407; HIP, hipericina; qsp, quantidade suficiente de veículo para atingir a quantidade total de formulação.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

Os CLN sem HIP encapsulada e previamente selecionados foram representados pelo prefixo F6.5, acrescidos dos sufixos _0,05, _0,25 e _0,5, que correspondem às concentrações de HIP encapsulada no CLN, sendo 0,05%, 0,25% e 0,50% (m/v), respectivamente.

4.2.3 Caracterização físico-química dos CLN com e sem HIP encapsulada

4.2.3.1 Análise de espalhamento de luz dinâmico

A técnica espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic light scattering* – DLS - ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments), foi realizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e o índice de polidispersidade (Ipd) dos CLN com e sem HIP encapsulada (Tabelas 1 e 2, Seção 4.2.2). Os CLN foram analisados em triplicata a 25°C, diluídos em água ultrapura (1:100), mantidos em frascos fechados. A estabilidade dos sistemas foi analisada nos dias 1, 2, 7, 15 e 30 de armazenamento. O potencial zeta (PZ) das partículas foi analisado utilizando o mesmo equipamento e parâmetros acima. Durante o período da análise, os CLN com e sem HIP encapsulada (Tabelas 1 e 2) foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos em geladeira (4°C±2°C). Os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio, Ipd e de PZ foram dados como médias e desvios padrão de triplicatas.

4.2.3.2 Análise de rastreamento das nanopartículas

A técnica de rastreamento das nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* – NTA-NanoSight NS300, Malvern Instruments) analisou o tamanho e a concentração de partículas dispersas em um volume conhecido, em tempo real. Para isto, a formulação F6.5 foi diluída em água ultrapura (1:2000) e analisada no dia 2 de armazenamento à 25°C. Com auxílio de uma seringa de 1 mL a amostra foi introduzida na bomba de amostra (taxa de infusão de 80s) e visualizada na câmara (tipo sCMOS) a um laser verde a 532 nm. O resultado foi apresentado como média de tamanho e de moda (nm), média de concentração de partículas por mL e desvio padrão

4.2.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas na Faculdade de Medicina–USP, de Ribeirão Preto, utilizando o microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL JEM-100CXII.

Uma pequena alíquota do CLN selecionado F6.5 e dos CLN com HIP encapsulada (Tabela 2, Seção 4.2.2) foi colocada em uma grade de níquel e o excesso removido por um papel filtro. A contração negativa foi realizada colocando 1 gota de solução de acetato de uranila a 1% (m/v) sobre cada amostra. Após 10min, o excesso de líquido foi novamente removido e a amostra seca à temperatura ambiente; segundo Eloy *et al.* (2016) adaptado. As fotomicrografias foram analisadas no microscópio a uma voltagem de 50 e 100 kV.

4.2.3.4 Eficiência de encapsulação da HIP

A %EE foi realizada pelo método de filtração conforme Fachinetti *et al.* (2018) adaptada, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como descrito na Seção 4.2.6. Para a avaliação da concentração experimental total de HIP foi adicionado metanol (1:19) à 100 µL do sistema F6.5_0,05. O sistema foi submetido à ultrassom por 5min (Ultrasonic Cleaner, Unique) e filtrado utilizando uma membrana PVDF 0,22 µm. A HIP livre solúvel foi quantificada por meio da centrifugação da formulação em ultrafiltros Amicon (50.000 Da), a 10.000 rpm por 10min. A %EE foi calculada conforme a Equação 1:

$$\% EE = \frac{\text{HIP (total)} - \text{HIP (livre solúvel)}}{\text{HIP (total)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.2.4 Desenvolvimento dos HG de geleificação *in situ* acrescidos de CLN com e sem HIP

A dispersão de quitosana (QS) foi preparada a 1% (m/m) em solução de ácido acético a 0,5% (v/v), mantida em agitação mecânica de 5.000 rpm por 24h e pH 5. Em seguida, 16% (m/m) de P407 foram acrescidos na solução de QS em banho de gelo,

.....*Mariana Rillo Sato*.....

permanecendo sob agitação mecânica de 150 rpm (agitador magnético, modelo 752, Fisatom) até sua completa dissolução, conforme Gratieri *et al.* (2010) adaptado. Os HG prontos foram armazenados em tubos Falcon® e condicionados em geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Após a obtenção dos CLN com e sem HIP encapsulada, estes foram dispersos em HG sob agitação magnética à temperatura ambiente até a completa homogeneização das misturas, e acondicionados em frascos âmbar sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

O CLN sem HIP encapsulada (F6.5) disperso em HG foi nomeado CLN-HG e os HG acrescidos de CLN contendo HIP nas diferentes proporções (% m/v), foram denominados de CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Nomenclatura dos HG acrescidos de CLN com HIP, em diferentes proporções de mistura (% m/v).

Sigla do CLN com HIP encapsulado disperso em HG	Proporção de sistema (% m/v)	
	F6.5_0,05	HG
CLN_HIP-HG1	50	50
CLN_HIP-HG2	40	60
CLN_HIP-HG3	30	70
CLN_HIP-HG4	20	80
CLN_HIP-HG5	10	90

4.2.5 Caracterização físico-química dos HG de geleificação *in situ* acrescidos de CLN com e sem HIP

4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

As análises de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG, modelo JSM-7500F, JEOL) foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química – UNESP, de Araraquara em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Orlandi.

Os HG acrescidos de CLN com e sem HIP (Tabela 3, Seção 4.2.4) foram previamente liofilizados por 48h. Após esta etapa, as amostras foram dispostas sobre um suporte metálico que foi revestido com o material condutor, carbono. Os valores de rugosidade média foram analisados pelo *software* Scanning WSxM 5.0.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

4.2.5.2 Análises reológicas contínuas e oscilatórias

As reologias contínuas e oscilatórias (Reômetro TA Instruments®, modelo AR2000) foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química–UNESP, de Araraquara em colaboração com os professores Dr. Celso Valentim Santilli e Dra. Sandra Pulcinelli.

4.2.5.2.1 Reologia continua

As análises reológicas contínuas dos HG acrescidos de CLN com e sem HIP (Tabela 3, Seção 4.2.4) foram realizadas empregando a geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro e gap de 52 µm. Uma alíquota de cada sistema foi cuidadosamente colocada na placa inferior do reômetro, aguardando 30s de repouso. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0s⁻¹ para a curva descendente, durante 120s cada à temperatura de 37°C. A análise foi realizada em triplicata. Os índices de consistência e de fluxo foram determinados pela Equação 2:

$$\tau = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad \text{Equação 2}$$

onde “ τ ” é a força de cisalhamento, “ $\dot{\gamma}$ ” é a taxa de cisalhamento, “ k ” é o índice de consistência e “ n ” é o índice de fluxo (CALIXTO *et al.*, 2015).

4.2.5.2.2 Reologia oscilatória

As análises reológicas oscilatórias dos HG acrescidos de CLN com e sem HIP (Tabela 3, Seção 4.2.4) foram realizadas no mesmo equipamento utilizando geometria e temperatura das análises reológicas contínuas, segundo Calixto *et al.* (2015) adaptado. Realizou-se uma varredura de tensão para determinação da região viscoelástica das formulações e em seguida, o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Este último seguiu uma faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa à temperatura de 37°C. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.5.3 Ensaio de mucoadesão *in vitro*

A mucoadesão dos HG crescidos ou não de CLN com HIP (HG, CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2, respectivamente) foi verificada empregando o analisador de textura, modelo TA-XTplus (Stable Micro Systems®). As mucosas vaginais bovinas foram aderidas com fita adesiva na extremidade inferior da sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro. Para simular o ambiente vaginal, as mucosas vaginais utilizadas foram imersas no muco vaginal artificial preparado conforme adaptações metodológicas (OWEN; KATZ, 1999; VERMANI *et al.*, 2002).

O HG e os sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 foram acondicionados em tubos falcon®, colocados dentro de um béquer d'água e monitorado a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A sonda cilíndrica foi abaixada a uma velocidade de 1 mm/s até que a mucosa vaginal entrasse em contato com a superfície das amostras. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,05 N foi aplicada por 60s para assegurar o contato íntimo entre a amostra e a mucosa vaginal. Durante toda a análise a temperatura foi monitorada a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo a sonda cilíndrica subiu a uma velocidade de 1 mm/s até ocorrer o destacamento da mucosa vaginal sobre a amostra. As curvas de trabalho mucoadesivo (N.sec) e de força de mucoadesão (N) *versus* o tempo foram calculadas. Os resultados foram apresentados através dos valores médios e desvios padrão de seis replicatas.

4.2.5.4 Determinação de seringabilidade

A seringabilidade do HG e dos sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 foi realizada pelo analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®), conforme a metodologia adaptada de Ferreira *et al.* (2017).

Um volume de 3 mL das amostras (CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN-HG) foi colocado em uma seringa plástica de 3 mL a uma altura de 3 mm, para evitar ao máximo a presença de bolhas. O êmbolo da seringa foi movimentado em módulo de compressão a uma velocidade constante de 2 mm.s^{-1} percorrendo uma distância de 40 mm. O trabalho necessário para o sistema percorrer 40 mm pela seringa foi determinado pela área do gráfico de força *versus* distância registrada para a compressão do êmbolo. Todas as amostras foram analisadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e os resultados foram apresentados através dos valores médios e desvios padrão de seis replicatas.

4.2.5.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial

As análises de calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimetry* – DSC, modelo DSC Q100, TA Instruments®) foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química – UNESP, de Araraquara em colaboração com os professores, Dr. Celso Valentim Santilli e Dra. Sandra Pulcinelli.

Os CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG foram liofilizados por 48h. Uma quantidade de 5 mg de cada amostra foi colocada em um cadinho de alumínio selado e no calorímetro em um intervalo de temperatura de -40°C a 350°C com taxa de aquecimento de 10 °C/min. e atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

4.2.6 Validação da metodologia analítica para quantificação de HIP por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, de Araraquara em colaboração com os professores Dra. Natália Valadares de Moraes e Dr. André Gonzaga dos Santos.

Duas metodologias analíticas foram realizadas para a quantificação da HIP por CLAE, as quais se diferenciaram pela ausência e presença de tensoativo, sendo este último utilizado para amostras provenientes dos ensaios de solubilidade (Seção 4.2.7.1), de liberação (Seção 4.2.7.2), permeação e retenção *in vitro* (Seção 4.2.7.3).

No método I as amostras foram constituídas de solução estoque de HIP diluídas em metanol, segundo Kamal *et al.* (2012). No método II, as amostras foram diluídas em tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80, segundo adaptação do estudo de Gupta *et al.* (2011). Ambos as análises utilizaram o equipamento PerKin Elmer com detector UV-Vis, seguindo as condições cromatográficas da Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros empregados na metodologia analítica.

Parâmetro	
Fase estacionária	Coluna HPLC Luna® Phenomenex C18(250 mm x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio 10 mM (pH 5,05), (54:36:10%, v/v/v)
Fluxo	1 mL/min.
λ de detecção	590 nm
Volume de injeção	20 µL

.....*Mariana Rillo Sato*.....

De acordo com as especificações da RDC N° 166, 24/07/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017) e as diretrizes do guia *Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005) foram determinados: conformidade do sistema cromatográfico, linearidade, precisão, exatidão/recuperação, especificidade/seletividade, limite de detecção e limite de quantificação e robustez.

4.2.6.1 Conformidade do sistema cromatográfico

Para que os resultados fossem aceitáveis e confiáveis, foi realizada a análise de 3 injeções da solução estoque de HIP a $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada conforme o método I (Seção 4.2.6). A partir dos picos cromatográficos de cada injeção, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempos de retenção, fator de retenção, assimetria do pico, fator de cauda e número de pratos teóricos.

4.2.6.2 Linearidade

Foram construídas 3 curvas analíticas traçando a área dos picos em função da concentração. Para o método I, a solução estoque de HIP em metanol foi preparada a $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir desta foram feitas 7 concentrações, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva utilizando o método II foi construída a partir da solução estoque de HIP a $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80, preparadas 8 concentrações, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para cada concentração, foram realizadas 3 injeções previamente filtradas em membrana PVDF $0,22 \mu\text{m}$. As estatísticas foram calculadas pela análise de variância (ANOVA).

4.2.6.3 Precisão

As análises de precisão intracorida/repetibilidade e de intercorrida/intermediária foram realizadas nas concentrações 20, 60 e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir da solução estoque de HIP em metanol (método I) e em tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80 (método II). As amostras foram previamente filtradas em membrana PVDF $0,22 \mu\text{m}$. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados determinados em percentual de desvio padrão relativo (%D.P.R).

.....*Mariana Rillo Sato*.....

4.2.6.4 Exatidão/Recuperação

Para os métodos, I e II, as análises de exatidão/recuperação foram realizadas por adição de padrão ao placebo (solução de HIP a $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ + F6.5), utilizando as concentrações 20, 60 e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicada, filtradas em membrana PVDF 0,22 μm . A exatidão foi obtida pela relação entre a concentração média experimental e a teórica dada por meio da Equação 3. Considerou-se a faixa de trabalho de 80% a 120%.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad \text{Equação 3}$$

4.2.6.5 Especificidade/Seletividade

Visando garantir a ausência da interferência do pico do placebo no pico da HIP, bem como dos componentes utilizados nas formulações, foram realizadas injeções dos sobrenadantes de: HIP I (HIP diluída em metanol), HIP II (HIP diluída em meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80), HIP e CLN_HIP-HG1 extraídos por metanol no ensaio de retenção vaginal e a fase móvel (acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio 10 mM (pH 5,05)). Para verificar a influência destes na área do pico da HIP, as amostras foram centrifugadas, filtradas em membrana PVDF 0,22 μm e analisadas por CLAE.

4.2.6.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Limite de detecção (LD) verifica a menor quantidade do analito presente em uma amostra (podendo não ser necessariamente quantificada). O limite de quantificação (LQ) analisa a menor quantidade do analito em uma amostra, conferindo precisão e exatidão aceitáveis.

No caso de CLAE, os LD e LQ dos métodos, I e II foram determinados pelas Equações 4 e 5, respectivamente:

$$\text{LD} = \text{DP}\alpha \times 3 / \text{IC} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{LQ} = \text{DP}\alpha \times 10 / \text{IC} \quad \text{Equação 5}$$

.....*Mariana Rillo Sato*.....

onde “LD” é o limite de detecção, “LQ” é o limite de quantificação, “DP α ” é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, e “IC” é a inclinação da curva de calibração.

4.2.6.7 Robustez

As alterações dos parâmetros analíticos descritos na Tabela 4 (Seção 4.2.6) foram: comprimento de onda de 589 e 591 nm, fluxo da fase móvel 0,90 e 0,95 mL/min., concentração da fase móvel, acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio 10 mM nas proporções 53:37:10 e 55:35:10, e fase móvel em pH 5,04 e pH 5,06. Além disso, realizou-se a estabilidade das soluções analíticas nos tempos de 24, 48, 72 e 96h. As diferentes condições citadas foram realizadas apenas para o método I na concentração de 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada amostra foi filtrada em membrana PVDF 0,22 μm , em triplicata. A faixa de trabalho considerada foi entre 80%-120%.

4.2.7 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de HIP

4.2.7.1 Estudo de solubilidade da HIP

Para garantir a condição *sink* nos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*, primeiramente, foi necessário testar a solubilidade da HIP na solução receptora constituída de meio tampão fosfato (pH 5) com 3 % de Tween 80. Um excesso de HIP foi adicionada ao meio até observar precipitação, em que ficou sob agitação mecânica a 50 rpm por 24h (homogeneizador, Phoenix[®] AP22), protegida de luz. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30min, coletando-se o sobrenadante e filtrando-o em membrana polietérsulfona (PES 0,2 μm). O sobrenadante foi diluído, analisado por CLAE seguindo as condições cromatográficas validadas (Tabela 4, Seção 4.2.6) e quantificado a partir da equação da reta do método II.

4.2.7.2 Perfil de liberação *in vitro* de HIP

Atendendo as condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade, o ensaio de liberação foi realizado utilizando células de difusão modificadas de Franz (Microette-Plus, Hanson Research Corporation[®]) com área de exposição de 1,77 cm² e

.....*Mariana Rillo Sato*.....

volume de 7 mL no compartimento receptor. Entre os compartimentos, doador e receptor da célula de Franz foram colocadas membranas sintéticas de polissulfona poro 0,45 μm (Tuffryn® Polysulfone Membrane), hidratadas por aproximadamente 16h na solução receptora composta de tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80.

Um volume de 3000 μL de HIP (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) solubilizada na solução receptora e do sistema CNL_HIP-HG1 foi adicionado nos copos dosadores dispostos sobre as membranas sintéticas. Os compartimentos receptores foram preenchidos com a solução receptora constituída de tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80. Durante a análise, a solução receptora permaneceu em agitação por meio de placa magnética agitadora e em banho circulante a 300 rpm, $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (ARAÚJO *et al.*, 2019).

Para avaliar a cinética de liberação 1,5 mL de cada amostra foi coletado nos intervalos de 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 720min, filtrada em membrana PES 0,2 μm e determinada por CLAE utilizando a curva analítica validada (Seção 4.2.6). A partir dos dados de liberação, a cinética de liberação *in vitro* foi avaliada aplicando os diferentes modelos matemáticos: Weibull; Baker & Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi e Primeira ordem, os quais foram empregados pelo *software* Sigma Plot (versão 10.0).

4.2.7.3 Ensaio de permeação e de retenção *in vitro* da HIP

O ensaio de permeação seguiu as mesmas condições experimentais utilizados no ensaio de liberação (Seção 4.2.7.2), contudo, foram utilizadas mucosas vaginais suínas como membranas. As mucosas vaginais foram adicionadas na célula de Franz e posteriormente, as amostras, 3000 μL de HIP (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na solução receptora e o sistema CNL_HIP-HG1 foram adicionados no compartimento doador. Enquanto, os compartimentos receptores da célula de Franz foram preenchidos com a solução receptora constituída de meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80.

As condições de agitação, temperatura e intervalos de coletadas foram mantidas conforme o ensaio de liberação (Seção 4.2.7.2). As amostras foram filtradas utilizando membrana PES 0,2 μm e armazenadas a -20°C . Os experimentos foram realizados em sextuplicata e a quantificação foi realizada por CLAE utilizando a curva analítica validada (Seção 4.2.6).

Ao final do ensaio de permeação *in vitro*, as mucosas (áreas expostas às amostras) foram levemente limpas com gaze embebida em água destilada para remover

.....*Mariana Rillo Sato*.....

o excesso de amostra, picotadas com o auxílio de uma tesoura e seus fragmentos colocados em tubo falcon® contendo 4 mL de metanol, este foi levado ao Ultra-Turrax (Ultra-Turrax, modelo T25, Ika®) por 2min. Posteriormente, foram centrifugados a 3.000 rpm por 10min (Centrífuga Sorvall®). O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana PES 0,45 µm, as amostras armazenadas a -20°C, e quantificados por CLAE utilizando a curva analítica do método validado (Seção 4.2.6).

4.2.8 Ensaios antifúngicos *in vitro*

Os ensaios antifúngicos *in vitro* foram realizados em parceria com a Profa. Dra. Taís Maria Bauab do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas–UNESP, de Araraquara.

4.2.8.1 Concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada empregando a técnica de microdiluição, conforme o documento M27-A3 da CLSI (2008), com adaptações. Primeiramente, 100 µL do meio RPMI 1640 (pH 7, Sigma-Aldrich®) associado ao tampão MOP's (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico; Sigma-Aldrich®) foram adicionados a microplaca de 96 poços. Em seguida 100 µL da solução de HIP (a partir de 800 µg.mL⁻¹) solubilizada em dimetilsulfóxido 20% (DMSO, Sigma-Aldrich®) e dos sistemas F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1 (a partir de 800 µg.mL⁻¹) foram adicionadas e as diluições seriada realizadas. Em seguida, 100 µL das suspensões de *C. albicans* ATCC 10231 foram distribuídas na microplaca de 96 poços. Os grupos foram compostos de controle positivo (anfotericina B e fluconazol), controle de esterilidade (meio de cultura), controle negativo (DMSO 20% em meio de cultura), HIP, F6.5, F6.5_0,05, CLN_HIP-HG1, para as cepas de *C. albicans*. A microplaca foi incubada a 37°C±0,5°C por 48h e os ensaios realizados em triplicata.

Após o período de incubação das amostras, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM), segundo adaptações de Araújo *et al.* (2013). A mistura de cada poço foi repicada em Ágar sabouraud dextrose (em inglês, *Sabouraud Dextrose Ágar*, Sigma Aldrich® - ASD), utilizando palitos de madeira estéreis e então, incubados a 37°C±0,5°C por 48h. Após este período, observou-se se houve crescimento ou ausência das cepas de *C. albicans* ATCC 10231.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

4.2.8.2 *Leitura com revelador*

Depois do período de incubação das amostras de CIM a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48h e da realização do ensaio de CFM (Seção 4.2.8.1), 30 μL do revelador resazurina (Sigma Aldrich®) foram adicionados em cada poço das microplacas e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 4h. O mecanismo deste revelador ocorre por redução da resazurina de coloração azul para resorufina de cor rosa, os quais representam ausência e presença de crescimento de microrganismo, respectivamente. A quantificação foi determinada utilizando leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas Cytation 3 (Biotek®; filtros: 530nm de excitação e 595 nm de emissão).

4.2.9 **Ensaio biológicos *in vitro* associados à terapia fotodinâmica**

Os ensaios biológicos *in vitro* associados à TFD frente a culturas planctônicas associados ou não à TFD foram realizados na Ulster University (Coleraine, Irlanda do Norte) durante o BEPE da candidata perante a orientação dos professores John Callan e Anthony McHale.

4.2.9.1 *Cepa de C. albicans*

Para isto foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 90028, conforme a metodologia adaptada de Alves *et al.* (2018). A *C. albicans* foi mantida em base de nitrogênio para levedura (em inglês, *Yeast Nitrogen Base* - YNB, Sigma Aldrich®) suplementado com 100 mM de D-(+)-glicose (Sigma Aldrich®). Para o crescimento das colônias, a cepa foi subcultivada em placas contendo ASD e incubada a 37°C por 48h (Functionline CO₂ incubator, Heraeus®).

4.2.9.2 *Eficácia da terapia fotodinâmica contra culturas planctônicas*

Nos ensaios biológicos *in vitro* analisados no escuro e associados à TFD, a solução de HIP foi solubilizada em DMSO 20% (qsp PBS) e de Rosa Bengala (RB) em PBS. Os grupos experimentais foram denominados: controles negativos (YNB, PBS e DMSO 20%), FS (HIP), sistemas sem HIP (F6.5, HG e CLN-HG), sistemas com HIP

.....*Mariana Rillo Sato*.....

(F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) e controles positivos (RB_2,5 e RB_5), como mostra Tabela 5.

Tabela 5. Especificações dos grupos experimentais e respectivos tratamentos do ensaio biológico *in vitro* realizado no escuro e associado à TFD, frente as culturas planctônicas de *C. albicans* ATCC 90028.

Condição experimental: Escuro e TFD	
Especificação do grupo	Tratamento
Controles negativos	YNB e Solução de PBS
Controle do solvente	Solução de DMSO (20%)
Controle do CLN	F6.5
Controle do HG	HG
Controle do CLN disperso em HG	CLN-HG
Tratamento 1: Solução de HIP	HIP (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Tratamento 2: CLN com HIP encapsulada	F6.5_0,05 (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Tratamento 3: CLN com HIP encapsulada disperso em HG	CLN_HIP-HG1 (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Controles positivos: Solução de RB	RB_2,5 (a partir de 5 µM) RB_5 (a partir de 10 µM)

Os FS empregados, HIP e RB apresentam absorvância máxima em comprimentos de onda de 590 nm e 560 nm, respectivamente. A RB é uma substância FS derivada da fluoresceína, a qual foi utilizada como controle positivo em virtude de sua baixa toxicidade (UMEMURA *et al.*, 1999) e ação antifúngica contra *C. albicans* elucidada (COSTA *et al.*, 2012; FREIRE *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2018).

Para a condição no escuro, 100 µL do inóculo de levedura foi adicionado a cada poço da microplaca de 96 poços estéril (Sarstedt) com 100 µL de cada grupo (Tabela 5) e submetidos ao escuro por 30min. Para determinar a sobrevivência da levedura, as alíquotas de cada poço foram diluídas em série em PBS. Triplicatas de 10 µL foram espalhadas sobre as superfícies das placas contendo ASD, e incubadas aerobiamente a 37°C por 24h. O número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi transformado em log₁₀.

Para TFD mediada pelos grupos acima (Tabela 5), 100 µL do inóculo de levedura foi adicionado a cada poço de microplaca com 100 µL de cada solução. Depois de incubadas no escuro por 30min, as amostras foram irradiadas com luz LED (Fenix™,

.....*Mariana Rillo Sato*.....

LD01, 113 J.cm⁻²), por 5min. Para determinar a sobrevivência da levedura, as alíquotas de cada poço foram diluídas em série em PBS seguindo os parâmetros descritos acima.

Os controles negativos YNB e PBS foram utilizados para comparar os resultados. Os ensaios biológicos *in vitro* realizados no escuro e à TFD frente as culturas planctônicas de *C. albicans* foram realizados em triplicata.

4.2.9.3 Eficácia da terapia fotodinâmica contra biofilmes

Os ensaios biológicos *in vitro* associados à TFD frente a biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 foram realizados durante o BEPE da candidata, como informado na seção 4.2.9.2.

Na eficácia da TFD contra biofilmes, as soluções de HIP e de RB foram solubilizadas em DMSO 20% (qsp PBS) e em PBS, respectivamente. Segundo a Tabela 6, os grupos experimentais foram: controles negativos (YNB, PBS e DMSO 20%), FS (HIP), sistemas sem HIP (F6.5, HG e CLN-HG), sistemas com HIP (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) e controles positivos (RB_5 e RB_10).

Tabela 6. Especificações dos grupos experimentais e respectivos tratamentos do ensaio biológico *in vitro* realizado no escuro e associado à TFD, contra biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028.

Condição experimental: Escuro e TFD	
Especificação do grupo	Tratamento
Controles negativos	YNB e Solução PBS
Controle do solvente	Solução de DMSO (20%)
Controle do CLN	F6.5
Controle do HG	HG
Controle do CLN disperso em HG	CLN-HG
Tratamento 1: Solução de HIP	HIP (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Tratamento 2: CLN com HIP encapsulada	F6.5_0,05 (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Tratamento 3: CLN com HIP encapsulada disperso em HG	CLN_HIP-HG1 (a partir de 1000 µg.mL ⁻¹)
Controles positivos: Solução de RB	RB_5 (a partir de 10 µM) RB_10 (a partir de 20 µM)

Para a fase de adesão do biofilme uma alíquota de 100 μL do inóculo de levedura foi adicionada aos poços da microplaca de 96 poços estéril (Sarstedt), e incubada a 37°C por 2h. Após este tempo, os poços foram lavados 2 vezes com PBS para remover as células não aderidas. Então, 200 μL de YNB foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 48h, para a formação do biofilme de *C. albicans*. Em seguida, a suspensão de cada poço foi removida e o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS (RODERO *et al.*, 2018).

Na sequência foram adicionados 100 μL de cada grupo (Tabela 6) e submetidos ao escuro por 30min. O biofilme foi destacado esfregando a ponta da pipeta no fundo de cada poço em direções, circular, vertical e horizontal por 30s (ALVES *et al.*, 2018). Para determinar a sobrevivência nos biofilmes e calcular o número de UFC/mL transformado em $\log_{10}$, seguiram-se as metodologias utilizadas no ensaio de culturas planctônicas (Seção 4.2.9.2).

Para a TFD, 100 μL de cada grupo testado (Tabela 6) foram adicionados a cada poço da microplaca de 96 poços, sendo submetidos ao escuro por 30min, e irradiados com luz LED (Fenix TM, LD01, 113 J.cm^{-2}), por 5min. Após o tratamento, o biofilme foi destacado esfregando a ponta da pipeta no fundo de cada poço nas mesmas direções acima por 30s. As etapas posteriores foram realizadas seguindo as metodologias de culturas planctônicas (Seção 4.2.9.2). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados dos controles negativos YNB e PBS foram comparados aos resultados de biofilme de *C. albicans*.

4.2.10 Produção de oxigênio singleto

Para medir indiretamente a produção de oxigênio singleto, 200 μL da solução de HIP a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (solubilizada em DMSO 20%), dos sistemas F6.5_0,05 ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CLN_HIP-HG1 ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), F6.5, HG e CLN-HG, foram adicionados à solução padrão de sensor de oxigênio singleto (*Singlet oxygen sensor green*- SOSG, Invitrogen[®]) a $2,5 \mu\text{M}$ em metanol (1800 μL). A solução de HIP e os sistemas foram avaliadas no escuro e por TFD (Fenix TM, LD01, 113 J.cm^{-2}), por 30min. A intensidade de fluorescência do SOSG foi registrada em espectrofotômetro Cary Eclipse (Agilent Technologies[®]) a 525 nm em intervalos de 5min. As análises foram realizadas em duplicatas, e os aumentos nos percentuais de fluorescência do SOSG foram calculados.

.....Mariana Rillo Sato.....

4.2.11 Ensaios antifúngicos *in vivo* associados ou não à terapia fotodinâmica

O ensaio terapêutico experimental de CVV para os camundongos fêmeas foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Taís Maria Bauab do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas–UNESP, de Araraquara, perante a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (CEUA/FCFAR) obtido pelo protocolo N° 45/2018 (Anexo 1, Seção 8).

4.2.11.1 Cepa de *C. albicans* e Linhagem animal

Para o crescimento das colônias, a cepa foi subcultivada em placas contendo Ágar Sabouraud + cloranfenicol (ASD+clo) (Difco®) e incubada a 37°C por 48h (Estufa microbiológica, Fanem®). Os camundongos fêmeas de linhagem C57BL/6 estavam entre 8 a 10 semanas, pesando entre 20-25 g. Sete dias anteriores ao início do experimento, os animais foram ambientados no biotério do departamento Ciências Biológicas/Microbiologia desta Universidade. Neste período e durante todo o ensaio, os animais permaneceram no biotério com temperatura controlada, ventilação adequada, ciclo claro/escuro de 12h, em gaiolas forradas com maravalha esterilizada, com livre consumo de água e de alimento (RODERO *et al.*, 2018).

4.2.11.2 Ensaio terapêutico *in vivo* de candidíase vulvovaginal

O ensaio terapêutico *in vivo* de CVV envolveu os grupos controles (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G10) e os grupos de tratamento (G7, G8 e G9), que foram analisados no escuro, além dos grupos de tratamentos submetidos à TFD (G7L, G8L e G9L), em que a letra L corresponde a luz. A Tabela 7 descreve os grupos experimentais e as especificações terapêuticas seguidas no ensaio.

Tabela 7. Grupos experimentais e respectivas especificações de tratamentos do ensaio terapêutico de CVV causado por *C. albicans* ATCC 10231 em camundongos fêmeas.

Grupo experimental	Especificação	Tratamento
Grupo 1	Controle negativo de infecção	Solução de PBS
Grupo 2	Controle positivo de infecção	Infectado (Suspensão de <i>C. albicans</i>)
Grupo 3	Controle do antifúngico	Creme antifúngico*
Grupo 4	Controle do CLN	F6.5
Grupo 5	Controle do CLN disperso em HG	CLN-HG
Grupo 6	Controle do HG	HG
Grupo 7	Tratamento 1: Solução de HIP	HIP (500 µg.mL ⁻¹) Solubilizada em DMSO 20%
Grupo 8	Tratamento 2: CLN com HIP encapsulada	F6.5_0,05 (500 µg.mL ⁻¹)
Grupo 9	Tratamento 3: CLN com HIP encapsulada disperso em HG	CLN_HIP-HG1 (500 µg.mL ⁻¹)
Grupo 7L	Tratamento 4: Solução de HIP associado à TFD	HIP/TFD (500 µg.mL ⁻¹) Solubilizada em DMSO 20%
Grupo 8L	Tratamento 5: CLN com HIP encapsulada associado à TFD	F6.5_0,05/TFD (500 µg.mL ⁻¹)
Grupo 9L	Tratamento 6: CLN com HIP encapsulada disperso em HG associado à TFD	CLN_HIP-HG1/TFD (500 µg.mL ⁻¹)
Grupo 10	Controle do solvente	Solução de DMSO (20%)

*Creme vaginal comercial a base de benzoilmetronidazol (250 mg./4 g), nistatina (100.000 U.I./4g) e cloreto de benzalcônio (5mg/4g) (ELOFAR®, BR).

O ensaio terapêutico *in vivo* foi realizado utilizando *C. albicans* ATCC 10231 conforme a metodologia adaptada de Rodero *et al.* (2018). A Figura 2 exemplifica o período (dias) que cada etapa foi realizada no ensaio experimental utilizando os camundongos fêmeas.

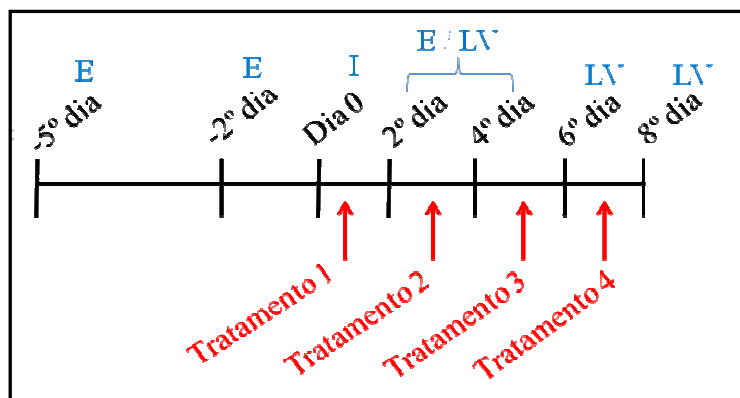


Figura 2. Cronograma do modelo de ensaio terapêutico *in vivo* de CVV utilizando camundongos fêmeas linhagem C5BL/6.

Abreviação: E, estradiol; I, infecção; LV, lavado vaginal.

Fonte: Autora (2020).

Nas primeiras etapas do ensaio (dias -5 e -2), os animais foram induzidos ao estado de pseudo estro, em que receberam via subcutânea 100 μL de solução de β -estradiol-17-valerato (2 mg.mL^{-1}) solubilizados no azeite de gergelim. No dia 0 foi realizada a infecção intravaginal, sendo inoculado nos animais 20 μL da suspensão de *C. albicans* ATCC 10231 a $2,5 \times 10^8$ células/mL preparada em solução tamponada de PBS (Figura 2).

Dois dias após a administração do inóculo fúngico, foi realizada a etapa de lavagem vaginal utilizando um total de 280 μL de solução PBS tamponada estéril, a qual se repetiu quatro dias após a infecção fúngica (Figura 2). Em dias alternados a estas etapas, foram realizados os tratamentos, administrando na vagina 20 μL dos sistemas e dos controles (Tabela 7), 2 vezes ao dia durante os 8 dias. A Figura 3 demonstra a imagem de uns dos sistemas. Para manter a fase pseudo-estro, os animais receberam uma nova dose de estradiol nos dias 2 e 4 após a infecção de *C. albicans*.

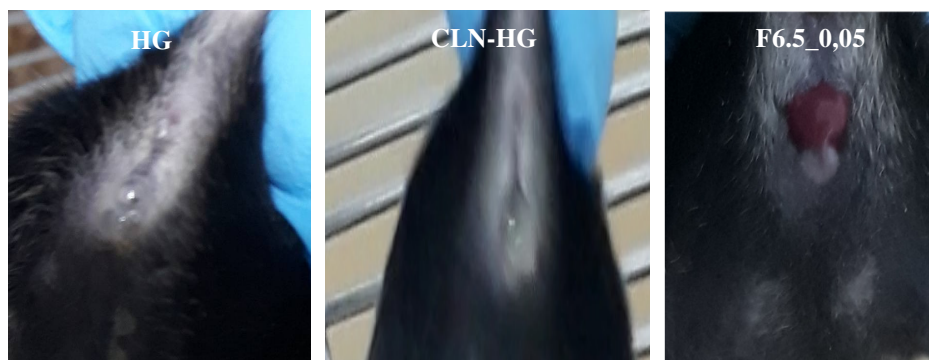


Figura 3. Sistemas (HG, CLN-HG e F6.5_0,05) administrados no canal vaginal dos camundongos fêmeas.

Fonte: Autora (2020).

A TFD mediada pelos grupos G7L (HIP/TFD), G8L (F6.5_0,05/TFD) e G9L (CLN_HIP-HG1/TFD) seguiu a mesma metodologia experimental dos grupos analisados no escuro. Após a administração vaginal de 20µL dos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG, os animais foram mantidos no escuro por 30min e os grupos tratados por TFD posteriormente, foram irradiados pelo LED (Fenix TM, LD01, 113 J.cm⁻²), por 5min.

4.2.11.3 Análise da eficácia do tratamento

Após a obtenção do fluido vaginal, o material foi subcultivado em placas contendo ASD+clo e incubadas a 37°C por 48h. Em cada dia da análise de tratamento, calculou-se o número de UFC transformado em log₁₀.

Além disto, foram realizadas análises microscópicas ópticas da morfologia celular encontrada no fluido vaginal dos camundongos fêmeas para verificar presença ou ausência de células leveduriformes livres. As lâminas com as células leveduriformes foram coradas com uma solução de *May-Grünwald Giemsa* (Merck) (1:10) por 7min. Após este período o excesso de *Giemsa* foi removido por água ultrapura e colocado para secar. As fotomicrografias foram realizadas por microscopia óptica em aumento de 40x.

4.2.12 Análise estatística

Dados estatísticos referentes às análises de caracterização físico-química, bem como aos valores de UFC/mL e de UFC transformados em log₁₀ dos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, foram analisados por ANOVA one-way e pós-teste de Turkey. O *software* utilizado foi GraphPad Prisma (versão 5.01, 2007). Em todos os ensaios, valores de $p < 0,05$ foram utilizados para indicar significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento dos CLN com e sem HIP encapsulada

A etapa inicial de desenvolvimento do sistema é extremamente importante, posto que influencie diretamente no diâmetro hidrodinâmico médio e no Ipd das nanopartículas que estão diretamente correlacionados à estabilidade física do sistema coloidal.

Os componentes da fase aquosa, poloxamer 407 (P407, Pluronic® F-127), da fase lipídica sólida, estearato de polioxietileno 40 (EP) e lipídica líquida, triglicérides do ácido cáprico/caprílico (TGACC) e óleo de rícino hidrogenado, etoxilado 40 (OE), foram escolhidos para a obtenção dos CLN, por serem seguros, aplicados em formulações cosméticas e farmacêuticas, podendo ser empregados no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (ROWE *et al.*, 2009).

Visando manter as características físico-químicas dos CLN obtidos no mestrado da candidata, a etapa inicial deste trabalho partiu de adaptações de metodologias para testar as diferentes amplitudes e tempos de sonicação (DAS *et al.*, 2012; KULKARNI *et al.*, 2015; RIGON *et al.*, 2016; SATO *et al.*, 2017). Assim, os grupos de CLN desenvolvidos foram preparados por 8% (F1) durante 20min de sonicação, 15% (F2), 20% (F3), 25% (F4) e 30% (F5) por 5, 10, 15 e 20min, sendo denominados de F1.20; F2.5, F2.10, F2.15, F2.20; F3.5, F3.10, F3.15, F3.20; F4.5, F4.10, F4.15, F4.20 e F5.5, F5.10, F5.15, F5.20, respectivamente, e por 35% (F6) a 5 e 10min de sonicação, dando origem a F6.5 e F6.10, respectivamente (Tabela 1, Seção 4.2.2).

Depois de prontos os CLN sem HIP foram avaliados quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd (Figura 4, Seção 5.2.1), e o PZ (Figura 5, Seção 5.2.1), ambos durante os 30 dias de armazenamento. Tais resultados foram determinantes para selecionar o CLN (F6.5) em que posteriormente, a HIP foi encapsulada.

A etapa seguinte foi obtida respeitando as condições experimentais citadas anteriormente, de modo que a HIP foi encapsulada na fase lipídica durante a etapa de pré-emulsão. Três concentrações de HIP foram testadas, 0,05 %, 0,25 % e 0,50 % (m/v) sendo denominados de F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5, respectivamente.

5.2 Caracterização físico-química dos CLN com e sem HIP encapsulada

.....*Mariana Rillo Sato*.....

5.2.1 Análise de espalhamento de luz dinâmico dos CLN

Os 21 CLN sem HIP encapsulada preparados pelo método de sonicação foram avaliados quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd durante 30 dias de armazenamento, através do teste estatístico ANOVA, utilizado para medidas repetidas adotando o nível de significância de $p < 0,05$.

A Figura 4 representa o diâmetro hidrodinâmico médio e o Ipd (barras e linhas, respectivamente) dos grupos F1, F2, F3, F4, F5 e F6 analisados nos dias 1, 2, 7, 15 e 30 de armazenamento.

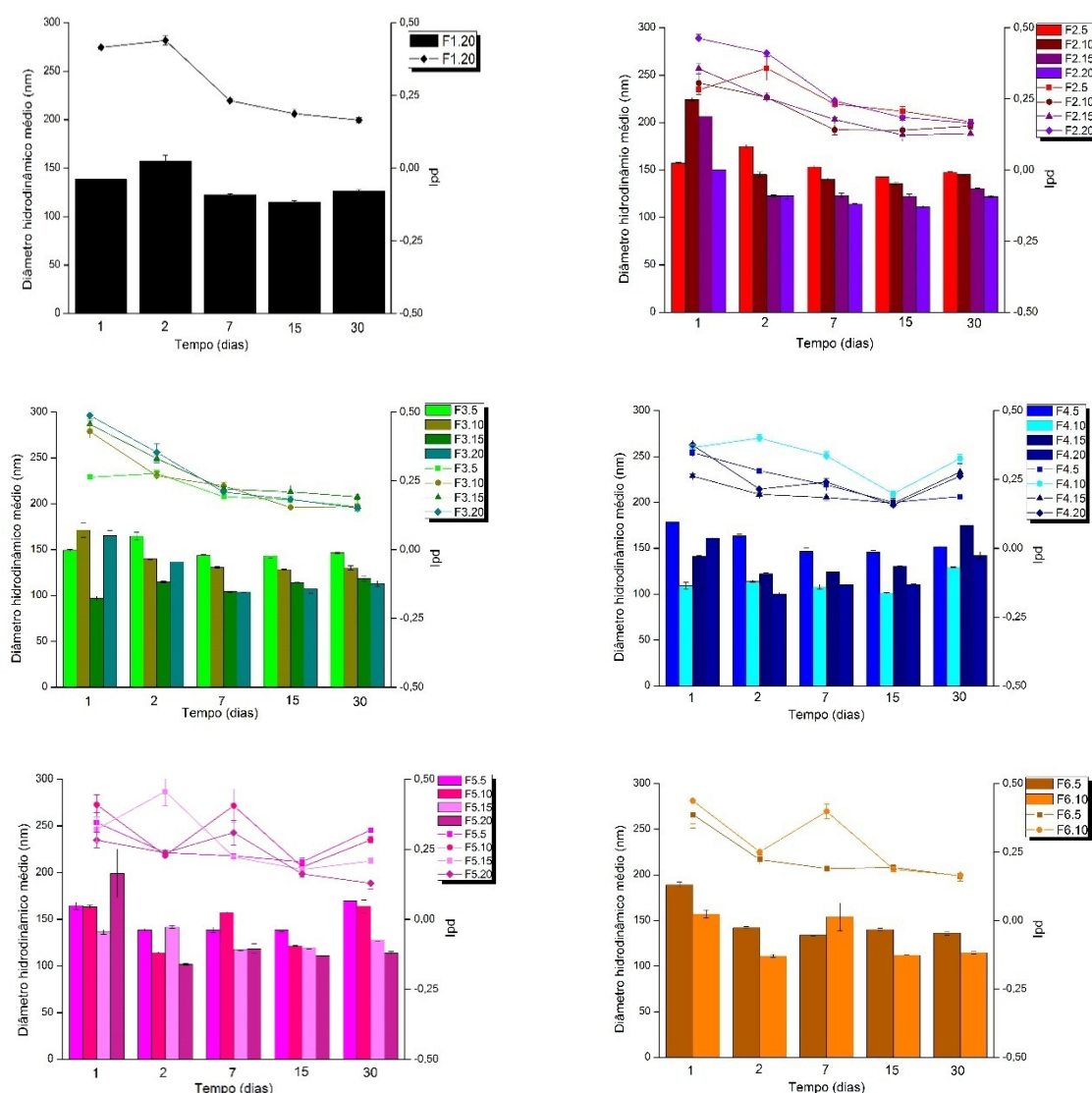


Figura 4. Diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd dos CLN sem HIP encapsulada, desenvolvidos em diferentes amplitudes e tempos de sonicação *versus* tempo em dia. Média±D.P; n=3.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a Figura 4, o CLN F1.20 apresentou diâmetro hidrodinâmico médio que diminuiu significativamente de $138,47 \pm 0,68$ para $126,60 \pm 1,21$ nm entre o dia 1 (dia de preparo) e 30 de armazenamento. A análise de Ipd apresentou no dia 1 um valor de $0,42 \pm 0,01$ que diminuiu significativamente para $0,17 \pm 0,01$ em 30 dias de armazenamento, indicando que ao longo do tempo as partículas foram se distribuindo homogeneamente na dispersão de CLN.

Os CLN preparados a 15% de amplitude (F2.5, F2.10, F2.15 e F2.20) diminuíram significativamente o diâmetro médio entre os dias 1 e 30, que foram de $157,17 \pm 1,25$ para $147,57 \pm 0,68$ nm, de $224,60 \pm 2,17$ para $145,27 \pm 0,81$ nm, de $206,60 \pm 4,48$ para $130,56 \pm 0,59$ nm e de $150,03 \pm 5,07$ para $122,03 \pm 1,11$ nm, respectivamente. Dentre estes, as formulações F2.10 e F2.20 não apresentaram alterações significativas de diâmetro médio entre os dias 2 e 30 de armazenamento, variando de $145,30 \pm 2,61$ para $145,27 \pm 0,81$ nm e de $122,77 \pm 3,33$ para $122,03 \pm 1,11$ nm.

Os valores de Ipd de F2.5, F2.10, F2.15 e F2.20 foram significativamente alterados entre os dias 1 e 30 de armazenamento de $0,28 \pm 0,01$, $0,31 \pm 0,04$, $0,36 \pm 0,01$ e $0,46 \pm 0,14$, para $0,17 \pm 0,01$, $0,15 \pm 0,01$, $0,13 \pm 0,01$ e $0,17 \pm 0,02$, respectivamente, os quais revelaram tamanhos de partículas distribuídas homogeneamente.

Em relação a 20% de amplitude, o diâmetro médio de F3.10, F3.15 e F3.20 apresentaram alterações significativas entre o dia 1 e 30 de armazenamento, que variaram de $171,23 \pm 7,84$, $96,89 \pm 2,33$ e $165,03 \pm 5,59$ para $130,27 \pm 2,51$, $118,50 \pm 2,55$ e $113,03 \pm 2,98$ nm, respectivamente; exceto F3.5 ($149,17 \pm 1,19$ - $146,67 \pm 1,03$ nm). No entanto, as formulações F3.10, F3.15 não apresentaram alterações significativa de diâmetro médio entre os dias 2 e 30 variando de $139,83 \pm 0,68$ para $130,27 \pm 2,51$ nm e de $114,70 \pm 1,04$ para $118,50 \pm 2,55$ nm, respectivamente.

Quanto ao Ipd F3.5, F3.10, F3.15 e F3.20 diminuíram significativamente ao longo de 30 dias, em que variaram de $0,26 \pm 0,01$, $0,43 \pm 0,02$, $0,46 \pm 0,01$ e $0,49 \pm 0,01$, para $0,16 \pm 0,02$, $0,16 \pm 0,01$, $0,19 \pm 0,01$ e $0,15 \pm 0,01$, respectivamente; predizendo que as os tamanhos de partículas encontram-se distribuídos de forma monodispersa.

Os CLN F4.5, F4.10, F4.15 e F4.20 preparados a 25% de amplitude apresentaram alterações significativas de diâmetro médio entre 1 e 30 dias, os quais variaram de $179,03 \pm 2,08$, $109,46 \pm 3,76$, $141,33 \pm 0,59$ e $161,20 \pm 1,01$ para $151,87 \pm 1,01$, $129,37 \pm 0,38$, $175,13 \pm 7,51$ e $142,33 \pm 4,10$ nm, respectivamente.

Tais sistemas apresentaram alterações de Ipd variando de $0,35 \pm 0,01$, $0,37 \pm 0,01$ e $0,38 \pm 0,01$ no dia 1 para $0,19 \pm 0,01$, $0,33 \pm 0,02$ e $0,26 \pm 0,01$ no dia 30, com exceção de

.....*Mariana Rillo Sato*.....

F4.15 ($0,26 \pm 0,01$ - $0,28 \pm 0,03$); revelando uma baixa polidispersão dos tamanhos de partículas.

Os sistemas preparados a 30% de amplitude, F5.15 e F5.20 sofreram mudanças significativas de diâmetro hidrodinâmico médio entre os dias 1 e 30, os quais variaram de $136,43 \pm 2,54$ e $198,97 \pm 26,13$ para $127,87 \pm 1,02$ e $113,87 \pm 1,56$ nm, respectivamente; exceto F5.5 ($164,57 \pm 3,86$ - $169,57 \pm 4,13$ nm) e F5.10 ($163,17 \pm 2,17$ - $163,90 \pm 6,84$ nm). Além disso, F5.20 não apresentou alteração significativa de diâmetro médio entre os dias 2 e 30 ($101,87 \pm 1,00$ - $113,87 \pm 1,56$ nm).

F5.10, F5.15 e F5.20 apresentaram diminuições nos valores de Ipd entre os dias 1 e 30, variando de $0,41 \pm 0,04$, $0,32 \pm 0,04$ e $0,28 \pm 0,03$ para $0,28 \pm 0,01$, $0,21 \pm 0,01$ e $0,13 \pm 0,02$, respectivamente; o que garante a baixa polidispersão dos tamanhos de partículas; exceto para F5.5 ($0,35 \pm 0,04$ - $0,32 \pm 0,02$).

F6.5 e F6.10 preparados a 35% de amplitude apresentaram diminuições significativas de diâmetro médio entre os dias 1 e 30 de armazenamento com valores de $189,10 \pm 2,96$ e $157,03 \pm 4,35$ para $136,10 \pm 2,00$ e $114,90 \pm 1,57$ nm, respectivamente. No entanto, F6.10 não sofreu alteração significativa entre o dia 2 ($111,17 \pm 1,43$ nm) e 30 dias ($114,90 \pm 1,57$ nm).

Em relação aos valores de Ipd, F6.5 e F6.10 diminuíram significativamente entre 1 e 30 dias de armazenamento de $0,39 \pm 0,05$ e $0,44 \pm 0,08$ para $0,16 \pm 0,02$ e $0,16 \pm 0,02$, respectivamente. Contudo, entre os dias 2 e 30, o Ipd destes sistemas mostraram-se estáveis sem alterações significativas com valores de $0,22 \pm 0,02$ e $0,25 \pm 0,02$ para $0,16 \pm 0,02$ e $0,16 \pm 0,02$, respectivamente; revelando tamanhos de partículas distribuídas homogeneamente na dispersão, possivelmente sem presença de aglomerados.

A maioria dos sistemas exibiu um nível de significância de $p < 0,05$ para a análise de diâmetro médio ao longo dos 30 dias de armazenamento, contudo, F2.10, F2.20, F3.10, F3.15, F5.20 e F6.10 apresentaram um nível de significância de $p > 0,05$ entre os dias 2 e 30 de armazenamento. Em relação ao Ipd praticamente todos os CLN exibiram um nível de significância de $p < 0,05$, de modo que neste período (dias 2 e 30), F6.5 e F6.10 permaneceram estáveis sem alterações significativas.

Este resultado é extremamente satisfatório, considerando que o Ipd é um parâmetro essencial que determina a distribuição de tamanho de partículas, em que Ipd menores ou até 0,3 indicam tamanhos de partículas distribuídos homogeneamente (KRAUSE *et al.*, 2010; NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

.....*Mariana Rillo Sato*.....

Tais resultados corroboram com Marcato (2009), em que o diâmetro hidrodinâmico médio e a polidispersão das partículas podem ser influenciados por parâmetros como a metodologia e as condições de obtenção, tempo e temperatura, por exemplo.

Outra análise extremamente relevante para acompanhar a estabilidade física de sistemas coloidais é o PZ. Este estudo permite avaliar o potencial elétrico entre a superfície da partícula e o meio específico. O PZ indica o grau de repulsão/atração entre as partículas adjacentes, assim, maiores valores numéricos de PZ (mV) revelam uma maior estabilidade física das partículas, devido uma maior força de repulsão eletrostática que ocorre entre as mesmas, enquanto valores menores $|\pm 30|$ visam uma maior tendência a desestabilizações dos sistemas oriundas de possíveis aglomerações (DAS; CHAUDHURY, 2011).

Entretanto, o estabilizante não iônico (P407) apresenta uma estabilidade física ocasionada por arranjo estérico entre a superfície da partícula e o meio específico, e não por repulsão eletrostática (LOURENÇO *et al.*, 1996).

Assim como na análise de diâmetro hidrodinâmico médio e I_{pd} , os CLN sem HIP encapsulada foram avaliados quanto ao PZ, como mostra a Figura 5.

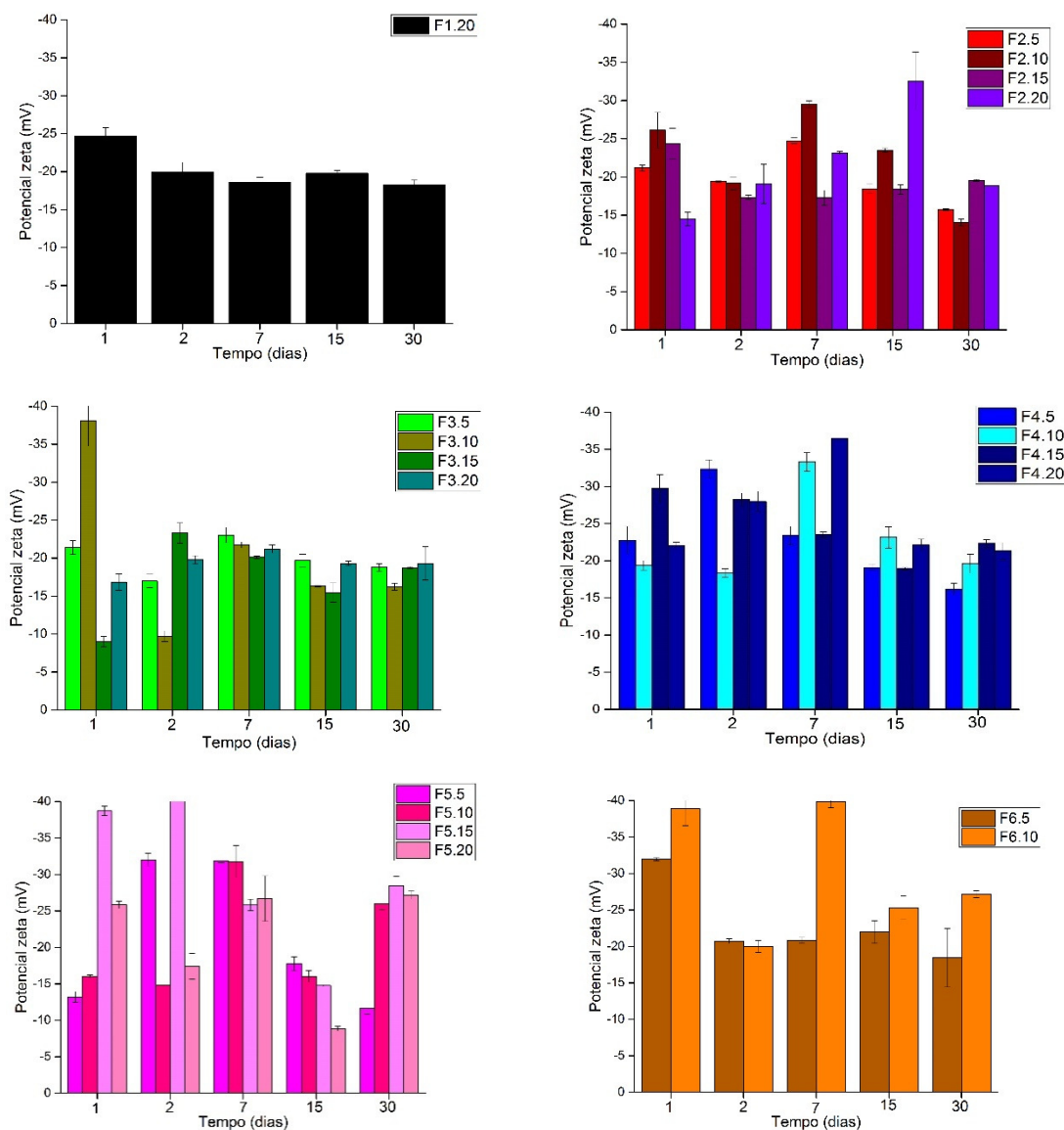


Figura 5. Potencial zeta dos CLN sem HIP encapsulada, desenvolvidos em diferentes amplitudes e tempos de sonicação *versus* tempo em dia. Média±D.P; n=3.
Fonte: Dados da pesquisa.

O PZ do CLN F1.20 diminuiu significativamente de $-24,67 \pm 1,12$ para $-18,27 \pm 0,61$ mV, entre os dias 1 e 30 de armazenamento. Contudo, não foram observadas mudança significativa entre 2 e 30 dias de armazenamento ($-19,93 \pm 1,31$ -- $-18,27 \pm 0,61$ mV).

F2.5, F2.10 e F2.15 apresentaram alterações significativas de PZ entre os dias 1 e 30, que variaram de $-21,17 \pm 0,38$, $-26,10 \pm 2,36$ e $-24,33 \pm 2,03$ mV, para $-15,73 \pm 1,04$, $-14,03 \pm 0,45$ e $-19,57 \pm 1,24$ mV, respectivamente; exceto F2.20 ($-14,50 \pm 0,89$ - $-18,87 \pm 0,61$ mV). Entretanto, F2.15 e F2.20 não apresentaram alterações significativas

de PZ entre os dias 2 e 30 de armazenamento, variando de $-17,33 \pm 0,29$ e $-19,07 \pm 2,59$ mV para $-19,57 \pm 1,24$ e $-18,87 \pm 0,61$ mV, respectivamente.

Com exceção F3.20 que não mostrou alterações de PZ entre os dias 1 e 30 de armazenamento ($-16,83 \pm 1,08$ - $-19,30 \pm 2,19$ mV), os CLN F3.5, F3.10 e F3.15 tiveram o PZ alterados significativamente ao longo deste período de $-21,37 \pm 0,91$, $-38,10 \pm 3,35$ e $-9,00 \pm 0,70$ mV para $-18,77 \pm 0,49$, $-16,23 \pm 0,45$ e $-18,73 \pm 0,12$ mV, respectivamente. Entre os dias 2 e 30, F3.5 e F3.20 não apresentaram alterações significativas de PZ variando de $-16,97 \pm 0,90$ e $-19,77 \pm 0,55$ para $-18,77 \pm 0,49$ e $-19,30 \pm 2,19$ mV, respectivamente.

F4.5 e F4.15 diminuíram significativamente o de PZ entre 1 e 30 dias, variando de $-22,73 \pm 1,91$ e $-29,73 \pm 1,88$ para $-16,20 \pm 0,79$ e $-22,33 \pm 0,51$ mV, respectivamente; exceto F4.10 e F4.20 que variaram de $-19,37 \pm 0,64$ e $-22,00 \pm 0,50$ para $-19,60 \pm 1,30$ mV e $-21,30 \pm 1,13$ mV, respectivamente. Do mesmo modo, F4.10 não apresentou alteração significativa de PZ entre os dias 2 e 30 ($-18,37 \pm 0,57$ - $-19,60 \pm 1,30$ mV).

Os CLN, F5.10 e F5.15 sofreram mudanças significativas de PZ entre 1 e 30 dias, variando de $-16,03 \pm 0,21$ e $-38,73 \pm 0,65$ para $-26,00 \pm 0,87$ e $-28,47 \pm 1,26$ mV, respectivamente; com exceção de F5.5 e F5.20, que variaram de $-13,20 \pm 0,72$ e $-25,83 \pm 0,49$ para $-11,67 \pm 0,86$ e $-27,17 \pm 0,55$ mV, respectivamente.

As formulações F6.5 e F6.10 apresentaram mudanças significativas de valores de PZ de $-31,97 \pm 0,21$ para $-18,43 \pm 4,01$ mV e de $-38,87 \pm 2,32$ para $-27,17 \pm 0,47$ mV entre 1 e 30 dias, respectivamente. No entanto, não foi observada alteração significativa entre os dias 2 e 30 de armazenamento para F6.5 ($-20,73 \pm 0,32$ - $-18,43 \pm 4,01$ mV).

Embora a maioria das formulações apresente um nível de significância de PZ de $p < 0,05$ entre o 1º e o 30º dia de armazenamento, os sistemas F1.20, F2.15, F2.20, F3.5, F3.20, F4.10 e F6.5 exibiram $p > 0,05$ entre os dias 2 e 30 de armazenamento, indicando ausência de alterações significativas de PZ conferindo a boa estabilidade física dos CLN, ocasionada por arranjo estérico entre a superfície da partícula e o meio específico.

Ainda que alguns CLN sem HIP obtidos em diferentes condições de amplitude e de tempo de sonicação, tenham apresentado alterações significativas nas análises de diâmetro, Ipd e de PZ, determinou-se como critério de seleção do sistema, o Ipd e o PZ das partículas.

De acordo com os resultados estatísticos, apenas F5.5 e F6.5 apresentaram um nível de significância de $p > 0,05$ em ambas as análises (Ipd e PZ); no entanto, entre estas, F6.5 resultou em um menor valor de Ipd, além de um maior PZ, ao longo dos 30

.....*Mariana Rillo Sato*.....

dias de análises. Portanto, pode-se inferir que entre as diferentes condições testadas e analisadas por DLS, 35% de amplitude e 5min de sonicação foi a condição mais adequada para a obtenção de um sistema distribuído de forma monodispersa e estável fisicamente durante 30 dias de armazenamento.

5.2.2 Análise de rastreamento das nanopartículas

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) objetiva verificar o tamanho e a concentração de partículas dispersas no sistema em um volume conhecido, em tempo real (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Mediante os resultados estatísticos de diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd e de PZ dos 21 CLN sem HIP, em que F6.5 não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) de Ipd e de PZ entre os dias 2 e 30 de armazenamento, este foi posteriormente analisado por NTA no 2º dia de armazenamento, como mostra a Figura 6.

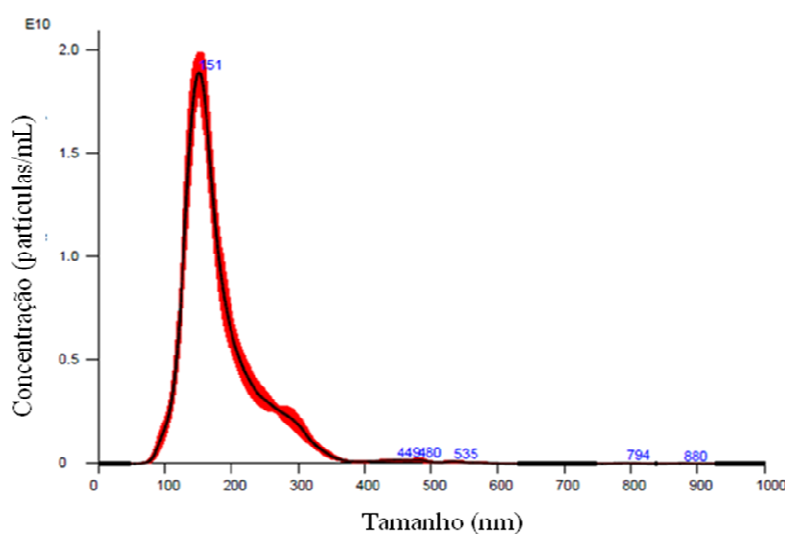


Figura 6. Relação entre distribuição de tamanho de partículas e concentração, medida por NTA (diluição de 2000 x).

Fonte: Dados da pesquisa.

O CLN F6.5 analisado por NTA indicou uma distribuição de tamanho médio de partículas de $183,3 \pm 1,10$ nm, resultando em uma moda de $151,1 \pm 2,80$ nm a uma concentração de $1,53 \cdot 10^{12}$ partículas/mL, como mostra a Figura 6 obtida pelo *software* do próprio equipamento de análise.

Conforme observado no gráfico, F6.5 apresentou distribuição unimodal, demonstrando nanopartículas com dimensões de 100 a 350 nm, mas com predominância

.....*Mariana Rillo Sato*.....

de aproximadamente 151 nm; enquanto a análise de DLS resultou em valores de diâmetro hidrodinâmico médio de 142,23 nm e de Ipd de 0,22 no dia 2 de armazenamento. Correlacionando ambos os resultados, podemos concluir que o sistema apresentou tamanho médio com baixa polidispersão de partículas e provável ausência de aglomerados na dispersão, o que reforça o resultado obtido por DLS.

Tais dados foram criteriosamente decisivos para que F6.5 fosse selecionado para dar prosseguimento ao trabalho, visto que ambos as análises certificaram tamanhos de partículas distribuídos homogeneamente na dispersão, além disso, vale ressaltar que F6.5 apresentou um valor de PZ de -20,73 mV neste período, conferindo assim, a estabilidade física do sistema.

5.2.3 Análise de espalhamento de luz dinâmico dos CLN contendo HIP

Depois de obtido e correlacionado os resultados de DLS e de NTA, F6.5 foi o CLN selecionado para a incorporação da HIP. Assim, 3 concentrações diferentes foram testadas (0,05%, 0,25% e 0,5%), denominados de F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5, respectivamente, e analisadas por DLS assim como descrito na Seção 5.2.1.

A Figura 7 mostra os resultados de diâmetro e Ipd representados por barras e linhas, respectivamente, e a Figura 8 a análise de PZ destes sistemas.

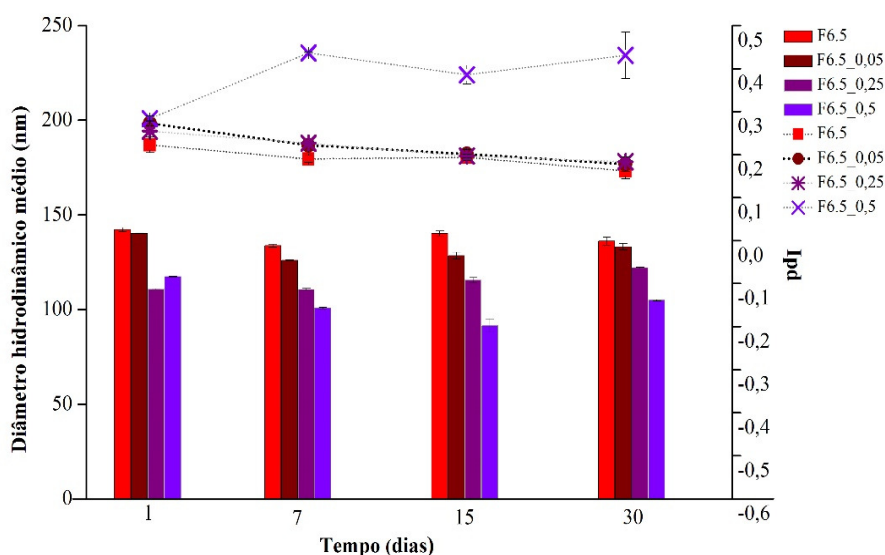


Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico médio e Ipd dos CLN com HIP encapsulada *versus* tempo em dias. Média±D.P; n=3.

Fonte: Dados da pesquisa.

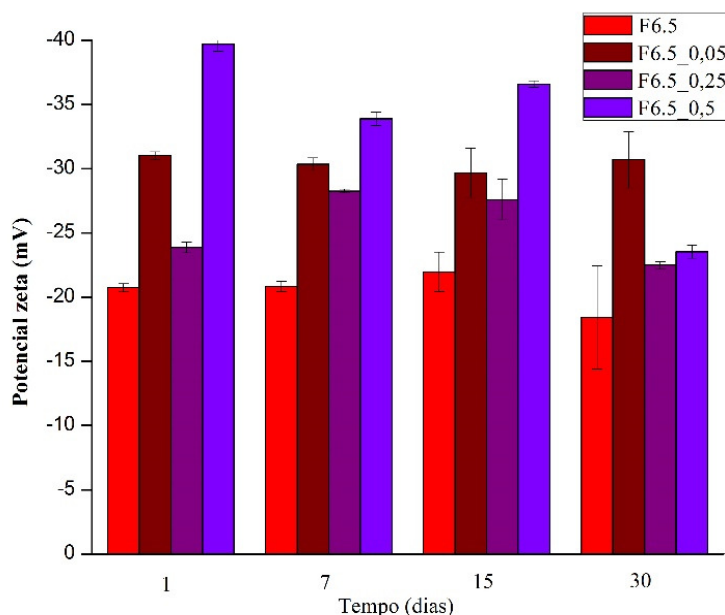


Figura 8. Potencial zeta dos CLN com HIP encapsulada *versus* tempo em dia. Média± D.P; n=3.

Fonte: Dados da pesquisa.

A incorporação de 0,05%, 0,25% e de 0,50% de HIP em F6.5 provocou alterações significativas de diâmetro hidrodinâmico médio entre os dias 1 e 30 de armazenamento, que variaram de $140,23 \pm 0,15$ para $133,20 \pm 1,68$ nm, de $110,77 \pm 0,15$ para $122,00 \pm 0,44$ nm e de $117,37 \pm 0,15$ para $104,87 \pm 0,35$ nm, respectivamente.

Na análise de Ipd, F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5 apresentaram mudanças significativas entre os dias 1 e 30 variando de $0,27 \pm 0,01$ para $0,18 \pm 0,02$, de $0,25 \pm 0,01$ para $0,18 \pm 0,01$ e de $0,28 \pm 0,01$ para $0,43 \pm 0,05$, respectivamente. Com exceção de F6.5_0,5 que apresentou maior valor de Ipd, que pode caracterizar uma alta polidispersão de distribuição de partículas. Os demais sistemas estão coerentes aos relatos da literatura, em que $Ipd < 0,3$ sugere distribuição homogênea das partículas (MARCATO, 2009; NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

Em contrapartida, 0,05% e 0,25% de HIP não sofreram alterações significativas de PZ entre os dias 1 e 30, variando de $-31,03 \pm 0,29$ e $-23,87 \pm 0,40$ para $-30,70 \pm 2,18$ e $-22,50 \pm 0,26$ mV, respectivamente. Ora, F6.5_0,5 apresentou mudança significativa de PZ neste período variando de $-39,70 \pm 0,53$ para $-23,53 \pm 0,50$ mV. A negatividade dos valores de PZ pode ser decorrente as estruturas químicas do lipídio sólido EP e dos lipídios líquidos, TGACC e OE, isto é, os grupamentos carboxílicos livres existentes na superfície da partícula.

Embora F6.5_0,05 tenha apresentado diferença estatisticamente significativa de diâmetro médio e Ipd, os tamanhos de partículas apresentaram baixa polidispersão, uma

vez que foram obtidos valores de diâmetro médio <300 nm e de $I_{pd} < 0,3$. Ademais, F6.5_0,05 e F6.5_0,25 não apresentaram alterações significativas nos valores de PZ ($p > 0,05$) entre os dias 1 e 30 de armazenamento. Contudo, entre estes F6.5_0,05 exibiu um maior valor de PZ, revelando sua excelente estabilidade física ocasionada por arranjo estérico entre a superfície das partículas e o meio.

Além de tais parâmetros apontados serem determinantes para a seleção do sistema, o fato de F6.5_0,05 conter uma menor concentração de HIP reforçou a hipótese, uma vez que a HIP é consideravelmente mais eficaz em baixas concentrações, sendo que elevadas concentrações de FS podem ocasionar à agregação em meio aquoso na forma monomérica (KARIOTI; BILIA, 2010; NAGATA *et al.*, 2012).

5.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia e o tamanho dos CLN com e sem HIP encapsulada foram analisados por MET. A Figura 9 mostra as fotomicrografias do CLN F6.5 e dos CLN com HIP encapsulada em três concentrações, 0,05%, 0,25% e 0,5%, denominados de F6.5_0,05, F6.5_0,25 e F6.5_0,5, respectivamente.

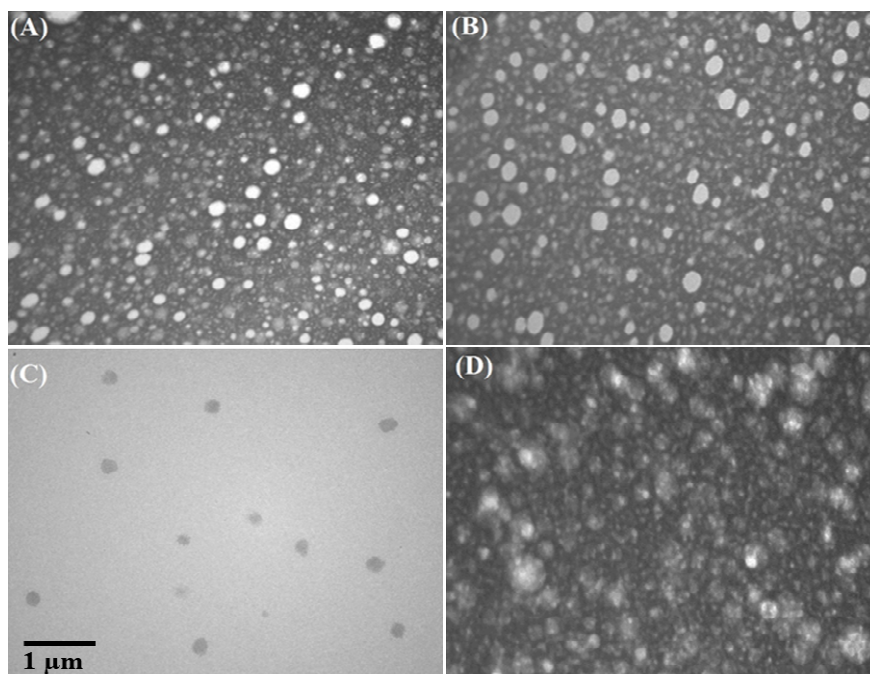


Figura 9. Fotomicrografias de F6.5 (A), F6.5_0,05 (B), F6.5_0,25 (C) e F6.5_0,5 (D). A e C em aumento de 50x. B e D em aumento de 100x.

Fonte: Autora (2020).

Na Figura 9 foi possível observar que os CLN com e sem HIP encapsulada apresentaram morfologias praticamente esféricas e distribuídas em tamanhos nanométricos. Os tamanhos corroboram com os valores encontrados pelas técnicas de DLS e NTA estando em uma faixa de 100 a 350 nm com predomínio de partículas em ~200 nm.

5.2.5 Eficiência de encapsulação da HIP

Depois de realizadas as caracterizações físico-químicas, a %EE de HIP foi determinada pelo método de filtração conforme Fachinetti *et al.* (2018) adaptada. A eficiência de encapsulação de F6.5_0,05 correspondeu a $89,3 \pm 0,4\%$, revelando que uma grande parte da HIP foi incorporada no CLN. Este resultado foi similar ao estudo de Lima *et al.* (2013), que incorporou HIP (0,1% m/v) em NLS, obtendo uma EE de 83,5% através da técnica de ultrafiltração. Assim, pode-se predizer que o método possibilitou encapsular eficientemente a HIP no CLN desenvolvido.

5.3 5.3 Caracterização físico-química dos HG de geleificação *in situ* acrescidos de CLN com e sem HIP

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

A análise MEV-FEG foi realizada para verificar a rugosidade da superfície de CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5 (Tabela 3, Seção 4.2.4). As imperfeições e irregularidades da superfície dos HG acrescidos de CLN com HIP foram medidas e expressas como valor de rugosidade média (RMS).

A Figura 10 apresenta as fotomicrografias do HG e dos sistemas liofilizados, CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5.

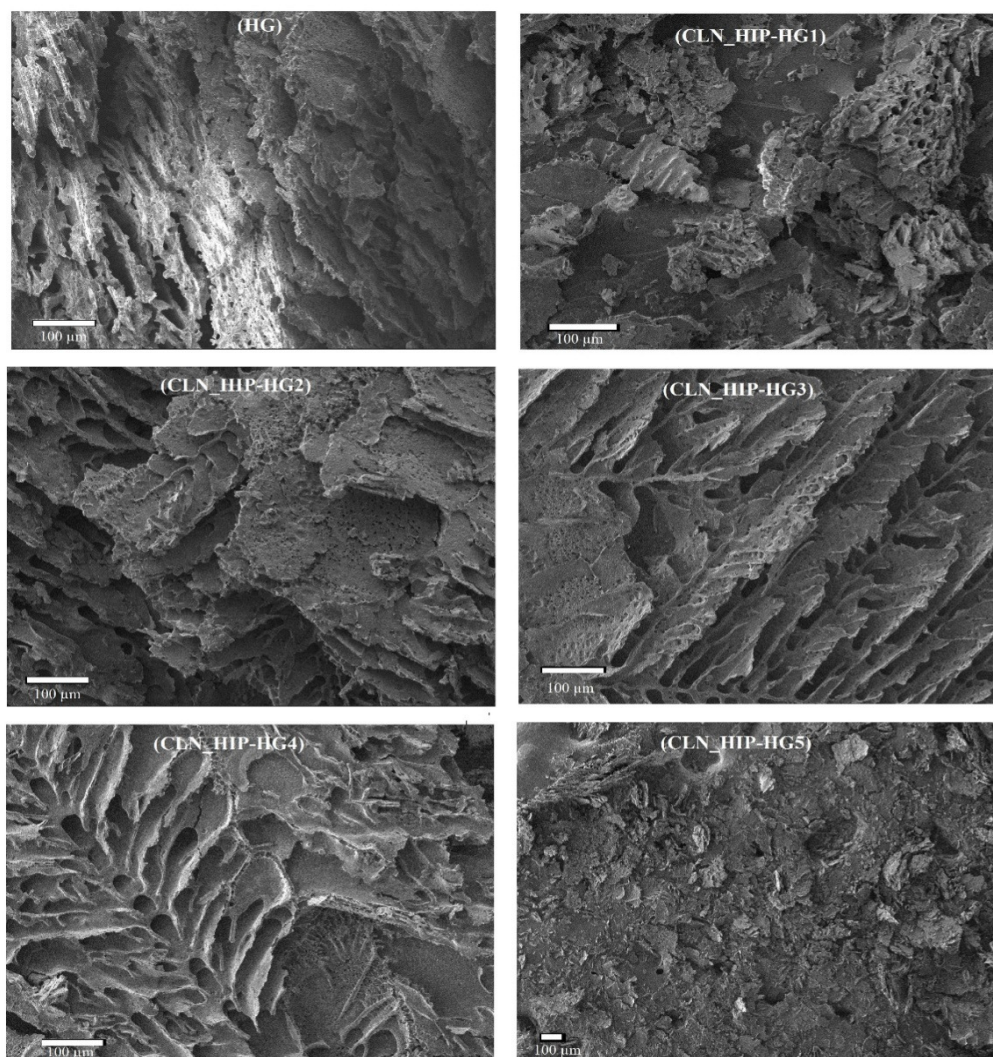


Figura 10. Fotomicrografias dos sistemas CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5. Aumento de 150x.

Fonte: Autora (2020).

O HG livre e os sistemas CLN_HIP-HG1 (CLN:HG 50:50), CLN_HIP-HG2 (CLN:HG 40:60), CLN_HIP-HG3 (CLN:HG 30:70), CLN_HIP-HG4 (CLN:HG 20:80) e CLN_HIP-HG5 (CLN:HG 10:90), apresentaram valores de RMS de 37,4, e de 28; 27,5; 30,6; 38,5 e 39, respectivamente.

As fotomicrografias do HG e dos sistemas (Figura 10) apresentaram superfícies rugosas e porosas com estruturas semelhantes a uma folha, indicando que a água ficou retida no interior das estruturas dos HG (liofilizados) (LANCELOTTI, 2014). Além disso, as médias das áreas de rugosidade entre todas as amostras analisadas microscopicamente não apresentaram alterações significativas, provavelmente devido ao processo de liofilização que retirou a água interna dos sistemas.

5.3.2 Análises reológicas contínuas e oscilatórias

5.3.2.1 Reologia contínua

A análise reológica contínua avalia o comportamento de fluxo do material, correlacionando a tensão de cisalhamento (Pa) e a taxa de cisalhamento (1/s), quando submetido a uma determinada tensão (SAVIC *et al.*, 2011). Desta forma, o aumento da taxa de cisalhamento é representado pela curva ascendente, enquanto a diminuição da taxa de cisalhamento, por curva descendente (CALIXTO *et al.*, 2015).

Os diagramas das curvas de fluxo do HG e de CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5, encontram-se na Figura 11.

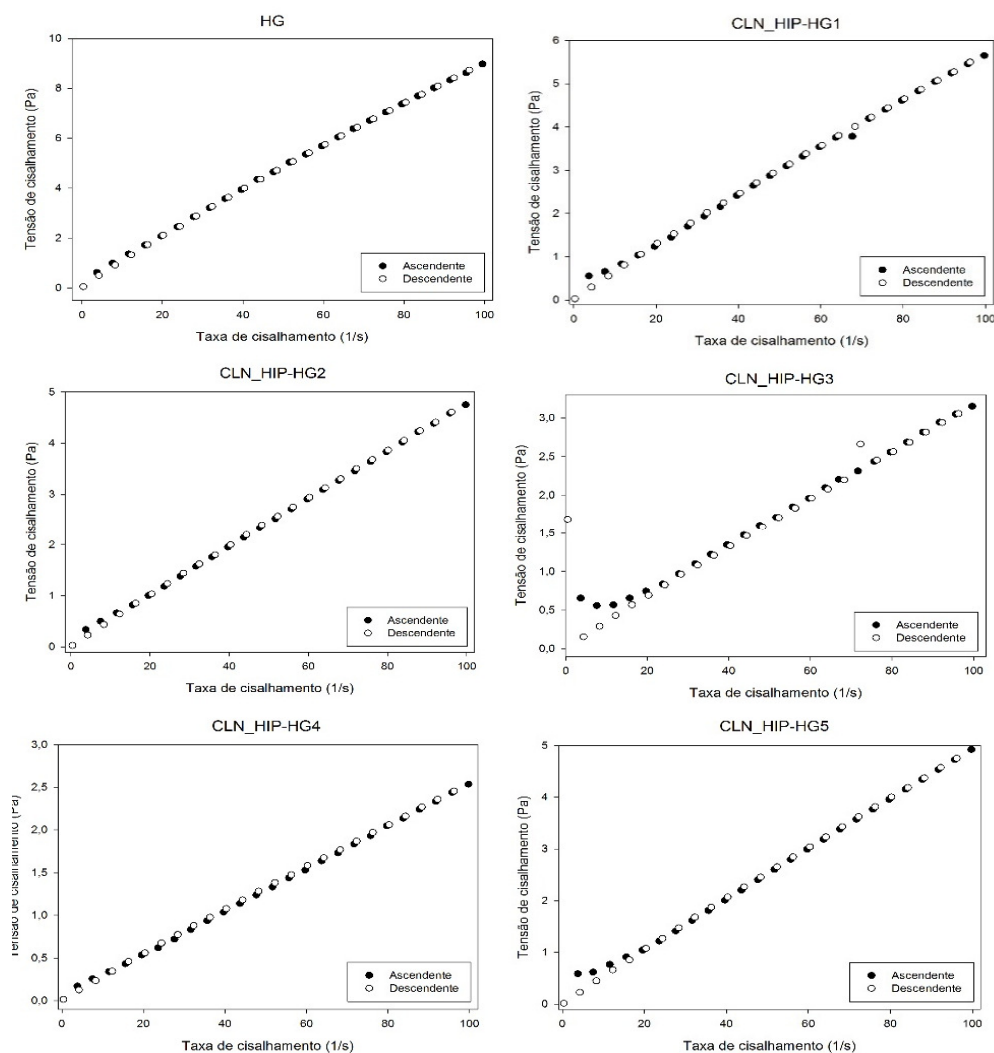


Figura 11. Reogramas dos sistemas. Símbolos cheios indicam curvas ascendentes e símbolos vazios, curvas descendentes.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os reogramas de cisalhamentos contínuos (Figura 11) do HG e dos HG contendo CLN com HIP encapsulada, praticamente não apresentaram alterações nos perfis das curvas ascendentes e descendentes.

O HG e os sistemas CLN_HIP-HG1 (CLN:HG 50:50), CLN_HIP-HG2 (CLN:HG 40:60), CLN_HIP-HG3 (CLN:HG 30:70), CLN_HIP-HG4 (CLN:HG 20:80) e CLN_HIP-HG5 (CLN:HG 10:90), apresentaram um comportamento Newtoniano, não sendo possível observar área de histerese nos reogramas; indicando que a viscosidade dos sistemas se manteve constante, uma vez que não foi alterada com o aumento da taxa de cisalhamento.

Em comportamentos Newtonianos, a viscosidade do fluido é constante a uma dada pressão e temperatura, uma vez que a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento aplicada (CARVALHO *et al.*, 2012).

Assim, a partir da equação $\tau = k \cdot (\dot{\gamma})^n$ (Equação 2, Seção 4.2.5.2.1) parâmetros foram calculados para descrever o comportamento reológico dos fluidos, tendo K como o índice de consistência e n como o índice do comportamento do fluxo (CALIXTO *et al.*, 2015).

Os valores de índice de consistência (K) e de comportamento do fluxo (n) do HG e de tais sistemas se encontram na Tabela 8.

Tabela 8. Índice de consistência do fluxo (K) e índice do comportamento do fluxo (n) do HG e dos HG acrescidos de CLN com HIP, analisados a 37°C. Média±D.P; n=3.

Sistema	K	n
HG	0,1±0,01	0,9±0,01
CLN_HIP-HG1	0,08±0,01	0,9±0,01
CLN_HIP-HG2	0,05±0,01	0,9±0,01
CLN_HIP-HG3	0,05±0,01	0,8±0,03
CLN_HIP-HG4	0,03±0,01	0,9±0,01
CLN_HIP-HG5	0,06±0,01	0,9±0,01

Para o fluido se comportar como Newtoniano os valores de n devem ser próximos ou iguais a 1 (CALIXTO *et al.*, 2016) e de K iguais a 0, resultado observado para os diferentes sistemas (Tabela 8). Para o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármaco para administração vaginal, tais resultados de fluidos Newtonianos podem ser satisfatórios, sugerindo-se que os HG acrescidos de CLN com HIP encapsulada, provavelmente manterão as viscosidades constantes no meio fisiológico independentes das tensões aplicadas.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

5.3.2.2 Reologia oscilatória

A análise reologia oscilatória analisa a viscoelasticidade da formulação, fornecendo parâmetros sobre o comportamento estrutural e dinâmico do sistema, que implica diretamente no seu desempenho (LEITE *et al.*, 2013). Para isto, são obtidas respostas em módulo elástico (G') ou módulo de armazenagem em módulo viscoso (G'') ou módulo de perda de energia (PÉNZES *et al.*, 2004).

Os reogramas do HG e dos sistemas CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5, estão representados na Figura 12.

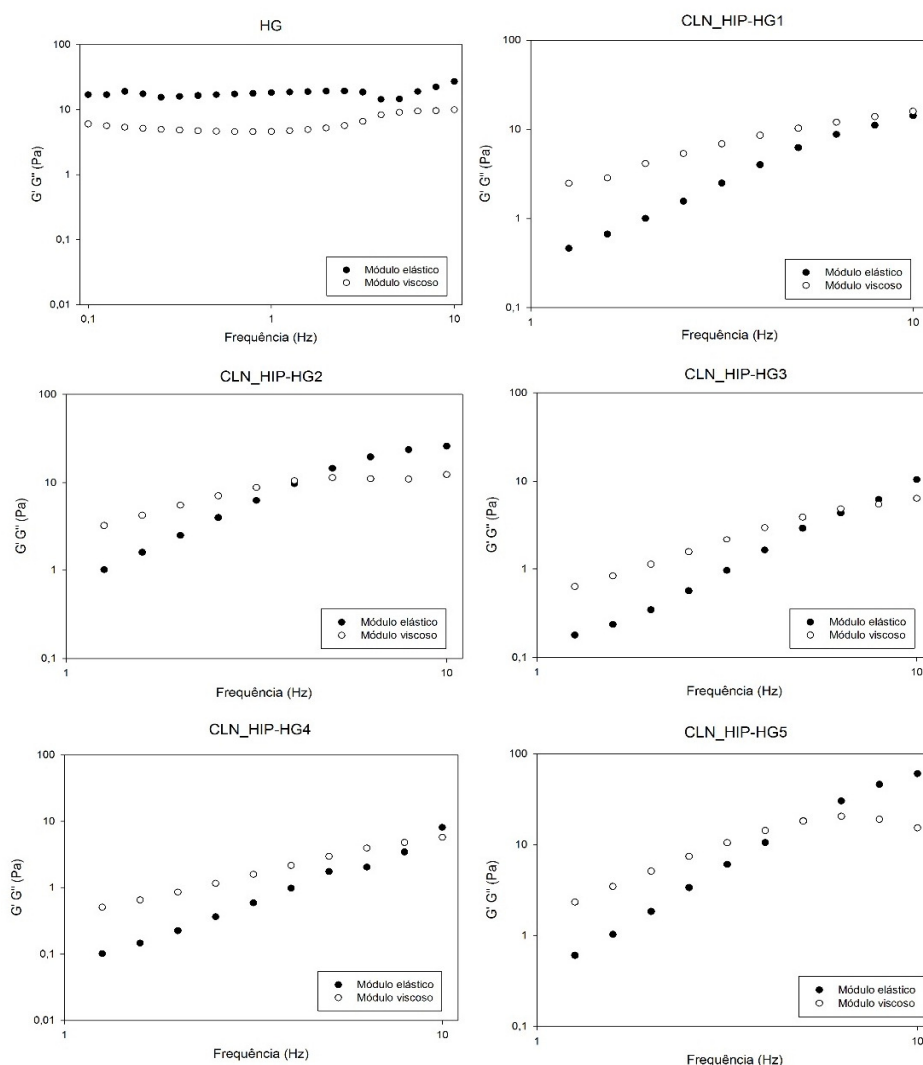


Figura 12. Comportamento reológico oscilatório dos valores de G' e G'' em função da frequência (Hz) para os sistemas. Símbolos cheios indicam módulo elástico (G') e símbolos vazios, módulo viscoso (G'').
Fonte: Dados da pesquisa.

Nos reogramas da Figura 12, observa-se que houve aumentos dos valores G' e G'' (Pa) em função da frequência (Hz), o que relata a forte influência das características sobre o comportamento reológico dos CLN com HIP encapsulada dispersos em HG, analisados a 37°C.

O HG e os sistemas CLN_HIP-HG2 (CLN:HG 40:60), CLN_HIP-HG3 (CLN:HG 30:70), CLN_HIP-HG4 (CLN:HG 20:80) e CLN_HIP-HG5 (CLN:HG 10:90), apresentaram valores de G' superiores a G'' , para os maiores valores de frequência aplicados, indicando que os CLN com HIP encapsulada dispersos em HG, possuem uma característica de líquido viscoso com comportamento predominantemente elástico. O ligeiro aumento do módulo elástico (G') destes sistemas pode ser explicado por uma organização estrutural interna após a dispersão de diferentes proporções de CLN com HIP nos HG (40:60, 30:70, 20:80 e 10:90).

Diferentemente CLN_HIP-HG1 (CLN:HG 50:50) apresentou um módulo viscoso (G'') maior que módulo elástico (G') em função da frequência aplicada, caracterizando um sistema predominantemente fluido.

5.3.3 Ensaio de mucoadesão *in vitro*

O ensaio de mucoadesão para novos sistemas de liberação de fármacos é extremamente relevante ao considerar que suas propriedades mucoadesivas são analisadas em uma membrana biológica que simula o ambiente vaginal. Isto possibilita demonstrar a capacidade do sistema se aderir à membrana da mucosa vaginal (KHUTORYANSKIY, 2011).

O desempenho mucoadesivo *in vitro* do HG e dos HG acrescidos de CLN com HIP (CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2) utilizando mucosa vaginal bovina previamente hidratada no muco artificial vaginal, foi avaliado utilizando um método de tração.

A Figura 13 mostra os resultados de trabalho de força de mucoadesão (N.sec) e de força de mucoadesão (N) para separar os sistemas da sonda contendo a mucosa vaginal bovina, que foram calculados com a ajuda do *software Texture Exponent Software*, do próprio equipamento de análise.

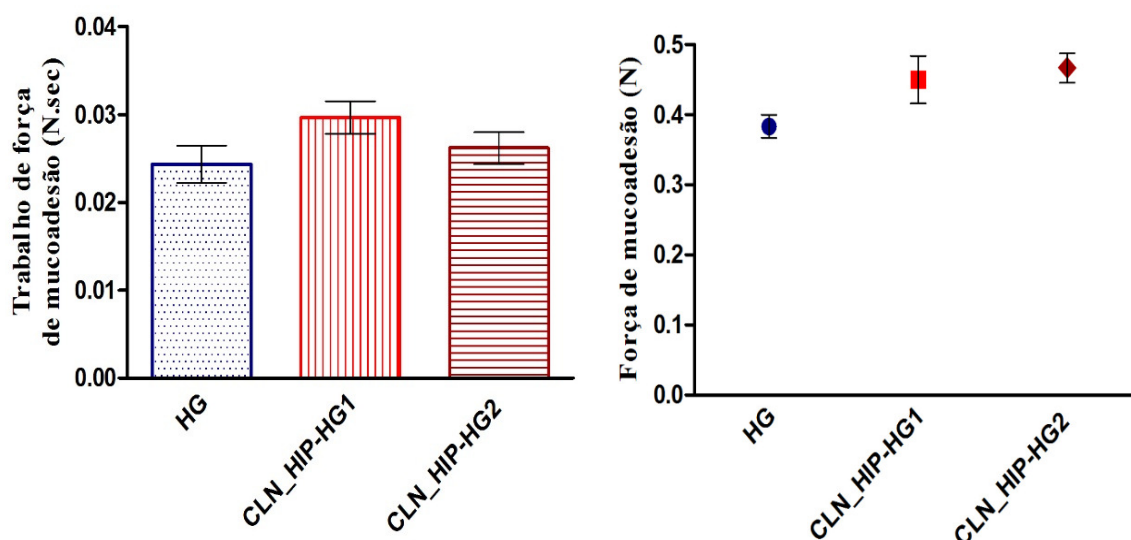


Figura 13. Resultados de trabalho de força de mucoadesão (N.sec) e de força de mucoadesão (N) do HG e dos sistemas. Média±D.P; n=6.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 quando submetidos à análise mucoadesiva *in vitro* utilizando mucosa vaginal bovina, apresentaram valores de trabalho de força mucoadesiva de $0,029 \pm 0,004$ e $0,026 \pm 0,004$ N.sec., respectivamente, sem diferenças significativas em relação ao HG livre, $0,024 \pm 0,005$ N.sec (Figura 13).

Os valores de trabalho de força mucoadesiva (N.sec) de CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 possuem a mesma magnitude ou até mesmo superior comparados a valores de estudos que prepararam sistemas mucoadesivos como precursor de cristal líquido (SALMAZI *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2019), os quais seguiram metodologias similares.

As forças de mucoadesão dos sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 não apresentaram alterações significativas comparadas ao HG livre, com valores de $0,45 \pm 0,08$, $0,46 \pm 0,05$ e $0,38 \pm 0,04$ N, respectivamente (Figura 13). Tais resultados foram superiores a valores resultantes do estudo de Bruschi *et al.* (2007) que prepararam sistemas semissólidos seguindo uma metodologia similar, no entanto, utilizando disco de mucina como modelo de substrato.

Presume-se que os grupamentos químicos dos polímeros constituídos nos sistemas, QS (OH e NH₂) e P407 (OH), que possuem propriedades mucoadesiva e termo-responsivo, respectivamente, possivelmente ocasionaram interações eletrostáticas com o muco carregado negativamente e/ou interagiram com a superfície da mucosa vaginal por ligações de hidrogênio (KHUTORYANSKIY, 2011; PARK *et al.*, 2012).

Embora diversas teorias de mucoadesão possam justificar os mecanismos envolvidos, provavelmente valores tão similares de força de mucoadesão entre os sistemas mostram que a capacidade de intumescimento possa estar relacionada à interpenetração/difusão das cadeias poliméricas dos HG nas glicoproteínas da mucina existente na superfície da mucosa (ANDREWS *et al.*, 2009).

A propriedade mucoadesiva dos sistemas pode garantir um maior tempo de contato deste com a mucosa vaginal, bem como do fármaco com a barreira epitelial da mucosa. Consequentemente, o sistema poderá interagir via ligações químicas e/ou física de forma mais eficiente com a mucosa vaginal e com isto, reduzir a frequência de administração; contribuindo assim, para o desempenho clínico (SENYIGIT *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2019).

5.3.4 Determinação de seringabilidade

A seringabilidade realizada utilizando um analisador de textura no modo de compressão avalia a força necessária para que ocorra a extrusão dos HG acrescidos de CLN com HIP, a partir de um dispositivo apropriado. Em suma, determina a força do fluxo e o trabalho necessário para que o sistema seja aplicado no ambiente vaginal através de uma seringa (KELLY *et al.*, 2004).

Os valores de trabalho requerido (N.mm) obtidos na seringabilidade do HG e dos sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2, estão representados na Figura 14.

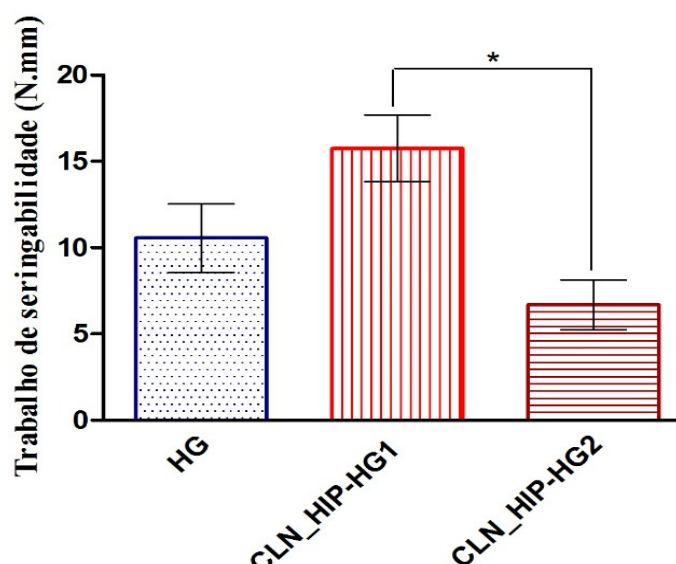


Figura 14. Trabalho de seringabilidade (N.mm) para extrusão de sistemas através de seringas plásticas de 3 mL. Média±D.P; n=6.

*Diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p<0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de trabalho requerido (N.mm) dos sistemas CLN_HIP-HG1 e CLN_HIP-HG2 foram $15,74 \pm 4,75$ e $6,69 \pm 3,54$ N.mm, em que CLN_HIP-HG1 conferiu uma maior injetabilidade que CLN_HIP-HG2; contudo, ambos não apresentaram alterações significativas comparados ao HG livre ($10,55 \pm 4,83$ N.mm).

Estudos têm revelado valores de seringabilidade maiores que 20 N.mm para extrusão de sistemas utilizando uma seringa (KELLY *et al.*, 2004; CAMPAÑA-SEOANE *et al.*, 2014). Entretanto, Bruschi *et al.* (2007) demonstraram que resultados menores que 20 N.mm podem ser apropriados, devido à facilidade de administração local.

Além disso, a seringa de 3 mL utilizada neste estudo para mimetizar um aplicador vaginal comercial, possui um diâmetro menor que o orifício de um aplicador semissólido vaginal. Sendo assim, quando inserida em um aplicador vaginal comercial, possivelmente os valores de seringabilidade serão menores (FERREIRA *et al.*, 2017). Tal capacidade em eliminar sistemas com propriedades mucoadesivas tende a propiciar adesão ao tratamento e conforto ao paciente no momento da administração.

5.3.5 Análise de calorimetria exploratória diferencial

A análise térmica realizada pela técnica de DSC é amplamente utilizada para determinar informações qualitativas e quantitativas de propriedades físico-químicas da amostra, através do processo de aquecimento/resfriamento, tais como ponto de fusão, variação de entalpia de fusão, processos endotérmicos e exotérmicos (BERNAL *et al.*, 2002).

Os componentes utilizados no preparo dos sistemas, HIP, P407 e QS foram analisados inicialmente, como mostra a Figura 15 e a Tabela 9. Eventos endotérmicos indicam a temperatura de fusão.

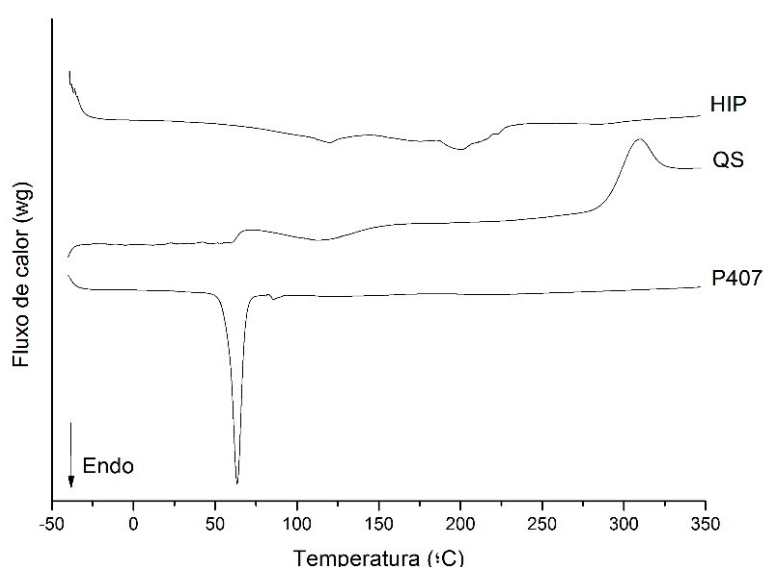


Figura 15. Termogramas dos componentes analisados individualmente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9. Valores de temperaturas de fusão dos picos da HIP e da QS analisados individualmente.

Componente do sistema	T _{fusão} (°C)
QS	114
HIP	200,4

As curvas de DSC dos componentes utilizados para a obtenção dos CLN (P407, EP e 0E) foram previamente analisadas no mestrado da candidata, em que apresentaram eventos endotérmicos coerentes a relatos da literatura (SATO *et al.*, 2017).

A curva de DSC da HIP apresentou evento endotérmico em aproximadamente 200°C. Enquanto o termograma da QS analisada individualmente mostrou um pico

.....*Mariana Rillo Sato*.....

endotérmico em aproximadamente 114°C, relacionado provavelmente à evaporação de substâncias voláteis (água e grupos hidroxilas da QS), além de um evento exotérmico próximo de 300°C, que pode ser indicativo de início de degradação.

A Figura 16 apresenta os termogramas dos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG.

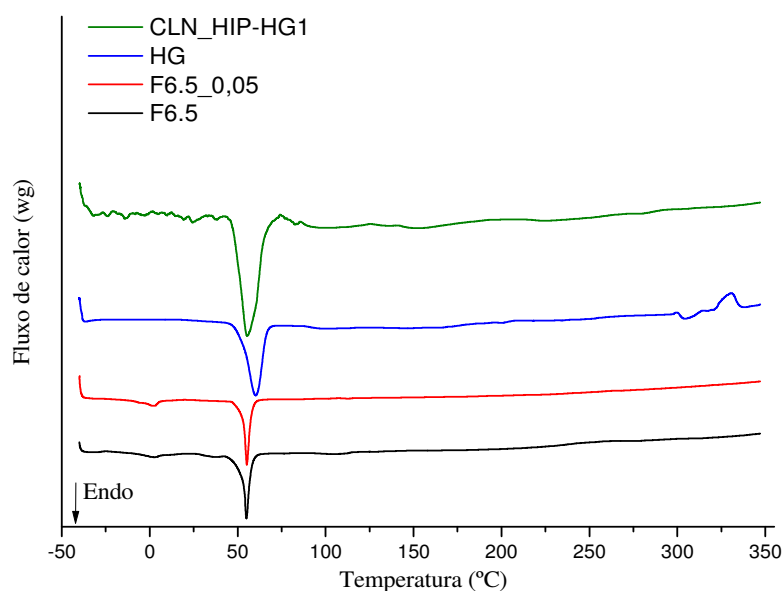


Figura 16. Termogramas dos sistemas.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de temperatura de fusão dos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG, estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de temperatura de fusão dos picos dos sistemas: F6.5, F6.5_0,05, HG e CLN_HIP-HG1.

Sistema	T _{fusão} (°C)
F6.5	54,5
F6.5_0,05	55,3
HG	60,1
CLN_HIP-HG1	55,3

Os termogramas dos sistemas F6.5, F6.5_0,05, HG e CLN_HIP-HG1 (Figura 16) apresentaram picos endotérmicos nítidos e definidos em aproximadamente 54,5°C, 55,3°C, 60,1°C e 55,3°C, respectivamente. Os eventos endotérmicos caracterizaram

picos similares aos componentes contidos nos CLN com e sem HIP dispersos ou não em HG, como o EP e o P407, conforme o estudo de Sato *et al.* (2017) as temperaturas de fusão apresentadas foram cerca de 52,4°C e 55,6°C, respectivamente.

Do mesmo modo, o HG evidenciou um pico de fusão característicos do P407, sugerindo que os picos definidos podem ser decorrentes destes componentes estarem em maiores concentrações para a obtenção dos sistemas.

O HG manteve o evento exotérmico próximo de 300°C, correspondente a QS presente no sistema. Não foi possível detectar o evento correspondente a fusão da HIP em F6.5_0,05 e no HG acrescido de CLN com HIP, provavelmente devido a sua baixa concentração presente no CLN.

5.3.6 Seleção dos HG de geleificação *in situ* acrescidos de CLN com HIP

Um dos sistemas (HG acrescidos de CLN com HIP) foi selecionado de acordo com os resultados mais promissores das análises reológicas, contínuas e oscilatórias, mucoadesão *in vitro* e seringabilidade.

Na análise reológica contínua, o HG e os sistemas CLN_HIP-HG1, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5, apresentaram um comportamento Newtoniano, em que os valores de n foram próximos a 1 e de K iguais a 0. Na análise reológica oscilatória, CLN_HIP-HG2, CLN_HIP-HG3, CLN_HIP-HG4 e CLN_HIP-HG5 apresentaram valores de módulos elásticos (G') predominantemente superiores aos módulos viscosos (G'') para os valores de frequência aplicados (Hz); enquanto CLN_HIP-HG1 apresentou G'' maior que G' .

Embora os resultados reológicos contínuos e oscilatórios tenham mostrado a efetiva formação *in situ* dos HG acrescidos de CLN com HIP, quando os resultados dos ensaios *in vitro* foram analisados em conjunto, o sistema CLN_HIP-HG1 se destaca, pois, apesar de ser um sistema com comportamento predominantemente fluido, não apresentou diferença significativa de trabalho de força mucoadesiva *in vitro* comparada ao HG livre, mas um valor de força de mucoadesão significativamente maior que o HG livre. Além disso, o valor de trabalho de seringabilidade mostrou-se adequado, demonstrando ser um sistema facilmente administrado no local. Portanto, CLN_HIP-HG1 foi selecionado para dar continuidade as posteriores técnicas de caracterização *in vitro*, bem como os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* associados ou não a TFD.

.....Mariana Rillo Sato.....

5.4 Validação da metodologia analítica para quantificação da HIP por CLAE

Metodologias analíticas para quantificação da HIP utilizando CLAE são relatadas na literatura, no entanto, estudos destacam limitações dentre elas à interferência de outros constituintes nos extratos, longos tempos de execução e fase móvel normalmente constituída por misturas de solventes (SIRVENT; GIBSON, 2000).

Visando garantir um método analítico preciso para quantificação da HIP por CLAE, as condições cromatográficas foram estabelecidas e validadas conforme relatada na Tabela 4 (Seção 4.2.6). Dois métodos analíticos foram testados, no método I, as amostras foram constituídas de solução estoque de HIP diluída em metanol, conforme o estudo de Kamal *et al.* (2012). O método II, contendo meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80, partiu de adaptações metodológicas do estudo de Gupta *et al.* (2011) que testaram meio tampão fosfato de sódio em diferentes concentrações de Tween 80. O método II foi realizado para que os resultados provenientes dos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*, fossem analisados.

5.4.1 Conformidade do sistema

Inicialmente realizou-se o espectro de absorção da HIP solubilizada em metanol por CLAE, estabelecendo absorção máxima da HIP no comprimento de onda de 590 nm, demonstrado na Figura 17.

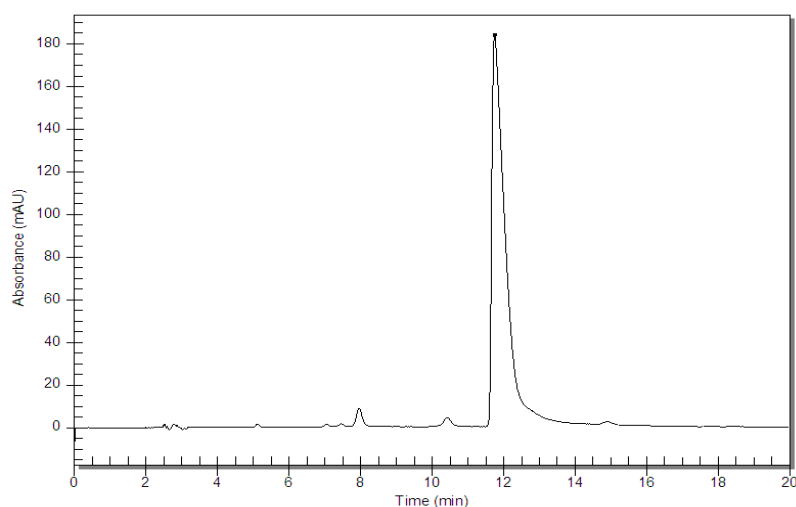


Figura 17. Cromatograma de HIP por CLAE.

Fonte: Dados da pesquisa.

A conformidade do método cromatográfico mostrou que HIP possui um pico característico com máxima absorção no comprimento de onda de 590 nm. Os resultados obtidos no estudo de conformidade apresentaram valores médios de fator de assimetria dos picos e de fator de cauda de 1,14 e 1,18, respectivamente, menores que o limite preconizado de 2,0. O número de pratos teóricos de 8500,39 foi maior que o valor recomendado, de 2000. Assim, as médias dos valores foram adequadas, revelando que o método analítico desenvolvido é adequado para a quantificação da HIP.

5.4.2 Linearidade

A curva analítica foi construída traçando a área dos picos *versus* a curva em função da concentração, obtida a partir da média dos valores das áreas no comprimento de onda de 590 nm.

Foram construídas duas curvas, sendo a curva analítica de HIP em metanol (método I) e a curva em meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80 (método II), em que foram testados os seguintes pontos, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, como mostram as Figuras 18 e 19. Cada concentração do analito foi aplicada em triplicata.

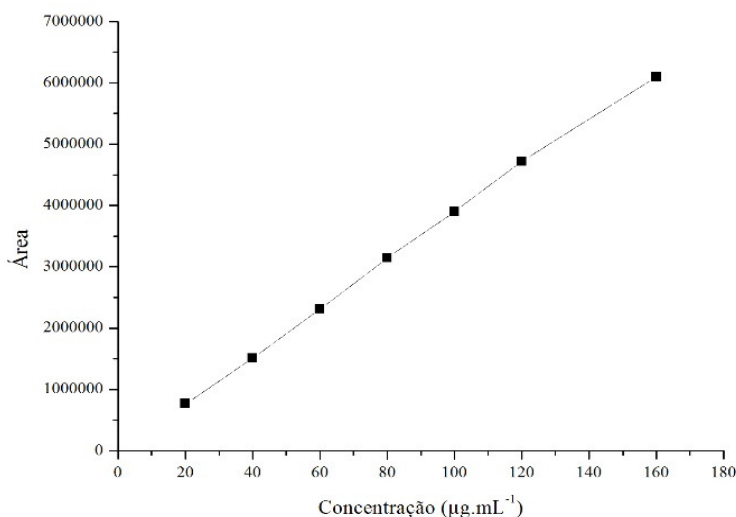


Figura 18. Representação gráfica da curva analítica do método I para quantificação de HIP por CLAE.
Fonte: Dados da pesquisa.

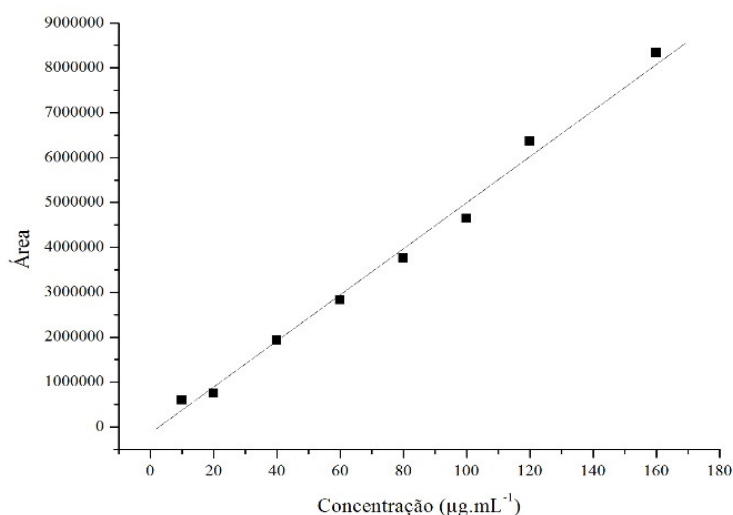


Figura 19. Representação gráfica da curva analítica do método II para quantificação de HIP por CLAE.
Fonte: Dados da pesquisa.

A avaliação da linearidade visa demonstrar se os resultados obtidos estão diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra dentro de um intervalo de concentrações definido (BRASIL, 2017). Na Figura 18 a equação da reta calculada e o coeficiente de correlação (r^2) foram: $y=38563x+10075$ e 0,999; e a Figura 19 apresentou $y=52508x-22398$ e 0,992; respectivamente.

De acordo com os resultados os métodos, I e II apresentaram linearidade nas faixas de concentrações entre 20-160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10-160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, uma vez que os dois métodos obtiveram o critério mínimo aceitável do r^2 condizente ao valor preconizado pela RDC N° 166, 24/07/2017 de 0,99 (BRASIL, 2017).

A partir da curva analítica de HIP os dados dos métodos, I e II foram analisados estatisticamente pela variância ANOVA (Tabelas 11 e 12, respectivamente) e a partir do teste estatístico foram obtidos os gráficos de dispersões de resíduos padrões (Figuras 20 e 21, respectivamente).

Tabela 11. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica I.

Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	F Tabelado	F calculado
Regressão	01	6,22E ⁺¹³	2997,02	2,24E ⁻²²
Resíduo	19	3,94E ⁺¹¹		
Total	20	6,25E ⁺¹³		

* Significativo para $p<0,05$

Tabela 12. Análise de variância ANOVA dos valores das áreas da curva analítica II.

Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	F Tabelado	Fcalculado
Regressão	01	1,53E ⁺¹⁴	2185,76	1,63E ⁻²³
Resíduo	22	1,54E ⁺¹²		
Total	23	1,55E ⁺¹⁴		

* Significativo para $p < 0,05$

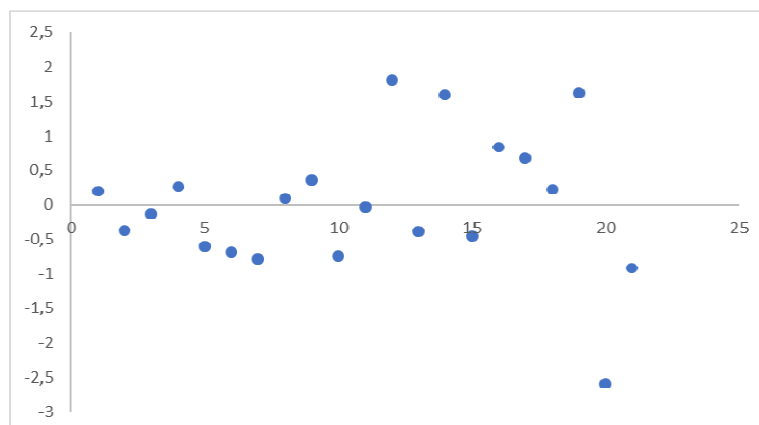


Figura 20. Gráfico de dispersão de resíduo padrão derivado da curva analítica I.
Fonte: Dados da pesquisa.

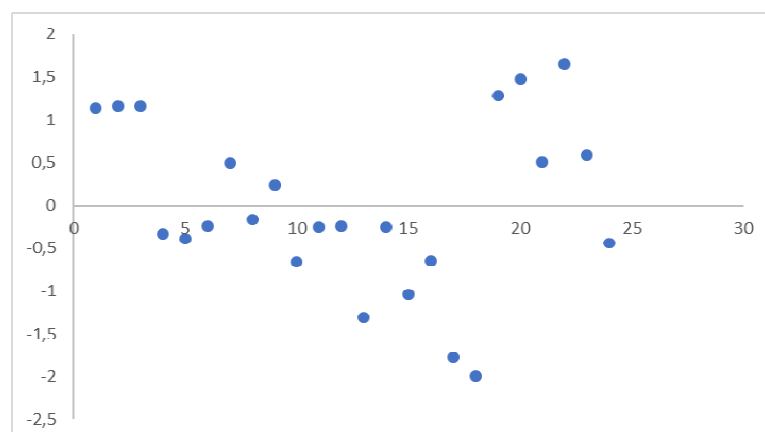


Figura 21. Gráfico de dispersão de resíduo padrão da curva analítica II.
Fonte: Dados da pesquisa.

Tais resultados indicaram uma regressão linear significativa entre as variáveis, uma vez que ambos os métodos apresentaram um valor de F calculado menor que de F tabelado e homocedasticidade, de modo os resíduos se mostraram distribuídos de forma homogênea, revelando-se adequados para a quantificação da HIP.

5.4.3 Precisão

A precisão intracorrida e a precisão intercorrida dos métodos I e II foram determinadas visando garantir que os resultados das injeções individuais se apresentem com precisão e coerência às injeções de uma série de padrões.

A precisão intracorrida mostra a repetibilidade do método, sendo analisada no mesmo dia, sob as mesmas condições de análise, analista e equipamento. A precisão intercorrida é a intermediária, em que analisa amostras em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2017).

Para ambos os métodos, as precisões foram realizadas a partir da solução estoque de HIP nas concentrações 20, 60 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As Tabelas, 13 e 14 exibem os valores obtidos pela precisão intracorrida dos métodos, I e II, respectivamente.

Tabela 13. Precisão intracorrida para quantificação de HIP por CLAE – método I.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	%D.P.R
20	861479,52	2,61
60	2274753,66	1,88
120	4902228,40	1,87

Abreviação: %D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

Tabela 14. Precisão intracorrida para quantificação de HIP por CLAE – método II.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	%D.P.R
20	764723,52	3,71
60	2863554,93	3,80
120	6209590,68	2,25

Abreviação: % D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

Os valores das precisões intercorridas dos métodos, I e II estão demonstrados nas Tabelas, 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15. Precisão intercorrida para quantificação de HIP por CLAE – método I.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	%D.P.R
20	711272,39	1,31
60	2548569,83	1,00
120	4790314,11	0,94

Abreviação: %D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

Tabela 16. Precisão intercorrida para quantificação de HIP por CLAE – método II.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	%D.P.R
20	737643,09	1,06
60	2861418,70	4,63
120	6404124,51	1,61

Abreviação: %D.P.R, percentual de desvio padrão relativo.

Os %D.P.R resultantes da determinação da precisão intracorrida e de intercorridos métodos, I e II foram menores que o percentual preconizado pelas diretrizes (ICH, 2005; BRASIL, 2017); portanto os métodos desenvolvidos foram precisos.

5.4.4 Exatidão/Recuperação

A exatidão é analisada para garantir a proximidade dos resultados obtidos no método analítico em relação ao valor teórico real. Os resultados dos métodos, I e II se encontram nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17. Percentual de exatidão obtido entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de HIP – método I.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%Exatidão
20	18,88	94,39
60	56,89	94,82
120	119,44	99,54

Tabela 18. Percentual de exatidão obtido entre as concentrações teóricas e experimentais das soluções de HIP – método II.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%Exatidão
20	19,94	99,72
60	57,51	95,85
120	124,35	103,63

Os valores de exatidão obtidos nos métodos, I e II se encontram próximos a 100%, estando dentro da faixa de trabalho que permite variações entre 80-120% (ANVISA, 2017), demonstrando que ambas as metodologias analíticas desenvolvidas se foram aceitáveis para a quantificação da HIP.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

5.4.5 Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade é um parâmetro relevante, pois avalia uma substância em presença de outros componentes, de modo que não apresente interferência no resultado da análise.

As amostras analisadas foram: HIP I (HIP em metanol), HIP II (HIP em meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80), HIP e CLN_HIP-HG1 extraídos por metanol no ensaio de retenção vaginal, fase móvel (acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio 10 mM (pH 5,05)); como mostra a Figura 22.

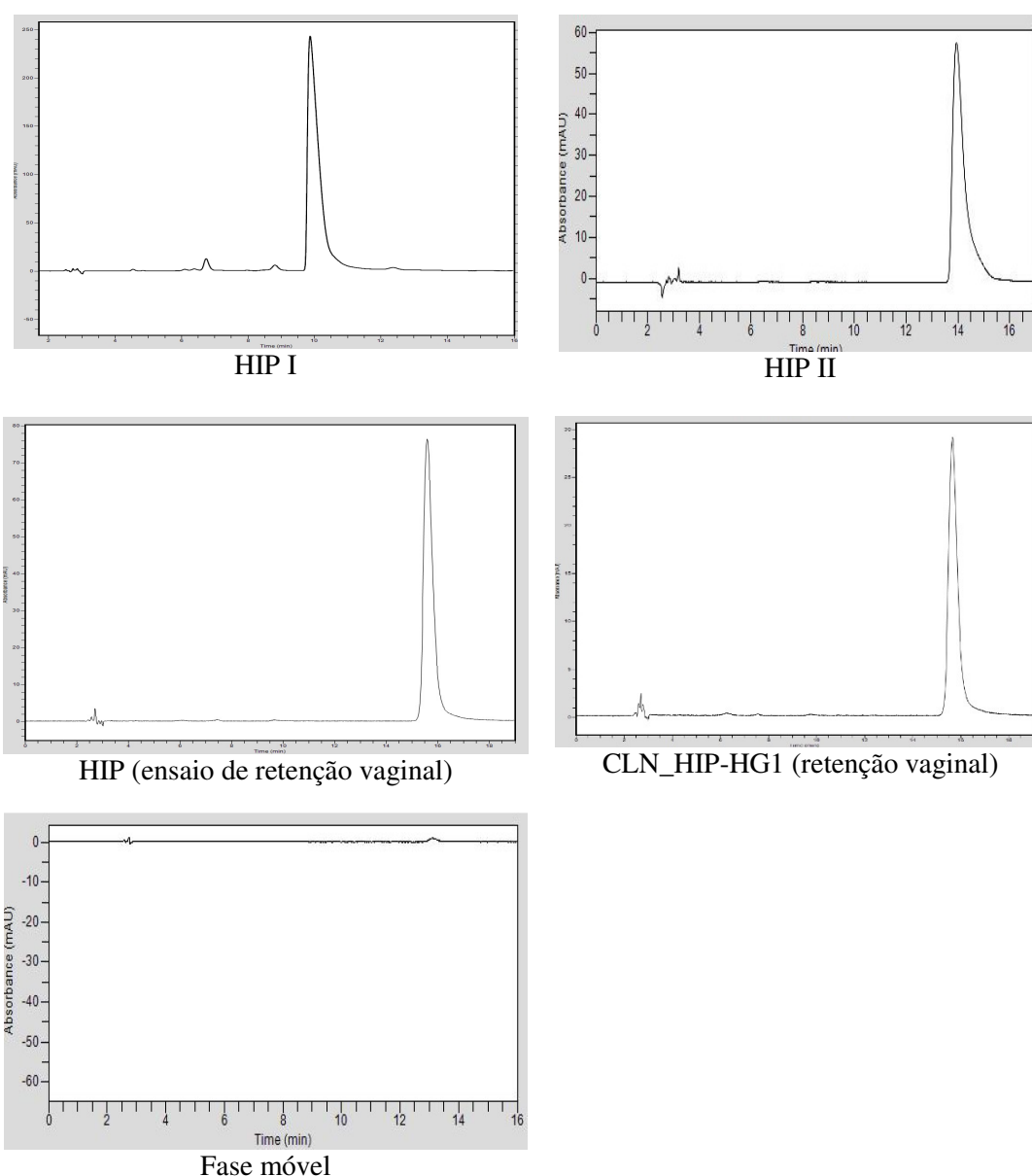


Figura 22. Cromatogramas dos sobrenadantes das diferentes amostras.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com os cromatogramas (Figura 22) os componentes utilizados para a obtenção dos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG ora no método I, ora no método II, suas respectivas soluções receptoras, a fase móvel e a solução extratora utilizada no ensaio de retenção vaginal, não apresentaram picos de absorção na região do UV-Vis que interferissem na quantificação da HIP; garantindo as especificidades dos métodos desenvolvidos.

5.4.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ) calculados a partir do método I foram de $2,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto o método II apresentou valores de $1,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Tais valores demonstraram que os métodos, I e II desenvolvidos foram capazes de detectar e quantificar baixas concentrações de HIP.

5.4.7 Robustez

As alterações nos parâmetros analíticos foram realizadas na concentração média de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$: comprimento de onda de 589 e 591 nm, fluxo da fase móvel 0,90 e 0,95 mL/min., concentração da fase móvel acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio nas proporções 53:37:10 e 55:35:10 e fase móvel em pH 5,04 e pH 5,06, as quais estão demonstradas na Tabela 19.

Tabela 19. Alterações para a avaliação da robustez – método I.

Parâmetro alterado	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%Recuperação
λ de detecção 589 nm	60	62,84	104,73
λ de detecção 591 nm	60	66,54	111,90
Fluxo da FM 0,95mL/min	60	64,65	107,75
Fluxo da FM 0,90mL/min	60	66,85	111,42
FM 53:37:10 (ACN:MET:Tampão)	60	57,54	95,90
FM 55:35:10 (ACN:MET:Tampão)	60	55,58	92,64
pH 5,04	60	60,81	101,34
pH 5,06	60	64,04	106,74

A Tabela 19 mostra que os valores de robustez avaliados se encontram dentro da faixa de trabalho, de 80% a 120% preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2017), de modo que nenhuma das alterações realizadas comprometeram o método I ao ponto de alterar o resultado da análise.

Neste contexto, outro parâmetro relevante investigado foi à estabilidade das soluções analíticas, cujo seus valores estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Estabilidade da solução analítica analisada por 96h – método I.

Tempo (h)	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperação
96	60	66,48	110,80
72	60	58,71	97,85
48	60	63,01	105,02
24	60	60,20	100,33

Os resultados (Tabela 20) demonstraram que as soluções analisadas durante 24, 48, 72 e 96h possuem estabilidade e que o método I, possivelmente não sofreu alterações significativas relacionadas à degradação química da HIP; mostrando-se adequado para a quantificação da HIP.

5.5 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de HIP

5.5.1 Estudo de solubilidade da HIP

O estudo da solubilidade da HIP na solução receptora constituída de meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80, foi realizado para garantir a condição *sink* do experimento. A análise cromatográfica demonstrou que a solubilidade da HIP em meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80 foi de $2124,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Esse resultado revelou que a solução receptora foi capaz de solubilizar o composto ativo incorporado na formulação em uma concentração maior que sua saturação, podendo então, ser utilizada com precisão nos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*.

5.5.2 Perfil de liberação *in vitro* de HIP

Os perfis de liberação *in vitro* da HIP livre e do sistema CLN_HIP-HG1 estão demonstrados na Figura 23.

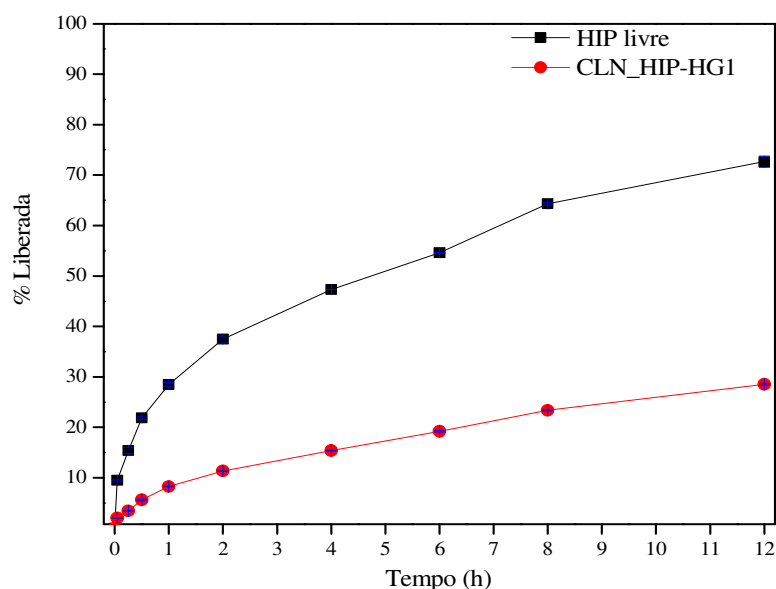


Figura 23. Perfil de liberação *in vitro* da HIP livre e do CLN_HIP-HG1.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados demonstraram que após 1h de ensaio a HIP livre difundiu 28,5% atingindo 72,7% após 12h, enquanto a taxa de liberação da HIP a partir do sistema CLN_HIP-HG1 foi de 8,3% após 1h, atingindo 28,5% após 12h.

O comportamento de liberação da HIP livre e encapsulada no CLN disperso em HG pode ter sido influenciado por fatores como a composição do sistema considerando a utilização de diferentes componentes lipídicos para a obtenção do CLN, bem como a concentração e a afinidade do composto ativo pelo sistema (BADEA *et al.*, 2015).

No entanto, os resultados podem ser vantajosos considerando a administração vaginal de fármacos/compostos ativos com propriedades mucoadesivas, na qual a HIP está dispersa homogeneamente na matriz polimérica do HG, sendo liberada de forma lenta e sustentada a partir do CLN e do HG no ambiente vaginal, em longo prazo; uma vez que tende a possibilitar uma redução considerada na frequência de aplicação do sistema via vaginal.

A partir da curva de liberação *in vitro* da HIP a partir do sistema CLN_HIP-HG1, foi possível determinar usando modelos matemáticos adequados, os mecanismos de liberação envolvidos no controle da liberação do fármaco.

Os modelos Weibull, Baker & Lonsdale, Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi e Primeira Ordem mostram equações que traduzem matematicamente a curva obtida em função de parâmetros relacionados à forma farmacêutica. A Tabela 21 mostra os modelos matemáticos que foram aplicados ao perfil de liberação.

Tabela 21. Modelos matemáticos aplicados para a análise cinética de liberação.

Modelo matemático	Equação	r^2
Weibull	$m = 1 - e^{-(t-t_i)^b/\alpha}$	0,9956
Baker & Lonsdale	$2/3[1 - (1 - (F/100))^{2/3}] - (F/100) = k_{BL} t$	0,9978
Peppas	$F = k_p t^n$	0,9991
Hixon & Crowell	$F = 100 * (1 - (1 - k * t)^3)$	0,9280
Higuchi	$F = k_H \sqrt{t + b}$	0,9988
Primeira ordem	$F = 100(1 - e^{k_1 t})$	0,9353

Abreviação: m, quantidade de fármaco liberada no tempo; t_i , intervalo de tempo antes do início do processo de liberação; α , parâmetro escala; b , parâmetro de forma; F, quantidade de fármaco liberado no tempo t ; k_{BL} , k_p , k_H e k_1 , constantes da taxa de liberação para diferentes equações; n e b , expoentes de liberação do fármaco.

O critério usado para escolha do modelo mais apropriado foi o valor do coeficiente estatístico de determinação (r^2). Os resultados dos modelos matemáticos utilizados na análise de cinética de liberação (Tabela 21) mostraram que o sistema CLN_HIP-HG1 segue o modelo proposto por Peppas, uma vez que o valor de r^2 foi de 0,9991.

Conforme descrito no modelo de Peppas para amostras com geometria filme, o mecanismo de liberação do fármaco para a solução receptora é determinado pelo valor do expoente n . Valor do expoente n da equação de Peppas, menor que 0,5 indica que o principal mecanismo de liberação da HIP a partir do sistema é a difusão Fickiana (OSHIRO-JUNIOR *et al.*, 2017). Valores entre 0,5 e 1,0 a liberação é regida por transporte anômalo, e valores de n maiores que 1,0 correspondem à liberação de transporte de caso II (KORSMEYER *et al.*, 1983).

O valor de n resultante da HIP em CLN_HIP-HG1 foi $0,5192 \pm 0,01$ sendo assim, o valor do expoente n foi maior do que 0,5, onde o intumescimento e a difusão

Fickiana são os principais mecanismos envolvidos na liberação do fármaco (transporte anômalo).

Contudo, a equação de Peppas foi desenvolvida para sistemas poliméricos, apresentando assim, limitações na interpretação dos resultados de mecanismos de liberação de fármaco, uma vez que o sistema analisado se apresenta diferente aos utilizados na elaboração das equações dos modelos matemáticos (LAO *et al.*, 2011).

Deste modo, pode-se sugerir que além do modelo de Peppas, CLN_HIP-HG1 pode ser condizente ao modelo matemático proposto por Higuchi, por apresentar elevados valores de r^2 de 0,9988, indicando que o mecanismo de liberação do fármaco pela matriz pode ser realizado por meio de difusão controlada.

5.5.3 Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da HIP

No ensaio de permeação *in vitro*, a HIP livre e o sistema CLN_HIP-HG1 não apresentaram permeação da mucosa vaginal suínanos tempos analisados, uma vez que a HIP não foi detectada nem quantificada por CLAE nos tempos analisados.

Em relação ao ensaio de retenção *in vitro*, após 12h de experimento, observou-se que as mucosas vaginais referentes à HIP livre e CLN_HIP-HG1 apresentavam coloração escura avermelhada pertencente à HIP. No entanto, após 12h de experimento as porcentagens de HIP e de CLN_HIP-HG1 retidas foram baixas, como apresentado na Tabela 22.

Tabela 22. Retenção vaginal de HIP e de CLN_HIP-HG1.

Amostra	HIP retida na mucosa vaginal (%) Média±D.P
HIP	11,88±2,30
CLN_HIP-HG1	6,14±0,93

Os baixos valores de retenção provavelmente se devem ao tempo do experimento (12h), o qual pode não ter sido suficiente para liberar o composto ativo. No entanto, o resultado pode ser favorável para administração vaginal local, de modo que se a *Candida* estiver aderida nas células epiteliais presentes na superfície da mucosa, o composto ativo (HIP) será capaz de atuar no local, não havendo, portanto, a necessidade de uma retenção vaginal.

5.6 Ensaios antifúngicos *in vitro*

5.6.1 Concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima

Os resultados de CIM da HIP, F6.5, F6.5_0,05, CLN_HIP-HG1 e dos controles positivos anfotericina B e fluconazol, contra a cepa de *C. albicans* ATCC 10231, estão representados na Tabela 23.

Tabela 23. Atividade antifúngica contra a cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
Cepa de <i>C. albicans</i>	HIP	F6.5	F6.5_0,05	CLN_HIP-HG1	anfotericina B	fluconazol
ATCC 10231	50	-----	50	50	0,0019	0,06

Conforme a Tabela 23, o CLN sem HIP encapsulada (F6.5) não apresentou atividade contra *C. albicans*. Contudo, a HIP e os CLN com HIP encapsulada disperso em HG (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1, respectivamente), apresentaram atividades antifúngicas frente à cepa analisada, em que os valores de CIM foram de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos os sistemas.

Pode-se constatar que o resultado obtido foi promissor, uma vez que a HIP (hidrofóbica e de baixa solubilidade) apresenta baixo índice terapêutico, no entanto, quando encapsulada no CLN, sua atividade terapêutica frente à *C. albicans* foi mantida, indicando que o sistema não interferiu e/ou modificou a atividade do FS.

Os fármacos antifúngicos anfotericina B e fluconazol foram escolhidos neste ensaio como controles positivos, por serem comumente aplicados na terapêutica clínica de doenças oportunistas como a CVV, em que revelaram excelente ação antifúngica frente à cepa de *C. albicans* com valores de CIM de 0,0019 e $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Após o ensaio de CIM, retirou-se uma alíquota de cada poço da microplaca de 96 poços para determinar o CFM, como mostra a Figura 24.

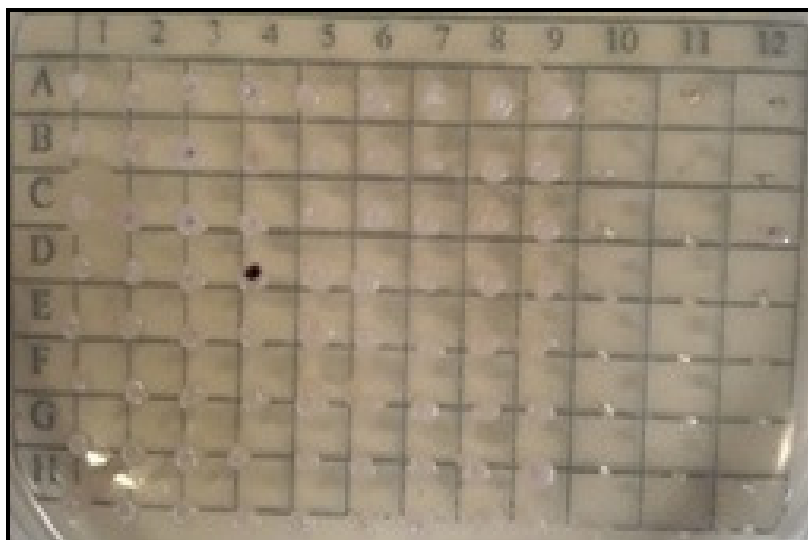


Figura 24. Crescimento das colônias de *C. albicans* ATCC 10231 após 48h de incubação.
Fonte: Autora (2020).

Na Figura 24 foi possível observar que houve crescimento das colônias de *C. Albicans* ATCC 10231 em todas as concentrações testadas ($>200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O resultado constata o comportamento fungistático da HIP encapsulada no CLN, frente à cepa de *C. albicans* ATCC 10231, uma vez que se observou o desenvolvimento do crescimento fúngico, sem ocasionar a morte do microrganismo.

5.7 Ensaios biológicos *in vitro* associados à terapia fotodinâmica

5.7.1 Eficácia da TFD contra culturas planctônicas

Os ensaios biológicos *in vitro* no escuro, e associados à TFD foram empregados nos seguintes grupos: controles negativos (YNB, PBS e DMSO 20%), FS (HIP), CLN sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG (F6.5, HG e CLN-HG), CLN com HIP encapsulada dispersos ou não em HG (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) e controles positivos (RB_2,5 e RB_5) (Tabela 5, Seção 4.2.9.2). Os controles negativos YNB e PBS foram utilizados como comparativos dos resultados.

Os valores médios e DP do número de Log_{10} (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* analisadas no escuro e tratadas com TFD pelos sistemas e controles, estão apresentados na Figura 25.

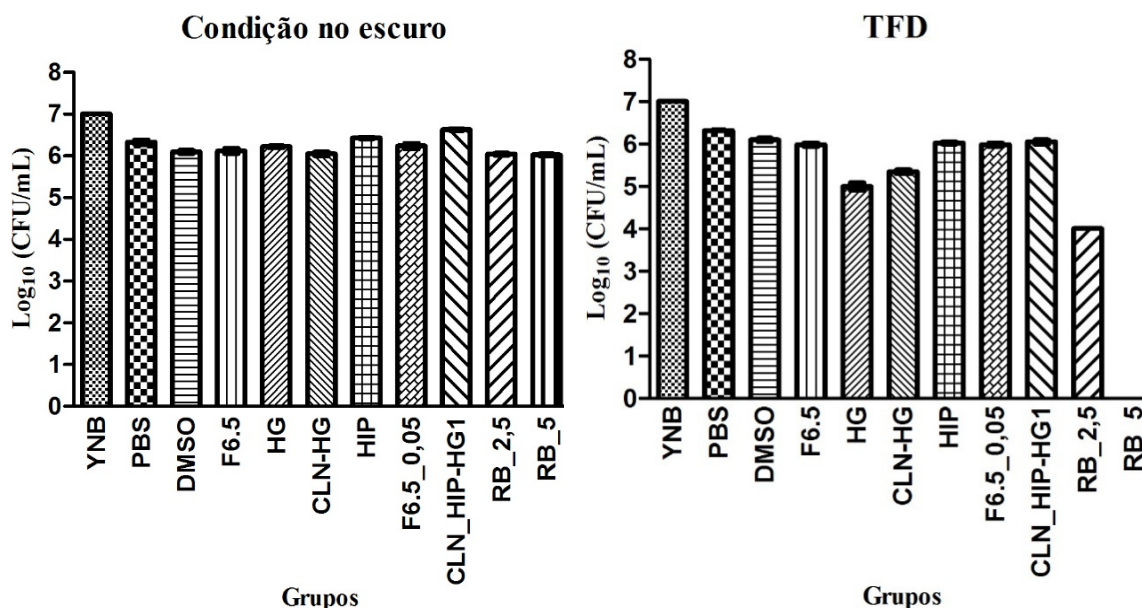


Figura 25. Valores médios e DP do Log₁₀ (UFC/mL) de culturas planctônicas de *C. albicans* analisadas no escuro e tratadas com TFD, mediados pelos diferentes grupos.

Fonte: Dados da pesquisa.

O efeito da exposição de culturas planctônicas de *C. albicans* no escuro foi avaliado, como mostra com a Figura 25. A condição no escuro mediada pelos FS, HIP, RB_2,5 e RB_5, e pelos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG, apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) de log₁₀ (UFC/mL), com reduções na viabilidade de *C. albicans* que variaram de aproximadamente 0,3 a 1 log₁₀ (UFC/mL), em relação ao grupo controle negativo YNB.

A eficácia da TFD frente às culturas planctônicas de *C. albicans* alcançou resultados satisfatórios, de modo que os grupos relacionados à HIP e aos CLN com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG, apresentaram alterações significativas com diminuições que variaram aproximadamente de 1 a 2 log₁₀ (UFC/mL), comparadas ao controle negativo YNB, e cerca de 0,3 a 1,3 log₁₀ (UFC/mL) em relação ao PBS (Figura 25), quando irradiados por luz LED.

Em relação à TFD mediada pela solução RB_2,5 a redução foi de 3 log₁₀ (UFC/mL) comparada ao grupo controle YNB e de 2,3 log₁₀ (UFC/mL) ao PBS; enquanto a RB_5 erradicou as culturas planctônicas de *C. albicans* através da TFD. Tais resultados foram superiores aos apresentados por Costa *et al.* (2012) em que à TFD mediada por RB a uma concentração de 10 µM apresentou um valor médio de redução na viabilidade de culturas planctônicas de *C. albicans* ATCC 18804 de 1,9 log₁₀ (UFC/mL). No estudo de Alves *et al.* (2018) a solução de RB a uma concentração de 5

μM ocasionou uma redução significativa de culturas planctônicas de *C. albicans* ATCC 90028 em cerca de $5,3 \log_{10}$ (UFC/mL).

Embora o mecanismo de atividade biológica da HIP ainda não esteja elucidado, sugere-se que os danos oxidativos ocasionaram as reduções na viabilidade do microrganismo, bem como a inativação das culturas planctônicas de *C. albicans*, que podem ser justificados pelos mecanismos fotodinâmicos dos FS (predominantemente reação do Tipo II) (PERUSSI, 2007; KARIOTI; BILIA, 2010).

Assim, nossos resultados demonstram que a aplicação da TFD nas soluções de HIP e de RB, bem como nos CLN com HIP encapsulada dispersos em HG podem favorecer a entrega de FS hidrofóbicos, como a HIP no ambiente vaginal.

5.7.2 Eficácia da TFD contra biofilmes

Os biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 analisados no escuro (5min) e na TFD (luz: LED branca, 113 J.cm^{-2}), por 5min foram tratados pelos seguintes grupos: controles negativos (YNB, PBS e DMSO 20%), FS (HIP), CLN sem HIP (F6.5, HG e CLN-HG), CLN com HIP dispersos ou não em HG (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) e controles positivos (RB_5 e RB_10) (Tabela 6, Seção 4.2.9.3). Os resultados foram comparados aos controles negativos YNB e PBS.

Os valores médios e DP do número de $\log_{10}$ (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* analisados no escuro e tratados com TFD pelos sistemas e controles estão representados na Figura 26.

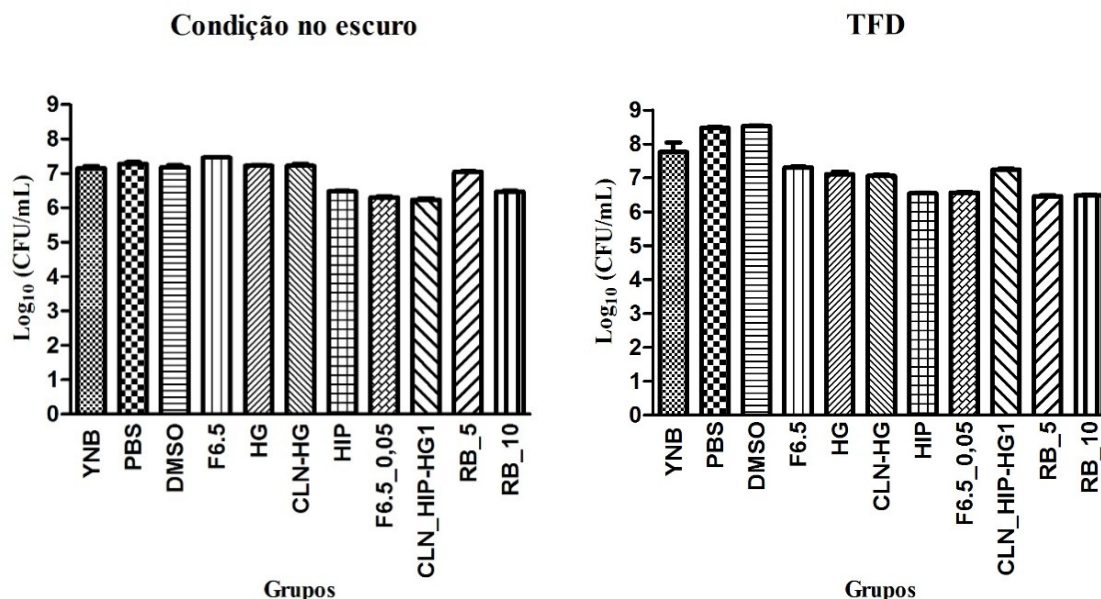


Figura 26. Valores médios e DP do Log₁₀ (UFC/mL) de biofilmes de *C. albicans* analisados no escuro e tratados com TFD, mediados pelos diferentes grupos.

Fonte: Dados da pesquisa.

A exposição dos biofilmes de *C. albicans* ao escuro mediado por soluções de HIP e de RB, dos sistemas sem HIP (CLN, HG e CLN-HG) e dos CLN com HIP dispersos ou não em HG (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1), apresentaram reduções na viabilidade do microrganismo que variaram de aproximadamente 0,05 a 1 log₁₀ (UFC/mL), em relação ao grupo controle negativo PBS.

Conforme observado na Figura 26, a aplicação da luz LED nas soluções de RB_5 e RB_10 reduziram significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade do microrganismo em aproximadamente 1,3 log₁₀ cada, comparados ao YNB e cerca de 2 log₁₀ cada, em relação ao grupo controle negativo PBS.

Os sistemas F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1 tiveram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 1,2 e 0,5 log₁₀ (UFC/mL), respectivamente, comparado ao grupo YNB, enquanto, ao grupo PBS a viabilidade do microrganismo reduziu-se para aproximadamente 2 e 1,2 log₁₀, respectivamente.

A matriz extracelular do biofilme que envolve as células microbianas pode atuar como uma barreira física (RAMAGE *et al.*, 2012). Considerando ser um estudo inicial em que o efeito da TFD mediada pelos CLN com e sem HIP dispersos ou não em HG, foi avaliada frente a biofilmes de *C. albicans*, tais sistemas foram capazes de superar a matrix extracelular do biofilme, uma vez que a eficácia da TFD contra biofilmes de *C.*

albicans foi revelada principalmente para a solução de HIP e de RB, além dos sistemas F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1.

O aumento da permeabilidade da membrana fúngica induzida pela afinidade entre os sistemas e as células fúngicas (RAMOS *et al.*, 2016), podem justificar nossos resultados, por promover aumento no tempo e na capacidade dos FS atuarem no biofilme, em que provavelmente a adição dos sistemas, favoreceu o efeito antifúngico dos FS testados (HIP e RB).

5.8 Produção de oxigênio singlete

A produção de oxigênio singlete está estritamente relacionada à aplicação da TFD, por conseguir danificar componentes celulares biológicos. A solução padrão, SOSG foi medida indiretamente para estimar a produção de oxigênio singlete da HIP.

Os sistemas sem o composto ativo (F6.5, HG e CLN-HG), a solução de HIP (0,05 mg.mL⁻¹) e os CLN com HIP dispersos ou não em HG (0,05 mg.mL⁻¹) (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) foram submetidos ao escuro e à TFD (luz: LED branca, 113 J.cm⁻²) para medir indiretamente o SOSG, em metanol a 2,5 µM.

As curvas de aumento percentual da intensidade de fluorescência do SOSG dos sistemas com e sem HIP encapsulada dispersos ou não em HG estão representadas na Figura 27.

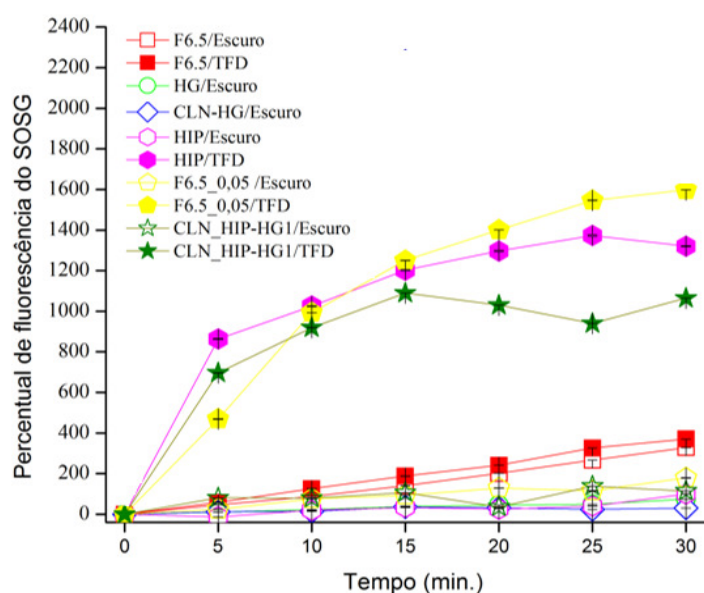


Figura 27. Curvas de aumento percentual da fluorescência do SOSG para as amostras submetidas ao escuro e a TFD *versus* tempo em minutos.

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme a Figura 27, os CLN com HIP encapsulada dispersos ou não em HG (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1) e a solução de HIP, analisados pela TFD apresentaram um percentual de fluorescência do SOSG maior que as condições no escuro.

Os valores médios dos sistemas F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1 analisados no escuro, variaram de $24,5 \pm 0,44$ a $179 \pm 1,02$ e de $80,5 \pm 0,08$ a $114,5 \pm 0,01$, respectivamente, entre os tempos de 5 a 30min.

As medidas indiretas das amostras contendo HIP, ora em solução, ora encapsulada nos sistemas (F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1), submetidas à TFD, apresentaram maiores valores de percentual de fluorescência do SOSG que as análises no escuro. No tempo de 5 a 30min., as amostras HIP, F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1 foram de $863,4 \pm 1,97$ para $1320,6 \pm 2,37$, de $468,9 \pm 1,03$ para $1598 \pm 0,17$, e de $696,5 \pm 0,41$ para $1064,5 \pm 0,22$, respectivamente.

Podemos sugerir que a solução de HIP, bem como os CLN com HIP encapsulada dispersos em HG forneceram efetivamente oxigênio à solução de metanol, para a produção de oxigênio singlete quando ativados pela luz LED. Tais resultados podem decorrer das atividades dos pigmentos fotossensibilizantes da HIP, a qual apresenta um sistema cromóforo da classe química das fenantroperileno quinonas (BORGHI-PANGONI *et al.*, 2017).

5.9 Ensaios antifúngicos *in vivo* associados ou não à terapia fotodinâmica

Ensaios terapêuticos de CVV em modelo animal possibilitam analisar o comportamento de novos compostos antifúngicos de maneira segura e eficaz, por se tratar de um organismo vivo. Assim, o ensaio antifúngico foi realizado para avaliar os efeitos e a aplicabilidade da TFD mediada pelo FS, HIP livre e encapsulado no CLN disperso em HG, para o tratamento de infecções fúngicas *in vivo* de CVV.

A levedura faz parte da microbiota natural dos seres humanos, encontrada na mucosa, pele ou trato gastrointestinal; entretanto, as espécies de *Candida* não pertencem ao organismo do camundongo. Por isso, foi necessário criar nos camundongos fêmeas condições hormonais adequadas ao estado patológico que possibilite a proliferação de *C. albicans* (CASSONE *et al.*, 2016)

Para isto, cada camundongo fêmea foi induzido ao ciclo estral, ou seja, ao estado pseudo-estro (falso cio), por administrações subcutâneas de β -estradiol-17-valerato. A Figura 28 refere-se ao lavado vaginal de um camundongo fêmea, em aumento de 40x.

.....*Mariana Rillo Sato*.....

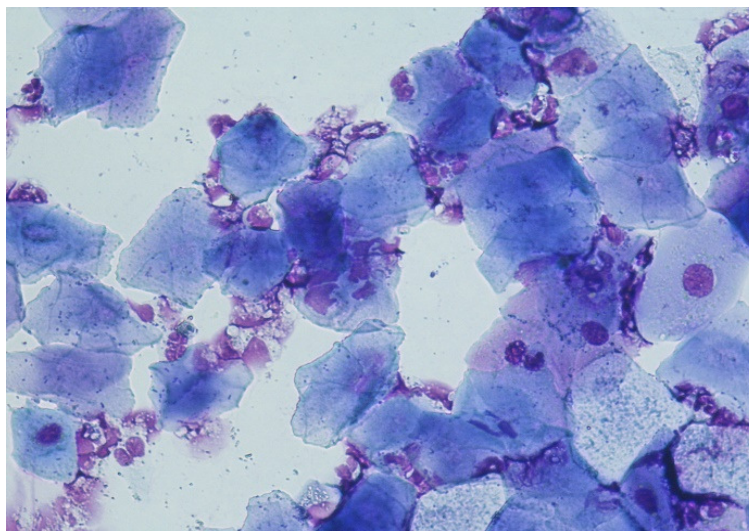


Figura 28. Células do epitélio vaginal dos camundongos fêmeas. Aumento de 40x.
Fonte: Autora (2020).

O estado pseudo-estro dos camundongos fêmeas foi confirmado com a microscopia do lavado vaginal (Figura 28), sendo possível observar a predominância de células cornificadas e anucleadas.

Uma vez induzido o falso cio, os animais foram infectados com *C. albicans* ATCC 10231 ($2,5 \times 10^8$ células/mL). A Figura 29 apresenta a imagem do lavado vaginal de um dos camundongos fêmeas infectadas com CVV.

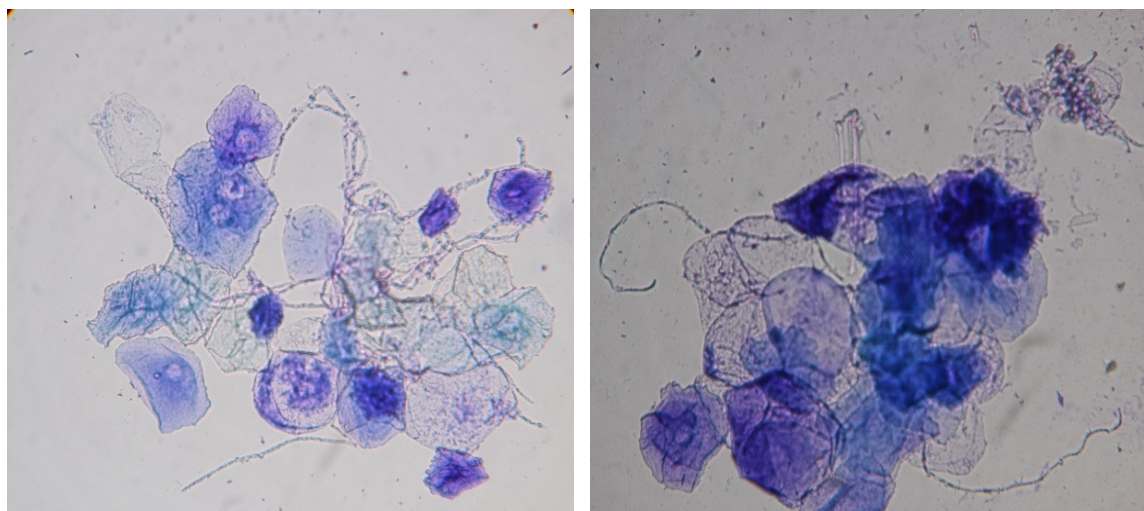


Figura 29. Imagens de lavados vaginais com presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas, corados por meio da coloração de *Giemsa*. Aumento de 40x.
Fonte: Autora (2020).

Mediante a Figura 29 observamos que o processo de infecção fúngica foi bem estabelecido após administração intravaginal da suspensão de *C. albicans* ($2,5 \times 10^8$ células/mL) nos animais em estado pseudo-estro, visto que a forma filamentosa

.....*Mariana Rillo Sato*.....

denominada hifa, é tida como o maior fator de virulência de *C. albicans* (MIRÓ *et al.*, 2017).

Em dias alternados as etapas de inoculação fúngica e lavagem vaginal, foram realizados os tratamentos. Os lavados vaginais dos grupos controles G2 (infectado), G3 (antifúngico), G4 (F6.5), G5 (HG), G6 (CLN-HG), G10 (DMSO), foram analisados microscopicamente na etapa final do experimento como apresentados na Figura 30.

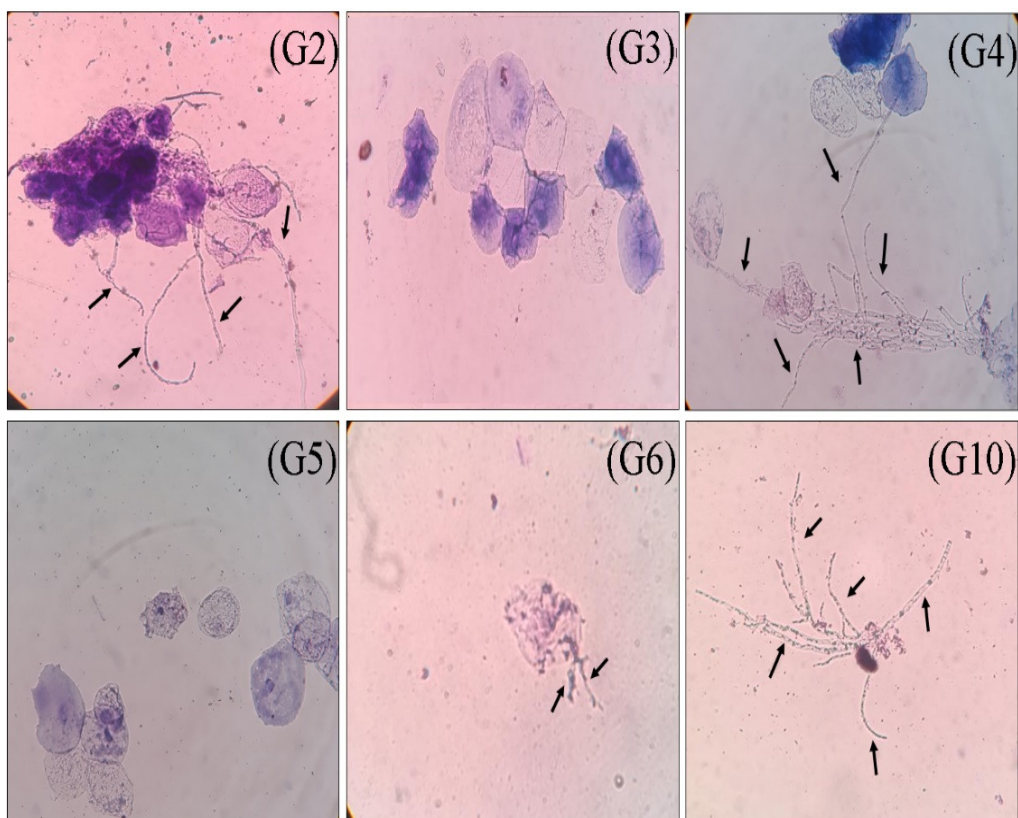


Figura 30. Lavados vaginais dos grupos controles com presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas oito dias após a infecção fúngica. Aumento de 40x.

Abreviação: Grupos: G2, infectado; G3, antifúngico; G4, F6.5; G5, HG; G6, CLN-HG e G10, DMSO.

Fonte: Autora (2020).

Do mesmo modo, os lavados vaginais dos grupos tratados com sistemas, G7 (HIP), G8 (F6.5_0,05) e G9 (CLN_HIP-HG1), e dos sistemas mediados por TFD G7L (HIP/TFD), G8L (F6.5_0,05/TFD) e G9L (CLN_HIP-HG1/TFD), se encontram na Figura 31.

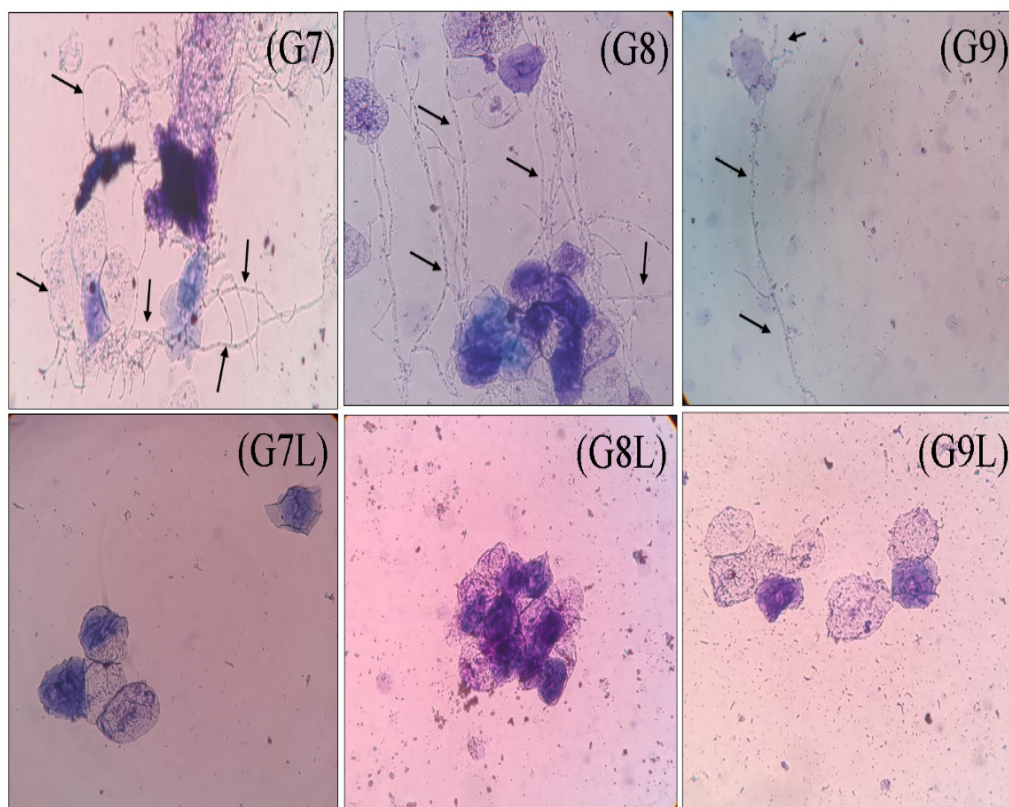


Figura 31. Lavados vaginais dos grupos tratados com sistemas na presença de células fúngicas de CVV em camundongos fêmeas oito dias após a infecção fúngica. Aumento de 40x.

Abreviação: Grupos: G7, HIP; G8, F6.5_0,05; G9, CLN_HIP-HG1; G7L, HIP/TFD; G8L, F6.5_0,05/TFD; e G9L, CLN_HIP-HG1/TFD.

Fonte: Autora (2020).

De acordo com as Figuras 30 e 31, os animais pertencentes aos grupos G2 (infetado), G4 (F6.5), G5 (HG), G6 (CLN-HG), G10 (DMSO), G7 (HIP), G8 (F6.5_0,05) e G9 (CLN_HIP-HG1) apresentaram no 8º dia de infecção fúngica uma predominância de células fúngicas leveduriformes/ou hifas (indicadas pelas setas) em meio às células epiteliais cornificadas e anucleadas, enquanto o grupo G3 (antifúngico) e os grupos TFD, G7L (HIP/TFD), G8L (F6.5_0,05/TFD) e G9L (CLN_HIP-HG1/TFD) revelaram uma predominância de células fúngicas leveduriformes de diferentes tamanhos em meio às células epiteliais cornificadas e anucleadas.

Durante os 8 dias de experimento, os animais foram tratados por 4 dias e a cada 2 dias, os fluidos vaginais foram coletados e plaqueados. Após 48h, analisou-se o crescimento das colônias nas placas que foram transformados em Log₁₀ (UFC), como mostra a Figura 32.

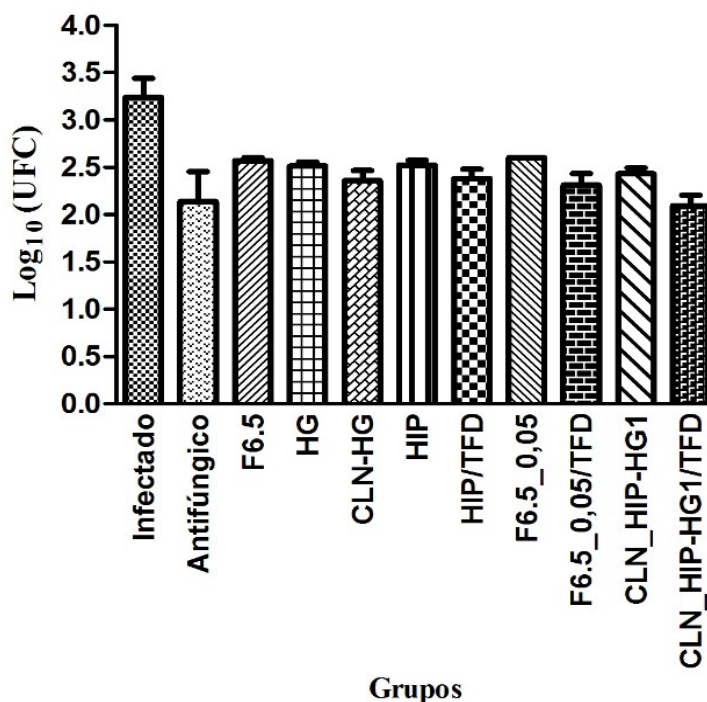


Figura 32. Valores médios e DP dos números de leveduras em Log₁₀ (UFC) dos grupos controles e de tratamento no escuro e mediado pela TFD.

Fonte: Dados da pesquisa.

A ação terapêutica de CVV dos camundongos fêmeas infectadas e tratadas com os CLN com e sem HIP encapsulada disperso ou não em HG, foi avaliada no escuro e mediante a TFD (luz LED branca, 113 J.cm⁻²), por 5min.

De acordo com a Figura 32, observa-se que todos os animais se mantiveram infectados com a inoculação fúngica de *C. albicans*, até o final do experimento. O grupo antifúngico apresentou reduções significativas das cargas fúngicas ($p < 0,05$) entre os dias 2 e 8 após a infecção, que variaram de aproximadamente de 1,1 a 1,5 log₁₀ (UFC), respectivamente, comparado ao grupo infectado. Entre os grupos controles de sistema sem HIP, os sistemas F6.5 e HG apresentaram valores de UFC semelhantes entre o 2º e o 8º dia de infecção com reduções significativas ($p < 0,05$) das cargas fúngicas que variaram aproximadamente de 1 a 0,1 log₁₀ (UFC), respectivamente, em relação ao grupo infectado.

Os grupos de animais tratados com HIP e com CLN contendo HIP, F6.5_0,05 apresentaram valores de UFC semelhantes, com reduções das cargas fúngicas que variaram cerca de 1 a 0,1 log₁₀ (UFC) entre os dias 2 e 8 após a infecção, respectivamente, comparados ao grupo infectado. Quando este sistema foi disperso em HG (CLN_HIP-HG1), as reduções das cargas fúngicas variaram significativamente

($p < 0,05$) de aproximadamente 1 a 0,4 $\log_{10}$ (UFC) entre o 2º e o 8º dia de infecção, respectivamente, em relação ao grupo infectado.

Quando o tratamento foi associado à TFD, HIP/TFD reduziu significativamente as cargas fúngicas ($p < 0,05$) entre os dias 2 e 8 após a infecção, variando aproximadamente de 1,2 a 0,2 $\log_{10}$ (UFC), respectivamente, comparada ao grupo infectado. Enquanto F6.5_HIP/TFD apresentou reduções significativas ($p < 0,05$) entre o 2º e o 8º dia de infecção variando cerca de 1,2 a 0,6 $\log_{10}$ (UFC), respectivamente, comparado ao grupo infectado.

Entre os grupos tratados pelos sistemas, a eficácia da TFD *in vivo* foi revelada principalmente para CLN_HIP-HG1/TFD. Nota-se na Figura 32, uma maior tendência de melhora do perfil terapêutico deste grupo em relação ao infectado, com reduções significativas das cargas fúngicas ($p < 0,05$) que variaram de aproximadamente 1,2 a 0,8 $\log_{10}$ (UFC) entre o 2º e o 8º dia de infecção, respectivamente.

Ainda que nenhum grupo animal tenha apresentado perfil de cura nestes dias de tratamentos mediados ou não à TFD, os resultados indicaram que o creme antifúngico e os sistemas mediados pela TFD especialmente CLN_HIP-HG1/TFD, foram eficazes contra o patógeno.

No estudo de Ramos *et al.* (2016) a encapsulação do extrato *Syngonanthus nitens* (Bong.) Rhulland em sistema líquido cristalino foi avaliada em ratos fêmeas Wistar, a qual demonstrou eficácia no tratamento da CVV com *C. albicans* a partir do 2º dia de tratamento, sendo mais eficaz que a anfotericina B.

O ensaio terapêutico *in vivo* de Rodero *et al.* (2018) em linhagem de camundongo C57BL/6, revelou que a curcumina encapsulada em sistema líquido cristalino denominado F13-CUR, inibiu o crescimento de *C. albicans* a partir do 4º dia de tratamento.

O tratamento com o FS, HIP especialmente quando encapsulada no CLN disperso em HG, apresentou resultados motivadores frente às culturas planctônicas e de biofilmes de *C. albicans*, além de promissores resultados de efeitos antifúngicos em modelo animal (linhagem de camundongo C57BL/6). Possivelmente, a HIP foi capaz de gerar oxigênio singlete e induzir a formação de espécies reativas quando irradiada pelo LED.

Assim, a aplicação da TFD em CLN dispersos em HG para infecções induzidas por *C. albicans*, pode ser considerada uma satisfatória abordagem terapêutica para

controlar infecções fúngicas como a CVV no canal vaginal, além de contribuir na busca de novos sistemas de liberação de fármacos.

6 CONCLUSÕES

Os CLN com e sem HIP encapsulada obtidos por sonicação, apresentaram partículas nanométricas, esféricas e dispersas homogeneamente e estáveis fisicamente, durante os 30 dias de armazenamento.

Nas imagens de MET os CLN com e sem HIP encapsulada apresentam morfologias praticamente esféricas e em escalas nanométricas, em que o CLN sem HIP apresentou na análise de NTA uma distribuição “unimodal” com partículas de diferentes tamanhos, mas com predominância de 151 nm. A %EE mostrou que grande percentual de HIP foi encapsulada no CLN.

Na análise MEV-FEG as médias dos valores de rugosidade entre os CLN dispersos em HG em diferentes proporções, não apresentam alterações significativas, provavelmente devido ao processo de liofilização que retirou a água interna do sistema.

Os estudos reológicos dos HG acrescidos de CLN evidenciaram um comportamento Newtoniano, que pode ser favorável para administração vaginal da HIP, uma vez que a viscosidade do fluido se mantém independente da taxa de cisalhamento aplicada. Além disso, os resultados mostraram $G' > G''$ para os maiores valores de frequência aplicados revelando um comportamento predominantemente elástico dos sistemas, com exceção de CLN_HIP-HG1.

Os HG acrescidos de CLN com e sem HIP apresentaram uma excelente capacidade mucoadesiva, podendo otimizar seu tempo de contato na mucosa vaginal, e possivelmente reduzir a frequência de administração.

Os valores dos HG acrescidos de CLN com e sem HIP resultantes da determinação da seringabilidade foram adequados, garantindo a facilidade de administração no ambiente vaginal.

As curvas de DSC dos componentes isolados utilizados para a obtenção dos sistemas apresentaram eventos endotérmicos coerentes à literatura, enquanto os eventos endotérmicos dos CLN com e HIP encapsulada dispersos ou não em HG, evidenciaram eventos endotérmicos característicos a componentes constituídos nos sistemas (EP e/ou P407).

Os métodos analíticos, I e II foram desenvolvidos para quantificação da HIP utilizando CLAE de acordo com os parâmetros preconizado pela RDC N° 166 da ANVISA (2017) e pelas diretrizes do guia *Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005).

.....*Mariana Rillo Sato*.....

O estudo da solubilidade da HIP na solução receptora constituída de meio tampão fosfato (pH 5) com 3% de Tween 80 garantiu a condição *sink* do experimento. A HIP liberada a partir do sistema CLN_HIP-HG1 apresentou uma liberação sustentada, tendo como principais mecanismos o intumescimento e a difusão controlada; no entanto não apresentaram permeação da mucosa vaginal suína, além de baixos valores de retenção *in vitro*.

Nos ensaios antifúngicos *in vitro* os sistemas analisados, não modificaram a atividade antifúngica do FS, além disso, evidenciaram uma ação fungistática frente à cepa de *C. albicans*.

Os ensaios antifúngicos *in vitro* associados à TFD contra as culturas planctônicas de *C. albicans* almejou resultados satisfatórios, em que grande parte dos grupos irradiados por luz LED apresentou uma diminuição significativa na viabilidade do microrganismo. Do mesmo modo, a eficácia da TFD contra biofilmes de *C. albicans* foi revelada na maioria dos grupos, mas principalmente para F6.5_0,05 e CLN_HIP-HG1.

Na análise de SOSG a solução de HIP, bem como os CLN com HIP encapsulada dispersos em HG, mostraram-se capazes de fornecer efetivamente oxigênio à solução de metanol para a produção de oxigênio singlete, quando ativados pela luz LED.

No ensaio antifúngico *in vivo*, o creme antifúngico (controle) e os grupos tratados com TFD apresentaram predominância de células fúngicas leveduriformes de diferentes tamanhos. Entre os sistemas, uma melhora significativa do perfil terapêutico foi observada especialmente para CLN_HIP-HG1/TFD comparado ao grupo infectado.

Tais resultados evidenciaram a potencial aplicabilidade dos CLN dispersos em HG de geleificação *in situ*, associados ou não à TFD, para a administração vaginal da HIP capaz de contribuir no tratamento de infecções fúngicas induzidas por *C. albicans*, como a CVV.

7 REFERÊNCIAS

- ACD/Structure Elucidator, version 2017, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canadá, www.acdlabs.com, 2019.
- AIGNER, S.; FALK, H. On synthesis and properties of hypericin-porphyrin hybrids. **Monatshefte Fur Chemie-Chemical Monthly**, v. 139, p. 1513-1518, 2008.
- ALVES, F.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. O.; MCHALE, A. P.; CALLAN, J. F. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. **Biofouling**, p. 1-11, 2018.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505–518, 2009.
- ANTIMISSIARIS, S. G.; MOURTAS, S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p.123–145, 2015.
- ARAÚJO, P. R.; CALIXTO, G. M. F.; SILVA, I. C.; ZAGO, L. H. P.; OSHIRO-JUNIOR, J. A.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, A. O.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Mucoadhesive *in situ* gelling liquid crystalline precursor system to improve to the vaginal administration of drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, p. 225, 2019.
- ARAÚJO, M. G. F.; PACIFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; SCARPA, M. V. C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, p. 673-682, 2013.
- ARAÚJO-PEREIRA, R. R.; BRUSCH, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 6, p. 643-652, 2012.
- BADEA, G.; LACATUSU, I.; OTT, C.; BADEA, N.; GRAFU, I.; MEGHEA, A. Integrative approach in prevention and therapy of basal cellular carcinoma by association of three actives loaded into lipid nanocarriers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology**, v. 147, p. 1–8, 2015.
- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influencia de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BOATTO, H. F.; MORAES, M. S.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v.4, n. 9, p. 1-15, 2014.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5081–5092, 2015.

BRASIL - Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC Nº 166/2017 – Guia para validação de métodos analíticos, 2017.

BOSTAN, M. S.; SENOL, M.; CIG, T.; PEKER, I.; GOREN, A. C.; OZTURK, T.; EROGLU, M. S. Controlled release of 5-aminosalicylic acid from chitosan based pH and temperature sensitive hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 177–183, 2013.

BORGHI-PANGONI, F. B.; JUNQUEIRA, M. V.; FERREIRA, S. B. S.; SILVA, L. L.; RABELLO, B. R.; CASTRO, L. V.; BAESSO, M. L.; DINIZ, A.; CAETANO, W.; BRUSCHI, M. L. Preparation and characterization of bioadhesive system containing hypericin for local photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 284-297, 2017.

BRAY, R.; DERPAPAS, A.; FERNANDO, R.; KHULLARI, V.; PANAYI, D. C. Does the vaginal wall become thinner as prolapse grade increases? **International Urogynecology Journal**, v. 28, p. 397–402, 2017.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074-2089, 2007.

CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA, S. H.; STRINGHETTI, F. C. B.; CHORILLI, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, p. 490-496, 2015.

CALIXTO, G. M. F.; CILLI, M. H.; CHIAVACCI, E. M.; CHORILLI, M. Desing and characterization of a Novel p1025 Peptide-loaded liquid crystalline system for the treatment of dental caries, **Molecules**, v. 21, p. 158, 2016.

CAMPAÑA-SEOANE, M.; PELETEIRO, A.; LAGUNA, R.; OTERO-ESPINAR, F. J. Bioadhesive emulsions for control release of progesterone resistant to vaginal fluids clearance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 495–505, 2014.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CASSANO, R.; FERRARELLI, T.; MAURO, M. V.; CAVALCANTI, P.; PICCI, N.; TROMBINO, S. Preparation, characterization and *in vitro* activities evaluation of solid lipid nanoparticles based on PEG-40 stearate for antifungal drugs vaginal delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 1037–1046, 2016.

CASSONE, A.; SOBEL, J. Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. **American Society for Microbiology**, v. 85, p. 1-31, 2016.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts: approved standards, CLSI document M27-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, IL, USA**, 2008.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CARVALHO, F. C.; SILVA, H. R.; LUZ, G. M.; BARBI, M. S.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 280–289, 2012.

CHOI, J. S.; YOO, H. S. Pluronic/chitosan hydrogels containing epidermal growth factor with wound-adhesive and photo-crosslink able properties. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 95A, n. 2, p. 564-573, 2010.

COSTA, A. C.; RASTEIRO, V. M.; PEREIRA, C. A.; ROSSONI, R. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. The effects of rose bengal and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 55, p. 56–63, 2012.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139–151, 2012.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p.62-76, 2011.

DE MELO, W. C. M. A.; AVCI, P.; OLIVEIRA, M. N.; GUPTA, A.; VECCHIO, D.; SADASIVAM, M.; CHANDRAN, R.; HUANG, Y. Y.; PERUSSI, L. R.; TEGOS, G. P.; PERUSSI, J. R.; DAÍ, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 7, p. 669–693, 2013.

DE MELO, W. C. M. A.; LEE, A. N.; PERUSSI, J. R.; HAMBLIN, M. R. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 647-650, 2013.

DEVI, D. R.; SANDHYA, P.; VEDHA HARIA, B. N. Poloxamer: A novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 8, p. 159-165, 2013.

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; TOPAN, J. F.; ANTONIO, H. M. R.; BARCELLOS, J. P. A.; CHESCA, D. L.; SERAFINI, L. N.; TIEZZI, D. G.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 500-514, 2014.

FACHINETTI, N.; RIGON, R. B.; ELOY, J. O.; SATO, M. R.; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M. Comparative study of glyceryl behenate or polyoxyethylene 40 stearate-based lipid carriers for trans-resveratrol delivery: Development, characterization and evaluation of the *in vitro* tyrosinase inhibition. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p. 1401-1409, 2018.

FERREIRA, N. N.; PEREZ, T. A.; PEDREIRO, L. N.; PEZOTTI, F. G.; BONI, F. I.; CARDOSO, V. M. O.; VENÂNCIO, T.; GREMIÃO, M. P.D. A novel pH-responsive hydrogel-based on calcium alginate engineered by the previous formation of polyelectrolyte complexes (PECs) intended to vaginal administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p 1-13, 2017.

FERREIRA, D. M.; BEZERRA, R. O. F.; ORTEGA, C. D.; BLASLAG, R.; VIANA, P. C. C.; MENEZES, M. R.; ROCHA, M. S. Ressonância magnética da vagina: uma visão geral para os radiologistas, com enfoque na decisão clínica. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 249–259, 2015.

FIGUEIRÓ, A. A.; CORREA, C. M.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E. R. Long-term maintenance of *in vitro* cultures affects growth and secondary metabolism of *St. John's Wort*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2115-2121, 2010.

FREIRE, F.; COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; BELLTRAME-JUNIOR, M.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Comparison of the effect of rose bengal-and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 29, p. 949–955, 2014.

FURTADO, H. L. A.; MOTTA, B. L. A.; MENDES, T. L. SILVA, T. O.; SANTOS, J. R. A. Fatores predisponentes na prevalência da candidíase vulvovaginal. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 10, n. 2, p. 190-197, 2018.

GANZERA, M.; ZHAO, J.; KHAN, I. A. *Hypericum perforatum*-chemical profiling and quantitative results of *St. John's Wort* products by an improved high-performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91, n. 3, p. 23-630, 2002.

GAYDOS, C. A.; BEQAJ, S.; SCHWEBKE, J. R.; LEBED, J.; SMITH, B.; DAVIS, T. E.; FIFE, K. H.; NYIRJESY, P.; SPURRELL, T.; FURGERSON, D.; COLEMAN, J. J.

PARADIS, S.; COOPER, C. K. Clinical validation of a test for the diagnosis of vaginitis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 130, n. 1, p. 181–189, 2017.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; ROCHA, E. M.; SARMENTO, V. H.; FREITAS, O.; LOPEZ, R. F. V. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 186-193, 2010.

GUEDES, R. C.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 172, n. 3, p. 293-299, 2005.

GUPTA, J.; TAO, J. Q.; GARG, S.; AL-KASSAS, R. Design and development of an *in vitro* assay for evaluation of solid vaginal dosage forms. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, p. 289-298, 2011.

HANI, U.; SHIVAKUMAR, H.G. Development of miconazole nitrate thermosensitive bioadhesive vaginal gel for vaginal candidiasis. **American Journal of Advanced Drug Delivery**, n. 3, p. 358-368, 2013.

HAMADI, M.; AZADI, A.; RAFLEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.

ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.

JAISWAL, P.; GIDWANI, B.; VYAS, A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, p. 1–14, 2014.

KAMAL, A.; AHMAD, F. J.; AHMAD, S.; SALEEM, K. A validated HPLC method for the quantification of hypericin in *hypericum perforatum*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 4689-4692, 2012.

KARIOTI, A.; BILIA, A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 562-594, 2010.

KELLY, H. M.; DEASY, P. B.; ZIAKA, E.; CLAFFEY, N. Formulation and preliminary *in vivo* dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 167-183, 2004.

KESHWANI, B.; SHARMA, D.; CHATTERJEE, A.; JAMINI, M.; ARORA, P. Novel concepts in vaginal drug delivery. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 184-187, 2014.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, n. 11, p. 748–764, 2011.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 755-767, 2011.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-764, 2011.

KLEIN, R. R.; TAO, J. Q.; WILDER, S.; BURCHET, K.; BUL, Q.; THAKKER, K. D. Development of an *in vitro* release test (IVRT) for a vaginal microbicide gel. **Dissolution Technologies**, v. 17, n. 4, p. 6-10, 2010.

KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 338-349, 2015.

KOLENYAK-SANTOS, F.; GARNERO, C.; OLIVEIRA, R. N.; SOUZA, A. L. R.; CHORILLI, M.; ALLEGRETTI, S. M.; LONGHI, M. R.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M. P. D. Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the *in vitro* schistosomiasis activity of praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-12, 2014.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KRAUSE, B.; MENDE, M.; PÖTSCHKE, P.; PETZOLD, G. Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. **Carbon**, v. 48, p. 2746-2754, 2010.

KULKARNI, C. V.; MOINUDDIN, Z.; PATIL-SEN, Y.; LITTLEFIELD, R. HOOD, M. Lipid-hydrogel films for sustained drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 416-421, 2015.

LANCELOTTI, C. **Preparação e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatin:extrato de semente de uva**. 2014. 85 p. Dissertação de Mestrado em Química Analítica – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C. B.; VENKATRAMAN, S. S. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal Pharmaceutics**, v. 418, p. 28-41, 2011.

LEAL, M. R. D.; LIMA, M. C. N. P. C.; KLEIN, S. O. T.; LORDÊLO, P. Tratamento da candidíase vulvovaginal e novas perspectivas terapêuticas: uma revisão narrativa. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v. 6, n. 4, p. 462-469, 2016.

LEITE, P. B.; LANNES, S. C. S.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, F. A. S. M. Estudo reológico de chocolates elaborados com diferentes cultivares de cacau

(*Theobromacacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 192-197, 2013.

LIMA, A. M.; PIZZOL, C. D.; MONTEIRO, F. B. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O.; PERUSSI, J. R. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, p. 146–154, 2013.

LIU, Y.; YANG, F.; FENG, L.; YANG, L.; CHEN, L.; WEI, G.; LU, W. *In vivo* retention of poloxamer-based *in situ* hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 7, n.4, p. 502–509, 2017.

LOURENÇO, C.; TEIXEIRA, M.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.138, p.1-12, 1996.

MACHADO-DE-SENA, R. M.; CORRÊA, L.; KATO, I. T.; PRATES, R. A.; SENNA, A. M.; SSANTOS, C. C.; PICANC, D. A.; RIBEIRO, M. S. Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans* induced murine vaginitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, p.275-282, 2014.

MACHADO, R. M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. Vaginal semisolid products: technological performance considering physiologic parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 556-568, 2017.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 1-37, 2009.

MIRÓ, M. S.; RODRÍGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; ICELY, P. A.; ARAÚJO, M. G. F.; RIERA, F. O.; VARGAS, L.; ABIEGA, C.; CAEIRO, J. P.; SOTOMAYOR, C. E. Candidiasis vulvovaginal: uma antiga enfermidade com novos desafios. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, p. 65-71, 2017.

MOON, H. J.; KO, D. Y.; PARK, M. H.; JOO, M. K.; JEONG, B. Temperature-responsive compounds as *in situ* gelling biomedical materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 4860–4883, 2012.

MOAZENI, M.; KELIDARI, H. R.; SAEEDI, M.; MORTEZA-SEMNANI, K.; NABILI, M.; GOHAR, A. A.; AKBARI, J.; LOTFALI, E.; NOKHODCHI, A. Time to overcome fluconazole resistant *Candida* isolates: solid lipid nanoparticles as a novel antifungal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B**, v. 142, n. 400-407, 2016.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131–S155, 2002.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

NAFEE, N.; YOUSSEF, A.; EL-GOWELLI, H.; ASEM, H.; KANDIL, S. Antibiotic-free nanotherapeutics: Hypericin nanoparticles thereof for improved *in vitro* and *in vivo* antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 249-258, 2013.

NAGATA, J. Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V.R.; TERADA, R.S.; GRACIANO, A.X. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122-31, 2012.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure, preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 305–313, 2015.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Hypericin, CID=3663. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hypericin>. Acesso em: 22/02/2020.

NAYAK, B. S.; ELLAIAH, P.; SUDHAHAR, D. Novel approaches in vaginal drug delivery systems for local and systemic treatments. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 4, p. 675-680, 2010.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

OSHIRO-JUNIOR, J. A.; SCARDUELI, C. R.; OLIVEIRA, G. J. P. L.; MARCANTONIO, R. A. C.; CHIAVACCI, L., A. Development of ureasil–polyether membranes for guided bone regeneration. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 3, p. 1-10, 2017.

OWEN, D. H.; KATZ D. A vaginal fluid simulant. **Contraception**, v. 59, n.9, p. 91-95, 1999.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; DUARTE, P.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; DAS NEVES, J.; AMARAL, M. H.; BREITENFELD, L.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Women's experiences, preferences and perceptions regarding vaginal products: Results from a *cross-sectional* web-based survey in Portugal. **European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, v. 20, n.4, p. 259-271, 2014.

PATEL, M. P.; PATEL, R. R.; PATEL, J. K. Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 536–557, 2010.

PARK, D. M.; SONG, Y. K.; JEE, J. P.; KIM, H. T.; KIM, C. K. Development of chitosan-based ondansetron buccal delivery system for the treatment of emesis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 9, p. 1077- 1083, 2012.

PAZ-CRISTOBAL, M. P.; ROYO, D.; REZUSTA, A.; ANDRE-CIRIANO, E.; ALEJANDRE, M. C.; MEIS, J. F.; REVILLO, M. J.; ASPIROZ, C.; NONELL, S.; GILABERTE, Y. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 35- 42, 2014.

PENG, Y.; YUAN, J.; YE, J. Determination of active components in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Electroanalysis**, v. 17, n. 12, p. 1091-1096, 2005.

PÉNZES, T.; CSÓKA, I.; ERŐS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. **Rheologica Acta**, v. 43, p. 457-463, 2004.

PEPPAS, N. A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M.; WARD, J. H.; ZHANG, J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.2, p. 9-29, 2000.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-94, 2007.

RAMOS, M. A. S.; TOLEDO, L. G.; CALIXTO, G. M. F.; BONIFÁCIO, B. V.; ARAUJO, M. G. F.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, M. T. G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. *Syngonanthus nitens* Bong. (Rhul.)-loaded nanostructured system for vulvovaginal candidiasis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.2-19, 2016.

RAMAGE, G.; RAJENDRAM, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAVANI, L.; ESPOSITO, E.; BORIES, C.; MOAL, V. L.; LOISEAU, P. M.; DJABOUROV, M.; CORTESI, R.; BOUCHEMA, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and *in vitro* studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 695–702, 2013.

REZUSTA, A.; LÓPEZ-CHICON, P.; PAZ-CRISTOBAL, M.; ALEMANY-RIBES, M.; ROYO-DÍEZ, D.; AGUT, M.; SEMINO, C.; NONELL, S.; REVILLO, M. J.; ASPIROZ, C.; GILABERTE, Y. *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p.613-619, 2012.

RIGON, R. B.; FACHINETTI, N.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; CHORILI, M. Skin delivery and *in vitro* biological evaluation of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for skin disorder therapies. **Molecules**, v. 21, n. 116, p. 2-14, 2016.

RIBEIRO, L. N. M.; COUTO, V. M.; FRACETO, L. F.; PAULA, E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Nature**, v. 8, n. 982, p. 1-8, 2018.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; DA SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32, n.1, p. 7-14, 2007.

ROBATTO, M.; PAVIE, M. C.; TOZETTO, S.; BRITO, M. B.; LOEDÊLO, P. Blue light emitting diode in treatment of recurring vulvovaginal candidiasis: A case report. **Brazilian Journal of Medicine and Human Health**, v. 5, n. 4, p. 162-168, 2017.

RODERO, C. F.; CALIXTO, G. M. F.; SANTOS, K. C.; SATO, M. R.; RAMOS, M. A. S.; MIRÓ, M.; RODRIGUEZ, E.; VIGEZZI, C.; BAUAB, T.M.; SOTOMAYOR, C.E.; CHORILLI, M. Curcumin-loaded liquid-crystalline systems for controlled drug release and improved treatment of vulvovaginal candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, v.15, p.4491-4504, 2018.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009, p. 1-888.

SALMAZI, R.; CALIXTO, G.; BERNEGOSI, J.; RAMOS, M. A. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4815–4824, 2015.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SATO, M. R.; OSHIRO-JUNIOR, J. A.; MACHADO, R. T. SOUZA, P. C.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. S.; SILVA, P. B.; MARLUS, C. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper(II) complexes to be used against *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 909-921, 2017.

SAVIC, S.; LUKIC, M.; JAKSIC, I.; REICHL, S.; TAMBURIC, S.; GOYMANN, C.M. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal Colloid Interface Science**, v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in Health and Diseases**, v. 11, p. 159, 2012.

SENYIGIT, Z. A.; KARAVANA, S. Y.; ERAÇ, B.; GURSEL, O.; LIMONCU, M. H.; BALOGLU, E. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, p.139–156, 2014.

SHIOZAWA, P.; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arquivos Médicos Hospital Faculdade Ciências Médicas Santa Casa São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 48-50, 2007.

SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M. S.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs-A review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218-2243, 2014.

SIRVENT, T.; GIBSON, D. M. Rapid isocratic HPLC analysis of hypericins. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 2, p. 251–259, 2000.

SOUZA, A. G.; AMARANTE, C. V. T.; DESCHAMPS, F. C.; ERNANI, P. R. Calagem e adubação fosfatada promovem crescimento inicial e produção de hipericina em erva-de-São-João. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 421-425, 2006.

SOUTO, E. B.; ALMEIDA, A. J.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 317-31, 2007.

TSANG, P. W.; BANDARA, H. M.; FONG, W. P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-8, 2012.

UMEMURA, S.; YUMITA, N.; UMEMURA, K.; NISHIGAKI, R. Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells. **Cancer Chemother Pharmacology**, v. 43, p. 389-393, 1999.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GROBNER, G. Chitosan *in situ* gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, p. 19–29, 2011.

VERMANI, K.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D. Assemblies for *in vitro* measurement of bioadhesive strength and retention characteristics in simulated vaginal environment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.28, n.9, p.1133–1146, 2002.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

WILLIAMS, D. W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M. A. Treatment and prevention. **Periodontology** 2000, v. 55, p. 250-265, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; JIN, M.; LV, Y.; PEI, Z.; PEI, Y. A Hypericin delivery system based on poly dopamine coated cerium oxide nanorods for targeted photodynamic therapy. **Polymers**, v. 11, n. 1025, p. 2-16, 2019.

YANG, Y.; CORRONA, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M.A. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 261-272, 2014.

ZHANG, J.D.; XU, Z.; CAO, Y.; YAN, L.; WANG, Y.; JIANG, Y. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris*L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 79-84, 2006.

ZHU, W.; FILLER, S. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v.12, p. 273-282, 2010.

8 ANEXO 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Protocolo CEUA/FCF/CAR: 45/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

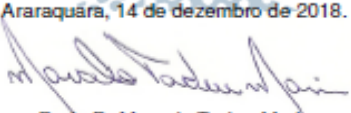


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal de hipericina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 45/2018, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marius Chorilli - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 01 de novembro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho de 2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	72
Peso/Idade	21g (8-10 semanas)
Sexo	Fêmea
Origem	CEMIB / Campinas - SP

Araraquara, 14 de dezembro de 2018.


 Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marini
 Coordenador da CEUA