



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

PATRICIA ROCHA DE ARAÚJO

SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS MUCOADESIVOS PARA
ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE HIPERICINA ASSOCIADOS À TERAPIA
FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

ARARAQUARA

2018

PATRICIA ROCHA DE ARAÚJO

SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS MUCOADESIVOS PARA
ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE HIPERICINA ASSOCIADOS À TERAPIA
FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de
Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como
parte dos requisitos para obtenção do título de mestra em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Dra. Giovana Maria Fioramonti Calixto

ARARAQUARA

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A663s

Araújo, Patricia Rocha de.

Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração vaginal de hipericina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal / Patricia Rocha de Araújo. – Araraquara, 2018.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em Biotecnologia.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Giovana Maria Fioramonti Calixto.

1. Nanotecnologia farmacêutica. 2. Cristais líquidos. 3. Hipericina. 4. Candidíase vulvovaginal. 5. Terapia fotodinâmica. 6. Mucoadesão in vitro. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Calixto, Giovana Maria Fioramonti, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter permitido a conclusão de mais uma etapa importante na minha vida. Agradeço muito aos meus pais, pois sempre me apoiaram em todos os quesitos e sempre me deram apoio emocional em todos os momentos. Agradeço em particular todas as orações e momentos de preocupação da minha mãe que sempre me acompanhou de longe.

Agradeço ao professor Marlus por me receber no seu grupo de pesquisa e por ter dado credibilidade à uma pessoa que não conhecia antes. Agradeço a paciência e a orientação ao longo desses 2 anos! Agradeço à minha Coorientadora Giovana Calixto pela disponibilidade e atenção. Agradeço também aos professores de farmácia da UFRN e principalmente ao grupo TecBiofar, pois tiveram o papel importante de me incentivar e proporcionar as minhas primeiras experiências acadêmicas.

Além disso, quero agradecer à todas as pessoas do laboratório, pois todos me ajudaram de alguma forma na execução do trabalho, seja tirando dúvidas, emprestando coisas, ou compartilhando experiências. Também agradeço à Natália Gonçalves pelas conversas e ajudas no laboratório, ao Vinícius da toxicologia pela ajuda durante os dias intermináveis de HPLC e à professora Carla e seus alunos que me receberam tão bem durante os experimentos de terapia fotodinâmica. E por fim, agradeço por todo conhecimento e experiências adquiridas. Muitas coisas foram difíceis, mas tenho certeza que de alguma forma elas contribuíram para a formação do meu “eu” de amanhã.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Até aqui nos ajudou o Senhor!”

I Samuel 7.1

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença causada por espécies do gênero *Candida* spp. no trato genital inferior feminino que afeta um grande número de mulheres em todo mundo. Porém o uso sistêmico de fármacos causa muitas reações adversas e as formulações tópicas possuem um baixo tempo de retenção na mucosa vaginal devido à diluição dos sistemas na cavidade vaginal. Esse estudo propõe uma terapia antifúngica alternativa empregando sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos (SPCLM) para a liberação de hipericina (HIP), um potente fotossensibilizador isolado de plantas do gênero *Hipericum* com e sem o emprego da terapia fotodinâmica (TFD). O sistema visa aumentar o tempo de permanência da formulação, bem como reduzir o número de aplicações e a quantidade de fármaco empregada. O emprego da TFD, por sua vez, se faz como uma forma de diminuir a resistência pelos microrganismos. Observou-se a formação de sistemas isotrópicos no sistema constituído por 30% da fase oleosa constituída por ácido oleico e colesterol na razão de 7:1, 40% de Procetyl AWS como tensoativo e 30% de uma dispersão de poloxamer à 16% empregando as técnicas de microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Após a introdução de três diferentes concentrações de fluido vaginal simulado FVS (30, 50 e 100%), as formulações resultantes passaram a apresentar anisotropia e picos característicos de fase lamelar. Análises das propriedades mecânicas, reológicas e mucoadesivas das formulações indicaram que a organização e a mucoadesão dos sistemas aumentaram à medida que a quantidade de FVS aumentou. Os ensaios de validação da metodologia analítica para quantificação de HIP indicaram que o método é aceitável segundo agências regulatórias. Os testes de liberação *in vitro* demonstraram perfil de liberação sustentada da HIP provavelmente devido à sua alta afinidade pelos componentes da fase oleosa dos sistemas de liberação. Além disso, os SPCLM causaram aumento da retenção e baixa permeação da HIP em mucosa suína. Ensaios microbiológicos indicaram que a HIP é um agente eficaz para inativação das leveduras de *Candida albicans* com emprego da TFD, porém os SPCLM com HIP não potencializaram a ação antifúngica deste composto, possivelmente devido ao longo período necessário para sua liberação. Os testes de citotoxicidade indicaram que todas as formulações apresentam baixa toxicidade, porém os sistemas com hipericina incorporada apresentaram maior toxicidade para células tumorais L292. Ensaios *in vivo* do sistema em modelo de CVV são necessários para comprovar a viabilidade do sistema desenvolvido.

Palavras-chave: Nanotecnologia farmacêutica. Cristais líquidos. Hipericina. Candidíase vulvovaginal. Terapia fotodinâmica. Mucoadesão *in vitro*.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidosis (VVC) is a disease induced by *Candida* strains in the female genital tract that affects a great number of women worldwide. However, systemic drugs cause many adverse reactions. Also, currently employed topical dosage forms present low retention times due to their dilution in vaginal fluids. This study proposes an alternative antifungal therapy through the development of liquid crystalline precursor systems (LCPS) for hypericin release, a potent photosensitizer isolated from *Hipericum* plants with and without photodynamic inactivation (PDI). The developed system aims to increase the residence time of the formulations, as well as decrease the number of applications and the amount of drug. Photodynamic therapy was used to reduce microorganism resistance. Polarized light microscopy and Small-Angle X-Ray Scattering confirmed the formation of an isotropic system composed of 30% of oil phase containing oleic acid and cholesterol in (ratio of 7:1). After addition of three different concentrations of simulated vaginal fluid -SVF (30, 50 and 100%), the resultant formulations presented anisotropy and characteristic peaks of lamellar phases. Mechanical, rheological and mucoadhesive assays indicated the formation of long-range ordering systems as the amount of SVF increased. Drug validation assays indicated that the method is acceptable for hypericin quantification according to regulatory agencies. In vitro drug release assays exhibited a sustained release profile probably due to the high affinity between HIP and the oily phase components. In addition, the LCPS lead to poor permeability and enhanced retention of HIP in the porcine mucosa. Microbiological assays pointed out that HIP effectively inactivated *Candida albicans* yeasts with PTD, however the HIP loaded LCPS did not potentiate the antifungal activity of HIP, probably due to the long period for HIP release. Cytotoxic tests indicated that all formulations presented low toxicity, however the HIP loaded presented higher toxicity to L292 tumor cells. In vivo assays should be performed to confirm the viability of the developed system.

Key words: Pharmaceutical nanotechnology. Liquid crystals. Hypericin. Vulvovaginal candidosis. Photodynamic therapy. *In vitro* mucoadhesion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Síntese da hipericina	15
3.2. Desenvolvimento das formulações	15
3.3. Microscopia de luz polarizada	16
3.4. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo	16
3.5. Determinação do comportamento reológico.....	16
3.5.1. Análise reológica contínua	16
3.5.2. Análise reológica oscilatória	16
3.6 Análise de textura	17
3.7. Análise de mucoadesão <i>in vitro</i>	17
3.8. Validação da metodologia analítica para quantificação da HIP por CLAE	17
3.8.1. Condições cromatográficas.....	17
3.8.2. Seletividade	18
3.8.3. Linearidade	18
3.8.4. Precisão e exatidão	18
3.8.5. Robustez	18
3.9. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da HIP das formulações.....	19
3.10. Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da HIP das formulações.....	19
3.11. Inativação fotodinâmica	19
3.12. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Diagrama de fases.....	20

4.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo	22
4.3. Determinação do comportamento reológico.....	29
4.3.1. Análise reológica contínua	29
4.3.2. Análise reológica oscilatória	34
4.4. Perfil de textura	37
4.5. Mucoadesão	39
4.6. Validação do método analítico para quantificação da hipericina em metanol	40
4.6.1. Seletividade	40
4.6.2. Linearidade	40
4.6.3. Precisão e exatidão	42
4.6.4. Robustez	43
4.7. Validação do método analítico para quantificação da hipericina no meio receptor	45
4.7.1. Seletividade	45
4.7.2. Linearidade	45
4.7.3. Precisão e exatidão	46
4.7.4. Robustez	47
4.8. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da hipericina	49
4.9. Ensaio de permeabilidade e retenção.....	52
4.10. Inativação fotodinâmica	54
4.11. Ensaio de citotoxicidade.....	56
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença causada por espécies do gênero *Candida* spp. no trato genital inferior feminino (WHITE; VANTHUYNE, 2006). Acredita-se que 75% da população feminina será acometida pela doença pelo menos uma vez na vida (TALAEI et al., 2017). A CVV é considerada como um problema de saúde pública e está associada à altos custos econômicos (GONÇALVES et al., 2015). Tal condição abrange pacientes sintomáticas ou não que apresentam culturas vaginais de cândida positivas (SOBEL, 1998). O desenvolvimento de sintomas estaria associado à presença de fatores de virulência que aumentam ou facilitam a germinação das células fúngicas, o que por consequência facilitaria a invasão tecidual (SOBEL, 2007).

CVV pode ser classificada em não complicada ou complicada dependendo da resposta ao tratamento e características dos episódios de infecção. Severidade, etiologia, fatores de risco e frequência são fatores que categorizam os episódios (SOBEL, 2016). Casos não complicados são infecções leves ou moderados causados pela espécie *Candida albicans* que ocorrem de forma esporádica. O tratamento é usualmente de curta duração. Por exemplo, tanto tratamentos tópicos quanto sistêmicos de compostos azólicos apresentam índice de cura que variam entre 85 e 90% (GONÇALVES et al., 2015). Já os complicados incluem os casos severos, recorrentes, que são causados por outras espécies de *Candida* e que atingem pessoas em condições de debilidade, como imunossupressão ou situações em que há o aumento do teor de glicogênio na região vaginal, como durante a gravidez e diabetes mellitus (DOVNIK, 2015).

As espécies do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, são consideradas como os maiores patógenos oportunistas. Essa característica ocorre devido ao alto grau de adaptação das cepas à diferentes condições de temperatura, pH (KARAM EL-DIN, 2012), disponibilidade de nutrientes (ENE, 2012), e níveis de oxigênio e gás carbônico, ou seja, esses microrganismos apresentam alta flexibilidade metabólica. Além disso, diversos fatores de virulência contribuem para a sobrevivência e adaptação em contato com o hospedeiro, tais como: Produção de enzimas hidrolíticas, alternância fenotípica, formação de biofilme, adesão à superfície das células por meio de adesinas, produção de transportadores de micronutrientes para driblar o mecanismo de imunidade nutricional associada ao hospedeiro e mecanismos de evasão do sistema imune (DANTAS, 2016).

Diferentes mecanismos de resistência foram descritos para as classes de fármacos antifúngicos, conforme apresentado na Tabela 1:

Tabela 1. Principais mecanismos de resistência para as classes de medicamentos antifúngicos disponíveis (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Classe do antifúngico	Mecanismo de resistência
Azóis	i) Redução no acúmulo intracelular (formação de bombas de efluxo codificadas pelos genes CDR1 e CDR2) ii) Diminuição da afinidade pela enzima lanosterol 14- α -desmetilase (mutação do gene ERG11) iii) Neutralização do fármaco (mutação do gene ERG1 ou ERG3)
Equinocandina	Diminuição na velocidade de inativação (mutações nos genes FKS1 e/ou FKS2)
Polienos	Neutralização do fármaco (mutação dos genes ERG3 ou ERG6 genes, levando a diminuição da quantidade de ergosterol na membrana fúngica)
Flucitosina	Redução no acúmulo intracelular do fármaco (mutação do gene FCY2) e neutralização do seu efeito (mutação do gene FCY1)

Recomenda-se administração tópica ou oral de compostos azólicos para CVV não complicada (BARBOSA, 2012). O uso intravaginal de medicamentos pode durar até 14 dias ou pode-se administrar uma dose oral única de fluconazol (OWEN; CLENNEY, 2004). Apesar de se observar uma certa frequência de reações indesejáveis aos agentes usados intravaginalmente, tais como irritação e inchaço, ou complicações gastrointestinais e cefaleia aos agentes usados sistemicamente, existe uma alta prevalência de cura (GONZÁLEZ, 2011).

Porém, os tratamentos disponíveis para episódios complicados ainda demonstram limitações. Uso de antibióticos, resistência a agentes antifúngicos, principalmente pela seleção

de espécies do gênero diferentes da *Candida albicans*, diabetes mellitus não controlada e a não adesão a tratamentos tradicionais são exemplos de fatores frequentes relacionados à CVV complicada. Existe, portanto, a necessidade de uma administração de antifúngicos por um tempo mais prolongado que o convencional para controlar a invasão tecidual e ainda um tratamento contínuo por pelo menos 6 meses. Apesar disso, ainda é possível encontrar casos em que a doença retorna mesmo após esse período (RINGDAHL, 2000).

Dessa forma, novos sistemas terapêuticos têm sido avaliados principalmente para o tratamento de CVV recorrente. A administração por via vaginal diminui a quantidade de fármaco aplicada e a incidência de efeitos adversos relacionados ao uso sistêmico (tais como náusea, intolerância ao álcool e neuropatia periférica). Porém, o baixo tempo de contato entre as formulações atualmente disponíveis e a mucosa representa um fator limitante na eficácia de um tratamento por via vaginal (OKADA; HILLERY, 2001), o que estaria relacionada à ação auto-limpante do trato vaginal e ao vazamento das formas farmacêuticas causado pelo contato com as secreções vaginais. Além de causar desconforto, o vazamento geralmente está associado à diluição do sistema administrado, levando à uma diminuição do efeito farmacológico pretendido (PEREIRA; BRUSCHI, 2011).

Dessa forma, o emprego de formulações bioadesivas vaginais seria uma alternativa interessante devido ao perfil de liberação controlada e devido ao aumento no tempo de contato da formulação com a mucosa vaginal, levando a diminuição do tempo de tratamento (CARVALHO, 2010) e na frequência de aplicações (SANDRI, 2011). Bioadesão é definido como um estado em que há aderência entre duas superfícies, em que um deles é um sistema biológico (PEPPAS; LITTLE; HUANG, 2000). Geralmente, o termo refere-se à aderência que ocorre entre polímeros e tecidos, porém essa interação pode ocorrer tanto para células epiteliais, muco ou combinação de ambas (DONNELLY, 2011). Mucoadesão é um termo usado quando o sistema biológico em questão é uma camada mucosa (MYTHRI, 2011).

O muco é uma secreção heterogênea constituído por 95% de água, 1% de eletrólitos, 0,5-1% de proteínas, 0,5-1% lipídeos e glicoproteínas. A mucoadesão surgiria a partir do contanto íntimo e a consequente interpenetração acompanhada de ligações físicas e químicas entre as cadeias de um polímero e de mucina, glicoproteína responsável pela estrutura do muco. A taxa de renovação da mucina é de 6 horas em média; no entanto, o uso de formulações bioadesivas prolonga a permanência da mucina para uma faixa de 15 horas (PEPPAS; LITTLE; HUANG, 2000). O uso de formulações com alta viscosidade também levaria ao aumento no tempo de retenção (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

Além disso, a terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido investigada como uma potencial terapia alternativa contra infecções. Assim como a terapia fotodinâmica antitumoral, o método emprega substâncias fotossensibilizadoras que absorvem energia em comprimento de onda apropriado em luz visível (PAZ-CRISTOBAL, 2013) e causam a destruição de células ou tecidos por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (KIESSLICH; KRAMMER; PLAETZER, 2006). Além de não ser invasiva (FERNÁNDEZ-GUARINO, 2007) e custo-efetiva, a técnica apresenta a vantagem de ser seletiva (LIANG, 2016) e bem mais rápida que os tratamentos convencionais (ROSA, 2014).

A eficácia e seletividade do tratamento com emprego da terapia fotodinâmica está diretamente relacionada ao modo de internalização do fotossensibilizador durante o período de incubação (diferença entre o tempo de aplicação e irradiação) das células (JORI, 2011). Tamanho, arquitetura e composição celular são fatores que definem a susceptibilidade aos processos de fotossensibilização (JORI; BROWN, 2004). Células fúngicas apresentam maior susceptibilidade a ação da terapia fotodinâmica do que células de mamíferos devido à maior permeabilidade oferecida pelas camadas porosas de suas membranas citoplasmáticas (HUANG; HAMBLIN, 2010). O efeito da terapia seria altamente restrito ao local da aplicação, uma vez que os agentes que causam dano na estrutura celular dos fungos tem um tempo de duração muito curto, o que não permite a difusão da ação para outros locais. Além disso, a chance de desenvolvimento de resistência seria bastante reduzida, pois existem diferentes alvos de ataques (JORI; BROWN, 2004).

O mecanismo geral da terapia fotodinâmica inicia-se basicamente por meio da absorção da luz por agentes fotossensibilizadores, fazendo com que atinjam o primeiro estado excitado singleto ($1S^*1$). Este, por sua vez, tende a voltar ao seu estado fundamental através da emissão de fótons fluorescentes ou pode atingir o estado excitado tripleto ($3S^*1$) por meio de cruzamento intersistemas (ISC), assim como mostra a Figura 1. A partir deste estado, a desativação do fotossensibilizador ocorre pela emissão de fosforescência ou pela transferência de energia para substratos ou oxigênio molecular presentes no meio por transição não radiativa. Essas transferências dão origem às reações fotodinâmicas tipo I e II, principais responsáveis pela geração das espécies reativas de oxigênio (MACDONALD, 2004).

As reações do tipo I são caracterizadas pela interação direta entre fotossensibilizador excitado ($3S^*1$) e substrato em ambientes pouco oxigenados, levando a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1995). O substrato pode

ser biológico, um solvente ou outro agente sensibilizador. Essa interação leva a formação de radicais livres e íons radicais (SHARMAN,1999).

Já a reação fotodinâmica tipo II ocorre em ambientes oxigenados, em que o fotossensibilizador em estado excitado T1 transfere energia para moléculas de oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), levando a produção de oxigênio excitado singleto ($^1\text{O}_2$) como principal produto. Esta espécie reativa gerada por uma transição de baixa energia forma adutos com substratos orgânicos (MACDONALD, 2004). Alternativamente, o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) surge como menos de 1% do produto da reação. Peróxido de hidrogênio é produzido de forma espontânea ou por desmutação enzimática após a formação do radical (RYTER, 1998).

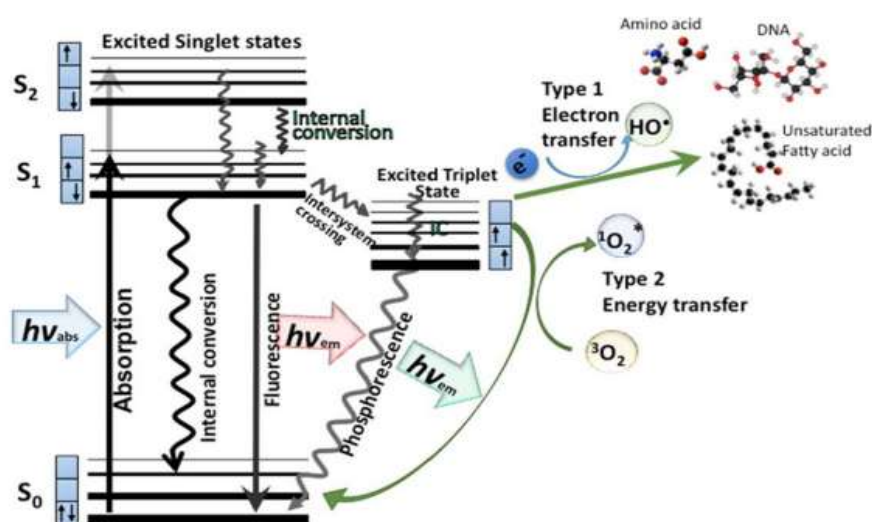


Figura 1. Esquema ilustrativo sobre o mecanismo de ação dos fotossensibilizadores

Dentre os pigmentos fotossensibilizadores conhecidos, a hipericina (Figura 2) destaca-se pelo alto poder de geração de oxigênio singleto e ânion superóxido (O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009). Esse composto é um metabólito secundário (LAVIE, 1995) com estrutura quinoidal aromática (REZUST, 2012) que ocorre naturalmente em folhas de plantas do gênero *Hipericum* e no tegumento de alguns insetos coccídeos da Austrália (MELO, 2014). A hipericina apresenta baixa toxicidade e genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, e também apresenta propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (YOW et al, 2012).

A hipericina também apresenta ação antifúngica natural, porém acredita-se que a terapia fotodinâmica pode potencializar essa atividade. Sytaret al (2016) testaram a ação da hipericina para três espécies de hifas e cinco de leveduras. Eles constataram que a hipericina apresenta

ação inibitória a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ e de pelo menos 16 $\mu\text{g/mL}$ para desempenhar ação fungicida. Além disso, as doses de hipericina necessárias para inativação dependem do tipo de cepa, inclusive quando há o emprego da terapia fotodinâmica (LÓPEZ-CHICÓN, 2012). A diferença na suscetibilidade entre cepas está relacionada ao padrão de distribuição de hipericina dentro dos patógenos. Por apresentar um caráter hidrofóbico (KARIOTI; BILIA, 2010), a hipericina tende a se acumular em membranas e organelas (KELLO, 2010). Porém, espécies diferentes apresentam mecanismos próprios de inclusão do fármaco de acordo com suas características estruturais, fazendo com que a acumulação e eficiência de eliminação da hipericina sejam diversificadas (LÓPEZ-CHICÓN, 2012).

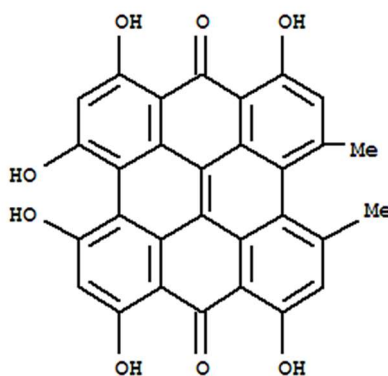


Figura 2. Estrutura molecular da hipericina

No entanto, a alta hidrofobicidade da hipericina também leva a formação de agregados em solução (FALK; MEYER, 1994), o que representa uma desvantagem principalmente quando há estimulação fotodinâmica, pois apenas monômeros apresentam fluorescência. Dessa forma, o emprego de sistemas líquido-cristalinos com propriedades mucoadesivas desempenharia a importante função de aumentar a viabilidade do fármaco para o seu sítio de ação, prolongando a adesão da formulação (CARVALHO, 2013) e levando à uma liberação controlada da hipericina, o que diminuiria a formação de agregados.

Cristais líquidos agrupam uma classe de materiais compostos por moléculas anisotrópicas que apresentam fases com propriedades comuns a sólidos e líquidos (COLLINGS; HIRD, 1997). Esses sistemas demonstram qualidades únicas para a liberação de fármacos. O uso farmacêutico de cristais líquidos é interessante devido ao aumento da solubilidade de fármacos, prevenção de degradação e controle da razão de liberação de compostos carreados. A alta viscosidade desses sistemas também permite a localização da liberação do fármaco no local de ação pretendido (MALMSTEN, 2002).

Os cristais líquidos liotrópicos são formados pela automontagem espontânea de moléculas com caráter anfifílico, por meio de processos termodinamicamente favoráveis. Moléculas de tensoativos sob determinadas concentrações e temperatura interagem por meio de ligações fracas (e.g. ligação de hidrogênio, interação de van der Waals, efeitos eletrostáticos) aleatoriamente até formarem estruturas complexas variadas. (CALANDRA, 2015). O processo inicial dá-se através da micelização, em que a entropia do sistema diminui devido à agregação das porções hidrofóbicas das moléculas, principalmente por meio do efeito hidrofóbico, fenômeno desencadeado devido à interação desfavorável entre moléculas de água e cadeias hidrofóbicas. Dessa forma, a união das moléculas ocorre quando as somas das interações favoráveis ultrapassam as não favoráveis (ISHIZUKA, 2011).

Características dos tensoativos, tais como tamanho do grupo polar e da cauda hidrofóbica, ou a presença de carga, por exemplo, definem o formato das micelas formadas. Elas por sua vez, se agregam entre si até formar as estruturas das mesofases líquido-cristalinas (BURDUCEA, 2004). Diferentes organizações com estruturas bi ou tri-dimensionais nanométricas podem ser encontradas entre os cristais líquidos liotrópicos. Dentre elas, encontram-se as fases lamelares, hexagonais e cúbicas. Suas propriedades podem ser avaliadas por diferentes técnicas, tais como microscopia de luz polarizada e Espalhamento de raio-X a baixo ângulo. Além disso, os cristais líquidos apresentam estabilidade termodinâmica, o que permite que as formulações tenham um maior tempo de vida.

Para a preparação dos sistemas foram utilizados álcool cetílico propoxilado e etoxilado (Procetyl™ AWS) como tensoativo, uma mistura de ácido oleico e colesterol na razão de 7:1 como fase oleosa e uma dispersão de poloxamer a 16% como fase aquosa. O Procetyl™ AWS (PPG-5 Ceteth-20) é um tensoativo não-iônico que se apresenta como um composto não irritante, resistente a variações de pH e com boas propriedades solubilizantes e emulsificantes³⁹. A associação entre tensoativo e copolímero resulta na diminuição da concentração micelar crítica (CMC) e menor tensão interfacial (CRODA, 2010).

O ácido oleico é um ácido graxo insaturado que pode ser encontrado em muitos óleos vegetais e gorduras animais na forma esterificada (LIEBERT, 1987). A presença de ácido oleico modula a textura de mesofase e pode levar a transição de fases nos cristais líquidos liotrópicos (GUO, 2010). O ácido oleico também exerceria o papel de co-tensoativo na formulação. O colesterol é um lipídeo esteroide abundantemente encontrado nas membranas celulares dos mamíferos que tende a conferir maior organização e consequente menor fluidez às estruturas líquido-cristalinas celulares. Colesterol e outras moléculas anfifílicas, como fosfolipídios,

alteram a viscosidade da membrana. Apesar de ter uma cadeia carbônica extensa, o colesterol é uma molécula anfipática devido à presença de um grupo hidroxila (LODISH, 2000). Os constituintes oleosos, além de contribuírem para a formação de características estruturais do sistema, favorecem a liberação e permeabilidade do fármaco hidrofóbico (BOIKO et al, 2013). Devido à alta afinidade da hipericina ao colesterol, o emprego do colesterol no sistema também teria a função de fornecer uma liberação controlada do fármaco (MOGALIAN et al, 2007).

Os poloxâmeros são copolímeros em bloco anfifílicos que são constituídos por subunidades monoméricas com diferentes solubilidades. Em altas concentrações, moléculas do copolímero com propriedades tensoativas tendem a formar agregados em solução (BONACUCINA, 2011). Eles apresentam baixa toxicidade, menor irritação de pele e mucosas, compatibilidade com diferentes compostos químicos e boas características de liberação de fármacos (PATEL, 2009). O uso de solução contendo copolímeros promove mucoadesão na região vaginal (RAMOS, 2015).

Devido a sua hidrofobicidade, a hipericina apresenta a tendência de se localizar próximo aos grupos lipídicos com caráter anfifílico presentes na membrana plasmática (HO, 2009). Acredita-se que o carregamento desse fotossensibilizador pela formulação proposta irá induzir um mecanismo de competição entre o colesterol presente no sistema de liberação e o ergosterol (ERIKSSON, 2011; ERIKSSON, 2009), esterol presente nas membranas fúngicas, devido à similaridade entre elas (SEGURA et al, 2014), contribuindo dessa forma para uma maior seletividade na liberação do fármaco para o interior das células do patógeno.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração vaginal de hipericina associados à terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase vulvovaginal

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as formulações obtidas por meio de microscopia de luz polarizada, técnica de espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, análises reológicas, mucoadesivas e perfil de textura.

- Após a determinação das propriedades estruturais, visa-se avaliar o potencial da formulação como um sistema de liberação tópica por meio dos ensaios de perfil de liberação, a permeação e retenção da hipericina.
- Validar metodologias analíticas para quantificação da hipericina por cromatografia líquida de alta eficiência
- Avaliar a ação fotodinâmica da hipericina sobre leveduras de *Candida albicans* e se formulação é capaz de potencializar o efeito.
- Avaliar a biocompatibilidade das formulações através de ensaios *in vitro* de citototoxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese da hipericina

A HIP utilizada neste trabalho foi fornecida pelo grupo do Professor Anderson Orzari Ribeiro da Universidade Federal do ABC e sintetizada de acordo com metodologia proposta por Aigner e Falk (2008). A síntese envolveu três etapas e iniciou pela produção do composto emodin que, na presença de SnCl_2 , originou o composto emodinantrone. Na segunda etapa, utilizando-se equipamento de microondas, foi realizado o acoplamento de duas moléculas deste antrone para a formação da proto-hipericina. Esta então foi diluída em solvente adequado e irradiada com lâmpada de halogênio, formando a HIP.

3.2. Desenvolvimento das formulações

Os sistemas líquido-cristalinos foram preparados segundo técnica descrita por Chorilli (2009). O preparo de cada um dos pontos do diagrama foi feito da seguinte forma: Quantidades adequadas de ácido oleico, colesterol e Procetyl® AWS foram pesadas e homogeneizadas sob agitação magnética até que a fase oleosa ficasse límpida e sem sinais de partículas agregadas de colesterol. Em seguida, a fase oleosa foi adicionada à uma dispersão de Poloxamer 407 em água. Todas as formulações continham 16% de poloxamer em relação ao peso total do sistema. O preparo de todas as formulações foi feito à temperatura ambiente. As regiões de formação de cristais líquidos foram determinadas por meio da construção de um diagrama de fases pseudoternário. As formulações com volume inicial de 2mL e composição de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% de tensoativo (Procetyl® AWS) e concentrações decrescentes de fase oleosa (ácido oleico e colesterol) de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10%, respectivamente, foram misturadas à dispersões de poloxamer à 16%, cuidadosamente homogeneizadas e armazenadas por pelo menos 48 horas para que atingissem o equilíbrio

3.3. Microscopia de luz polarizada

Uma quantidade reduzida de amostra selecionada foi depositada em uma lâmina e coberta por uma lamínula para observação em um microscópio de luz polarizada. A análise foi feita para avaliar a homogeneidade das formulações selecionadas e para identificar anisotropia, característica indicativa da presença de cristais líquidos.

3.4. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra, um monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento das micas e do ar serão subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro será coletado por 45 segundos, em uma temperatura de 37 °C.

3.5. Determinação do comportamento reológico

3.5.1. Análise reológica contínua

O comportamento reológico contínuo foi estudado através do emprego do reômetro AR2000- TA Instruments® com geometria placa-placa 40 mm e gap de 200 μm . Utilizando o modo *fluency (flow)*, a análise reológica contínua foi realizada ao aplicar uma rampa de fluxo com taxa de cisalhamento de 0 à 100 1/s (ida) e de 100 à 0 1/s (volta) durante 120 segundos. A partir dele, pode-se determinar se o sistema tem fluxo newtoniano ou não-newtoniano e ainda avaliar se o material é tixotópico ou reopético. As análises foram feitas em triplicata e as amostras estavam a 25°C e 37° C.

3.5.2. Análise reológica oscilatória

As análises oscilatórias foram feitas com o reômetro AR2000- TA Instruments® com geometria placa-placa 40 mm e gap de 200 μm e modo amplitude *sweep*, após determinação da região de viscoelástica linear. As análises oscilatórias foram feitas sob tensão constante de 1Pa e frequências de 0 a 10 Hz. As análises foram feitas em triplicata e as amostras estavam a 25°C e 37° C.

3.6 Análise de textura

O perfil de textura foi avaliado empregando analisador de texturas TA-XT Plus, (Stable Micro Systems, Inglaterra). Este equipamento avalia propriedades de textura, tais como compressibilidade, adesividade, dureza e coesão. Os sistemas selecionados foram transferidos para tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD®) e centrifugados por 5 minutos à 3500 rotações por minuto para eliminação de bolhas de ar. Após 24 horas de repouso, o conteúdo dos tubos foi analisado. Em seguida, os tubos foram posicionados de maneira que permitam o acesso da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura com a formulação. No software Exponent Lite®, foram adicionados os parâmetros desejados como a velocidade de compressão e retorno à superfície (0,5 mm/s) e profundidade de entrada da sonda (10 mm). Após a primeira entrada da sonda na amostra, depois de um período de repouso (5 segundos) realiza-se, nas mesmas condições, uma segunda compressão. As amostras foram avaliadas à 25 °C em triplicata.

3.7. Análise de mucoadesão *in vitro*

O teste de mucoadesão também foi realizado no analisador de textura TAXT Plus – Stable Micro Systems®. Discos de mucina foram produzidos através da compressão direta (10 toneladas, 30s) de 250 mg de mucina de estômago de porco tipo II (Sigma-Aldrich). Os discos foram hidratados com fluido vaginal simulado produzido de acordo com a metodologia de Owen e Katz (1999). Os discos foram fixados ao sensor do analisador de textura e entraram em contato com as formulações devidamente termostatizadas à 37°C. Após 1 minuto de contato sob pressão adequada, as superfícies foram separadas a uma razão constante de deslocamento e a força de destacamento (mN) foi obtida. Uma formulação comercial (Amplium G – Mantecorp Farmasa) foi avaliada sob as mesmas condições de diluição com FVS (30, 50 e 100%) e temperatura.

3.8. Validação da metodologia analítica para quantificação da HIP por CLAE

3.8.1. Condições cromatográficas

Os ensaios de validação para quantificação da hipericina foi realizado com base em um estudo publicado na literatura com pequenas variações (KAMAL et al, 2012). As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo líquido Perkin Elmer com detector UV-VIS à 590 nm. Uma coluna de fase reversa C 18 Luna® Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm) foi utilizada durante o estudo. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila, metanol

e tampão acetato de amônio a 10 mM (pH 5.0) em uma razão de 54:36:10 (v/v/v). O fluxo da fase móvel foi operado em modo isocrático com vazão igual a 1 mL/min.

3.8.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada através da injeção dos componentes da fase móvel, da solução receptora e da solução de metanol obtida após a trituração da mucosa suína para o ensaio de retenção no comprimento de onda de 590 nm.

3.8.3. Linearidade

Sete concentrações foram utilizadas para a construção da curva analítica. Uma solução mãe com concentração de 100 µg/mL foi preparada através da solubilização de 1 mg da hipericina em uma quantidade de metanol ou solução receptora suficiente para 10 mL de solução. Em seguida, diluições para as demais concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5, 20 e 50 µg/mL foram preparadas a partir da solução mãe com o mesmo solvente orgânico. As soluções foram filtradas com filtro de membrana PVDF de 0,22 µm. Três curvas analíticas foram obtidas após a injeção das concentrações selecionadas em triplicata. Em seguida, uma curva analítica final foi construída a partir das médias dos sinais obtidos para cada um dos pontos.

3.8.4. Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram realizadas através da injeção em triplicata de três concentrações da curva analítica (baixa, média e alta) no mesmo dia pelo mesmo analista (repetibilidade) e outro dia por um analista diferente (reprodutibilidade). As concentrações de 0,5, 5 e 100 µg/mL foram escolhidas para a realização dessas análises. Ambos parâmetros foram avaliados para as concentrações que foram obtidas através da solubilização da HIP em metanol e na solução receptora.

3.8.5. Robustez

A análise da robustez foi avaliada por meio de pequenas variações em quatro parâmetros dos métodos: pH, comprimento de onda, fluxo e composição da fase móvel. As seguintes variações foram aplicadas: comprimento de onda (589 e 591 nm), pH (5,04 e 5,06), composição da fase móvel (53:37:10 e 55: 35:10 de ACN/MEOH/tampão acetato de amônio) e fluxo (0,9 e 0, 95 mL/min).

3.9. Ensaio de liberação *in vitro* da HIP das formulações

O estudo de liberação da hipericina foi realizado utilizando membrana sintética de polietersulfona 0,45 μm (Sigma-Aldrich), com solução receptora composta por tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 5 acrescida de 3% de polissorbato 80 e incubadas numa estação de dissolução (SR8 Plus) com agitação de 100 rpm à 37, 5 °C por 12 horas, mantendo-se as condições sink. 300 mg das formulações ou solução de fármaco livre com concentração de 2,5 mg/mL foram transferidas para o anel ou copo dosador colocado sobre a membrana disposta na célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas, filtradas com filtro PVDF 0,22 μm e a HIP foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico validado para solução receptora.

3.10. Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da HIP das formulações

Para o ensaio de permeação e retenção, 6 mucosas vaginais suínas com espessura aproximada de 500 μm foram utilizadas por formulação. Aproximadamente 300 mg das formulações foram transferidas para o anel ou copo dosador (área de exposição de 1,77 cm^2) disposto sobre a mucosa no compartimento doador da célula de difusão de Franz. Para a análise da permeação da HIP, utilizou-se uma solução receptora composta por tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 5 acrescida de 3% de polissorbato 80 com agitação de 100 rpm à 37, 5 °C por 12 horas, mantendo-se as condições sink. As amostras foram coletadas, filtradas com filtro PVDF 0,22 μm e a HIP foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico validado para solução receptora. A análise de retenção *in vitro* foi feita logo após o término do ensaio de permeação. As mucosas foram individualmente coletadas e o excesso das formulações foi retirado. As áreas em contato com as formulações foram segmentadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e 4 mL de metanol foram acrescentadas à cada uma delas. Logo em seguida, os fragmentos foram triturados à 11000 rpm no IKA Ultra Turrax por 5 minutos se durante 30 minutos em banho ultrassom. Por fim, os fragmentos foram centrifugados em tubos falcon de 50 mL à 3500 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram retirados, filtrados com filtro PVDF 0,22 μm e a HIP foi quantificada por CLAE utilizando o método analítico validado para metanol.

3.11. Inativação fotodinâmica

O estudo da inativação fotodinâmica ocorreu através da avaliação da viabilidade celular da cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 após exposição à 5, 10 e 15 minutos de irradiação com LED de comprimento de onda igual a 590 nm e intensidade de 16 mW/cm². As concentrações testadas de hipericina foram de 6,25, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A cepa fúngica foi inoculada em meio Agar Sabouraud Dextrose por 24 horas à 37°C. Após o período de

crescimento, uma suspensão na escala 0,5 McFarland foi preparada em caldo TSB e logo em seguida, uma diluição com razão de 1:20 foi preparada. Para os testes feitos com emprego da terapia fotodinâmica, foram adicionados 50 µL da suspensão de leveduras na razão de 1:20 e 50 µL do fotossensibilizador em solução nas quatro concentrações testadas. A combinação foi deixada em repouso por 10 minutos de incubação antes da irradiação nos diferentes tempos. Após a irradiação, foram feitas diluições seriadas a partir do poço tratado. O mesmo procedimento foi realizado sem irradiação para avaliar a toxicidade da hipericina no escuro. Também foram feitos o controle de crescimento com luz e sem fotossensibilizador (L+F-) e o controle de crescimento sem luz e sem fotossensibilizador (L-F-). Todos os testes foram

3.12. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade foi realizada de acordo com a metodologia de Li, Zhou e Xu (2015). A linhagem celular L-929 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de FBS à 37 ° C com 5% de CO₂ em um frasco de 75 cm². Depois de chegar a 75-80% de confluência, as células foram tripsinizadas e a concentração foi ajustada para 2,5. 10⁵ células / mL em uma placa de cultura celular de 24 poços em um volume total de 1 mL e cultivada por 24 h para formação de uma monocamada. Em seguida, as células foram lavadas com PBS pH 7,4. Logo em seguida, um meio composto por 1,8% de ágar e DMEM (1: 1) com 0,01% de solução de resazurina foi adicionado sobre as células. Após a solidificação em ágar, discos de papel de filtro estéreis foram embebidos com formulações e colocados no centro de cada poço, em triplicata. Após 24 horas, a fluorescência foi medida usando um leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®, Winooski, VT, EUA) usando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. As células não tratadas constituíram o controle negativo (células viáveis), enquanto aquelas tratadas com 100% DMSO (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) constituíram o controle positivo (células mortas). Três ensaios independentes foram realizados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diagrama de fases

O diagrama de fases demonstra que a presença do copolímero associado a uma alta concentração de tensoativo ou água leva a formação de uma larga região de cristais líquidos. Porém, sistemas com alta concentração de fase oleosa (acima de 60%), apresentam alta instabilidade e consequente separação de fases. Apenas uma pequena faixa do diagrama apresenta sistemas isotrópicos e transparentes. A formulação escolhida (F33) apresenta 30% de

fase oleosa, 30% de fase aquosa e 40% de tensoativo. Esta formulação foi escolhida porque apresentou alta estabilidade e relativa fluidez quando comparada aos outros sistemas. Além disso, F33 está muito próxima a região de cristais líquidos, logo uma pequena quantidade de fluido vaginal seria necessária para causar a transição de um sistema fluido (microemulsão) para um sistema líquido-cristalino de alta viscosidade.

A partir desse ponto selecionado, quantidades crescentes de muco vaginal artificial foram adicionadas em concentrações de 30, 50 e 100% (p/p) em relação ao peso total da formulação (Ex: Para um sistema com massa de 10 g, seria adicionadas 3, 5 e 10 gramas de fluido vaginal simulado, respectivamente). A adição de fluido vaginal simulado serviu para mimetizar possíveis condições existentes fisiologicamente. Dessa forma, o objetivo foi avaliar se a formulação selecionada formaria um gel no local da aplicação (ou seja, adquiriria viscosidade), bem como as possíveis estruturas e características apresentadas pelos sistemas após o aumento da concentração de muco. Em seguida, os sistemas obtidos foram caracterizados através das seguintes técnicas: Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, reologia, análise do perfil de textura e por ensaios de mucoadesão. Como as propriedades para as formulações com hipericina foram bastante semelhantes as formulações sem fármaco, todos os resultados apresentados são referentes aos sistemas não incorporados.

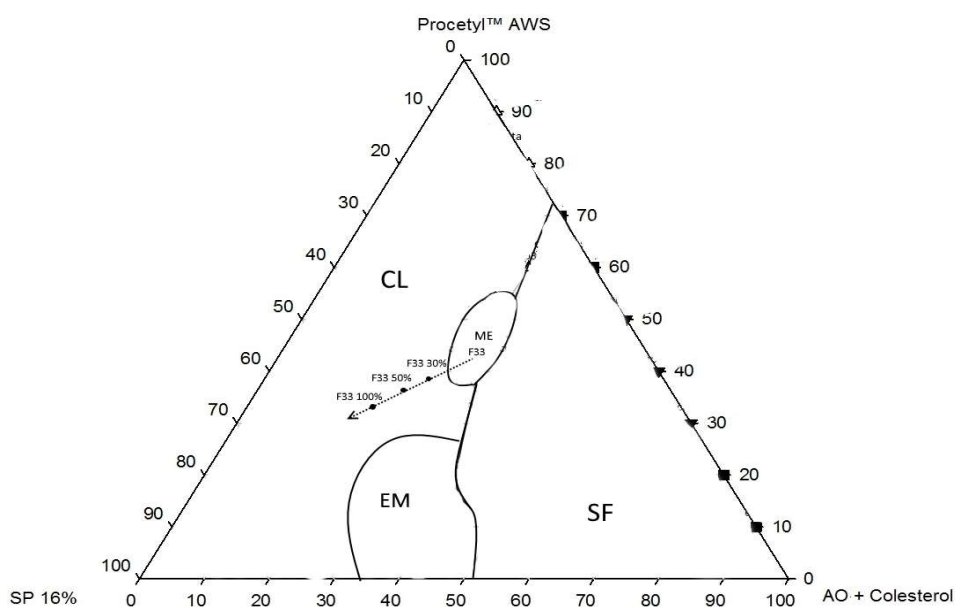


Figura 3. Diagrama de fases compostos por uma suspensão de poloxamer 407 à 16% (SP 16%), Procetyl AWS e ácido oleico e colesterol na razão de 7:1 (AO + colesterol), onde: cristal líquido (CL), emulsão (EM), microemulsão (ME) e separação de fases (SF).

4.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo avalia a interação de ondas raio-X com a os elétrons da matéria. Essa interação faz com que os elétrons oscilem e emitam ondas com mesma frequência que as ondas incidentes a um ângulo de 2Θ , fenômeno conhecido como espalhamento elástico ou espalhamento de Thomson. A diferença entre o vetor da onda incidente e do vetor da onda espalhada é definida como vetor de espalhamento $\mathbf{q}$. O módulo do vetor de espalhamento q é expresso pela seguinte equação (POLIZZI; SPINOZZI, 2015):

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda \quad (1)$$

As ondas espalhadas passam por interferências e são reconhecidas pelo detector de acordo com a densidade eletrônica de regiões presentes na matéria. Ou seja, o equipamento reconhece o contraste entre as densidades eletrônicas presentes na microestrutura do material. Regiões eletrônicas homogêneas são definidas como partículas. Quanto menor o ângulo de espalhamento de uma partícula, maior será sua dimensão (KRATKY, 1982). Além do tamanho, a técnica permite avaliar o formato, peso molecular, estrutura do sistema e provavelmente a densidade eletrônica da matéria. Dessa forma, o SAXS reúne uma série de informação sobre materiais na escala manométrica (CHNABLEGGER, 2013).

O gráfico que contém a curva com o perfil de espalhamento de uma determinada matéria exibe a intensidade de espalhamento em função de q . A intensidade de espalhamento está diretamente relacionada com a concentração da amostra. Em sistemas diluídos e monodispersos, a intensidade de espalhamento é o resultado do somatório das contribuições individuais de cada uma das partículas espalhadoras. Neste caso, a intensidade $I(q)$ depende apenas do fator de forma $P(q)$ (URBAN, 2004):

$$I(q) \propto \sum_n P(q) \quad (2)$$

Já em sistemas onde ocorre interação entre as partículas, a intensidade será proporcional à geometria e ao arranjo característico entre as partículas espalhadoras. Portanto, além do fator de forma, o fator de estrutura $S(q)$ também deve ser considerado na fórmula da intensidade:

$$I(q) \propto \sum_n P(q)S(q) \quad (3)$$

A curva que relaciona a intensidade de espalhamento em função de q pode ser dividida em diferentes regiões: As regiões de Fourier, de Guinier, Porod e de Bragg. A região de Fourier possui menores valores de q e informa sobre o tamanho das partículas, enquanto que a região de Guinier está entre valores intermediários de q e informa sobre o formato das partículas. A

região de Porod possui valores altos de q e informa sobre as características de superfície da partícula. Na região de Bragg, ocorre a difração dos raios-X. Esta região é amplamente utilizada na identificação de estruturas que possuem alto grau de ordem, tais como os cristais líquidos. A alta estruturação dos cristais líquidos leva ao surgimento de picos intensos nas curvas de intensidade de espalhamento. Esses picos são análogos aos picos de Bragg que surgem para materiais cristalinos analisados por raio-X. A relação entre as posições dos picos de Bragg para os cristais líquidos identificam os tipos de mesofases líquido-cristalinas de um sistema (CHNABLEGGER; SINGH, 2013) (Tabela 2):

Tabela 2. Razão entre distâncias dos picos para cristais líquidos lamelares ($L\alpha$), hexagonais ($H_{I/II}$), Cúbicos diamante duplo ($Pn3m$), cúbico primitivo ($Im3m$) e cúbico giróide ($Ia3d$)

Mesofase	Razão entre distância dos picos
$L\alpha$	1:2:3 ...
$H_{I/II}$	$1:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}$
$Pn3m$	$\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{9}$
$Im3m$	$\sqrt{2}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}$
$Ia3d$	$\sqrt{6}:\sqrt{8}$

As figuras 4 e 5 mostraram os resultados obtidos para as formulações com e sem muco. A curva de espalhamento da formulação F33 apresenta um pico largo característico de sistemas isotrópicos das microemulsões. Porém, o aparecimento de um pequeno ombro lateral em $q=0,99$ também foi observado, conferindo uma razão praticamente igual a 1:2 em relação ao primeiro pico, o que pode estar relacionado à presença de uma pequena quantidade de fase líquido cristalina lamelar no sistema. Frank et al (2005) observaram que a introdução de copolímeros anfífilos de bloco provocavam um aumento na eficiência de solubilização de frações iguais de óleo e água. Porém, em altas concentrações de copolímero, mesofases lamelares poderiam coexistir com microemulsões. A presença da mesofase lamelar indica que o sistema provavelmente se encontra próximo a uma região limite de transição de fase e que uma menor quantidade de solvente seria necessária para que a transição ocorresse.

A adição de 30% (p/p) de fluido vaginal simulado em F33 provoca o deslocamento dos picos iniciais para menores valores de q e o surgimento de picos adicionais com razão de 1:2:3 entre as reflexões. Esse comportamento indica que as partículas da fase isotrópica passaram a coexistir com uma maior quantidade de fase lamelar. Maiores diluições provocaram um leve

deslocamento do primeiro pico para valores ainda menores de q e deslocamentos mais significativos entre as fases lamelares. Além disso, pode-se observar que ocorreu uma diminuição na intensidade de espalhamento, bem como um leve alargamento nos picos com o aumento na diluição do sistema. Ou seja, as dimensões dos sistemas aumentam de forma proporcional ao aumento do conteúdo do fluido vaginal na formulação.

Dessa forma, sugere-se que a formulação F33 seja composta por gotículas de água dispersas em uma fase oleosa, podendo ser caracterizado como uma microemulsão do tipo a/o ou como um sistema micelar reverso. As sucessivas adições de FVS seriam acompanhadas por um aumento na solubilização das gotículas, o que acarretaria na transição de fase para um sistema líquido-cristalino lamelar. Porém, mesmo quantidades elevadas de fluido não seriam suficientes para causar uma transição de fase completa, o que pode estar relacionado a maior capacidade de solubilização do fluido pelos sistemas lamelares do que pelas gotículas dispersas. Assim, acredita-se que possa existir a formação de uma rede conectada por interações entre as cadeias polipeptídicas da mucina, que estariam presentes nos domínios aquosos lamelares, e as cadeias poliméricas. O aumento da incorporação do fluido simulado nas regiões lamelares causaria um aumento no espaçamento entre as microestruturas, o que poderia explicar o alargamento dos picos. Considerando que a distância entre as camadas das fases lamelares pode ser expressa pela equação $d=2\pi/q_{\text{máx}}$ (HARTLEY; SHEN, 2012) foram encontrados os valores de d iguais à 8,85, 9,97 e 11,4 Å para 30, 50 e 100% (p/p), respectivamente. Dessa forma, conclui-se que a adição do fluido levou à diminuição da periodicidade das bicamadas de tensoativo devido ao intumescimento fase lamelar.

Tabela 3. Posição e razão entre os picos de Bragg para as formulações sem Hipericina.

Formulação	q1	q2	q3	q4	Razão	Sistema	d (Å)
F33	0,538	0,9765			~1:2	L α + L	
F33 30%	0,3788	0,7076	1,42	2,109	1:2:3	L α + L	8,85
F33 50%	0,366	0,6342	1,280	1,9188	1:2:3	L α + L	9,97
F33 100%	0,3422	0,55	1,1273	1,6707	1:2:3	L α + L	11,4

Tabela 4. Posição e razão entre os picos de Bragg para as formulações com Hipericina.

Formulação	q1	q2	q3	q4	Razão	Sistema	d (Å)
F33	0,55	1,048			~1:2	L α + L	
F33 30%	0,3788	0,7076	1,4115	2,1217	1:2:3	L α + L	8,85
F33 50%	0,3788	0,6709	1,342	2,011	1:2:3	L α + L	9,36
F33 100%	0,3544	0,55	1,0974	1,6574	1:2:3	L α + L	11,4

Além disso, é possível observar a formação de picos transitórios e discretos (indicados por “*” nos gráficos) entre os demais picos bem definidos. A razão entre eles e os picos largos da microemulsão é de aproximadamente 1:2 para os sistemas contendo 50% de fluido simulado e 1:3 para o sistema contendo hipericina e 100% fluido. Isso poderia estar relacionado à formação de outras fases lamelares. Aramaki (2003) e Hossain e colaboradores (2003) identificaram a coexistência entre sistemas lamelares formados após a combinação entre copolímeros anfifílicos e tensoativos não iônicos. Eles identificaram que as cadeias poliméricas apresentavam baixa solubilidade nos domínios lamelares dos tensoativos convencionados devido ao tamanho desproporcional do copolímero em relação aos tensoativos não-iônicos. Nesse caso, se este processo também ocorreu nos sistemas analisados, espera-se que duas mesofases lamelares coexistam com a microemulsão. Porém, mais estudos seriam necessários para identificar se elas realmente estão presentes e qual seria a distribuição dos sistemas tensoativos entre as estruturas formadas.

As fotomicrografias (Figura 6) de cada um dos sistemas apresenta resultados que corroboram com os dados discutidos anteriormente. Regiões de campo escuro são observadas para as microemulsões com e sem fármaco. Após adição do fluido simulado, os sistemas passaram a apresentar anisotropia. Pode-se observar cruzeiros de malta e texturas semelhantes às raia oleosas (QUELLET, et al., 1990) inseridas em uma extensa região de campo escuro.

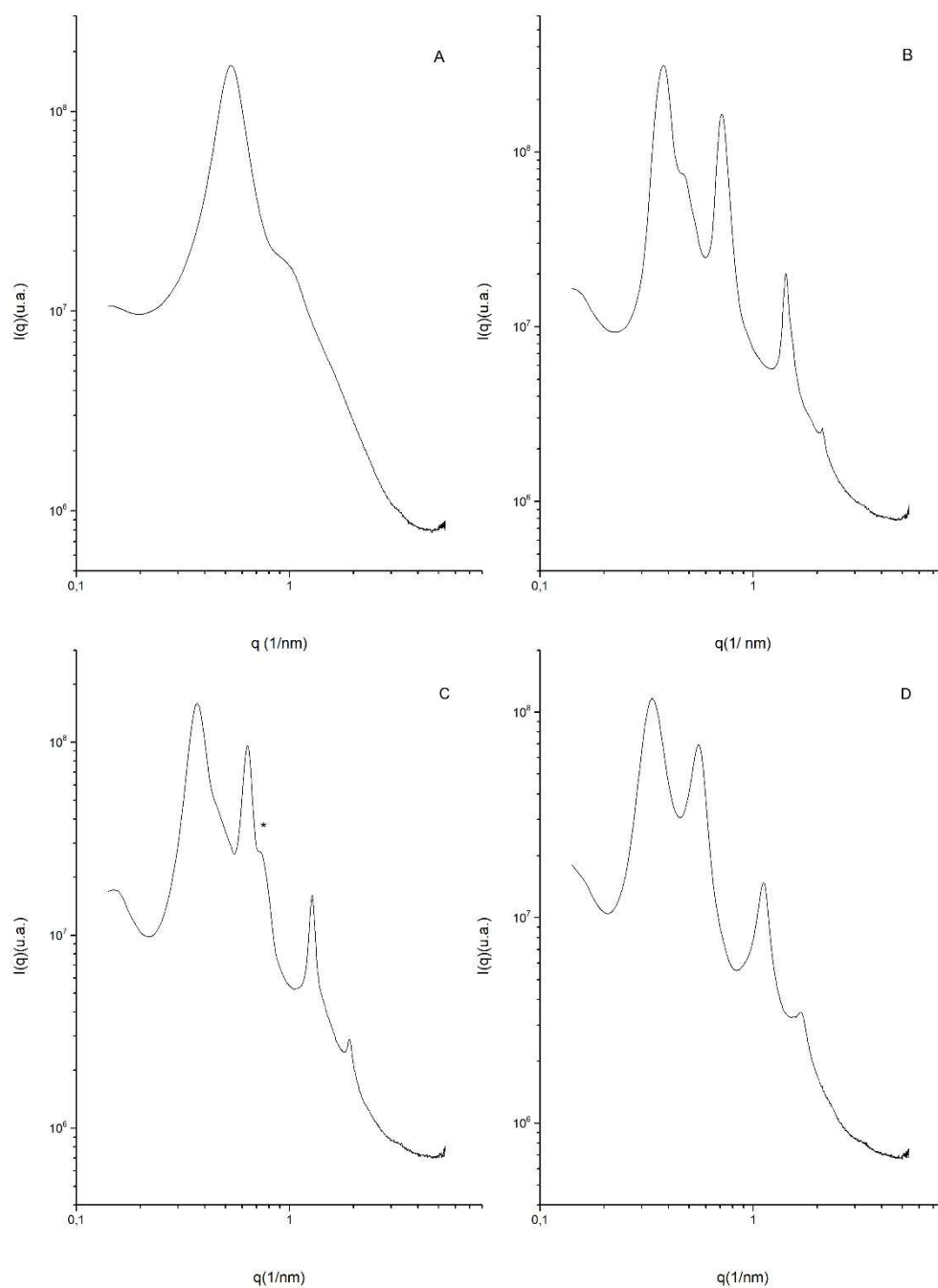


Figura 4. Curvas de espalhamento a baixo ângulo em função do vetor de espalhamento q para as formulações F33 (A); F33 30% (B); F33 50% (C); F33 100%.

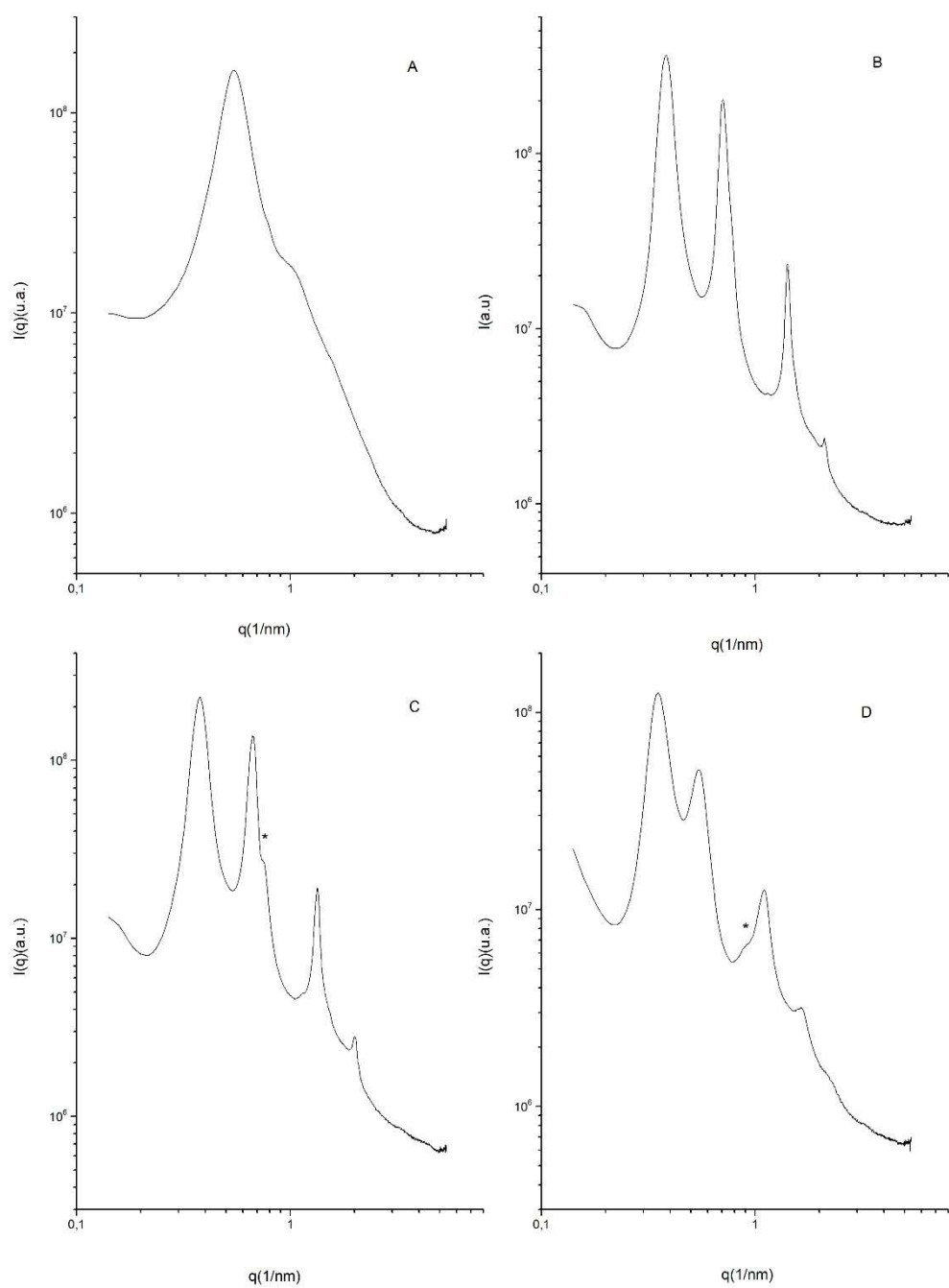


Figura 5. Curvas de espalhamento a baixo ângulo em função do vetor de espalhamento q para as formulações contendo hipericina F33 (A); F33 30% (B); F33 50% (C); F33 100

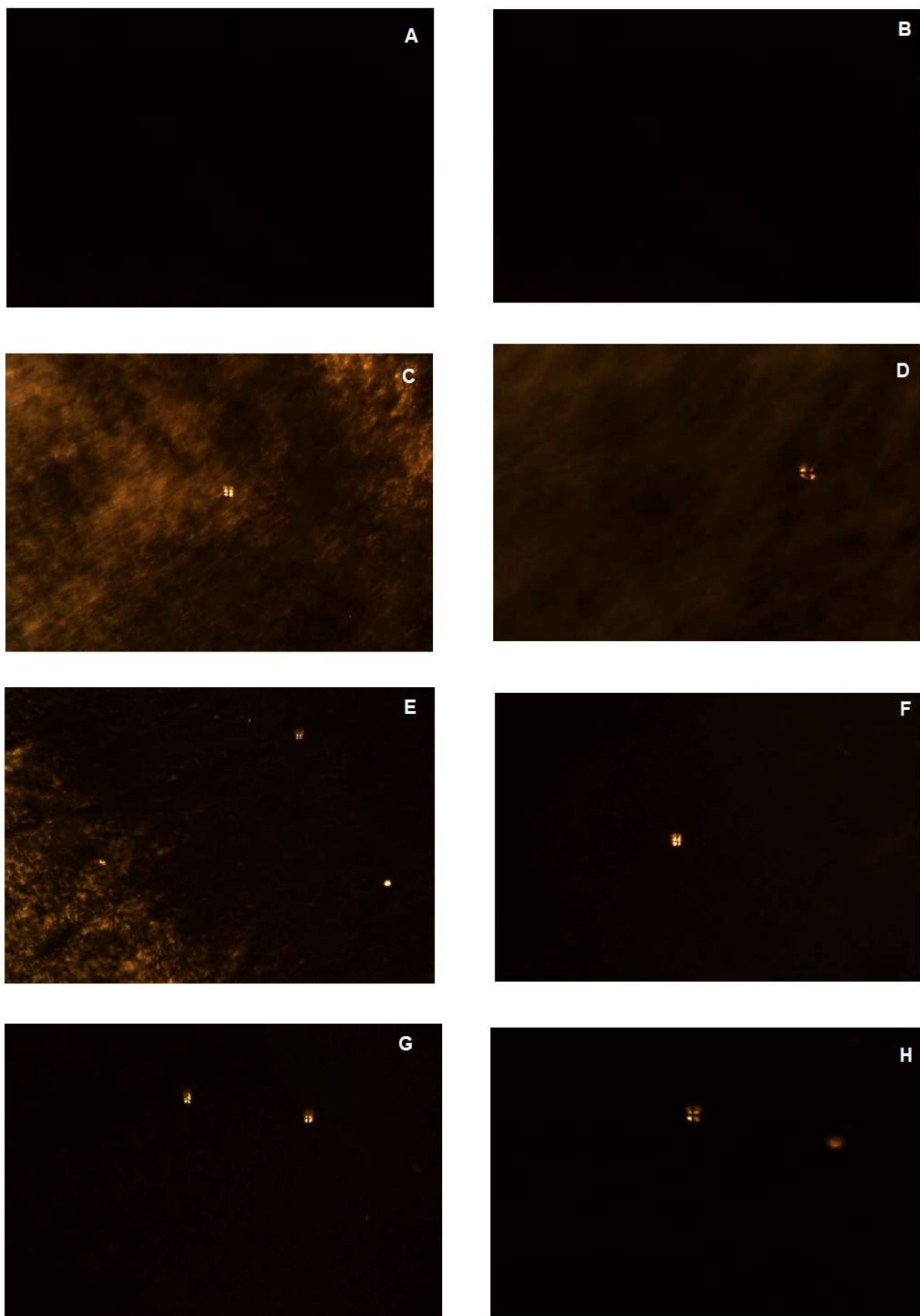


Figura 6. Fotomicrografias sob microscopia de luz polarizada das formulações F33 (A); F33 com hipericina (B); F33 30% (C); F33 30% com hipericina (D); F33 50% (E); F33 50% com hipericina (F); F33 100% (G); F33 100% com hipericina. Aumento de 100 x.

4.3. Determinação do comportamento reológico

4.3.1. Análise reológica contínua

Análise reológica contínua caracteriza o comportamento do fluxo dos materiais. O perfil do fluxo pode ser determinado através da análise de um gráfico que correlaciona a tensão e a taxa de cisalhamento. O gráfico é composto por uma curva ascendente e outra descendente. A primeira curva demonstra o comportamento do material frente ao aumento na taxa de cisalhamento, enquanto que a segunda avalia o efeito inverso.

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos e não-newtonianos a partir da curva ascendente do gráfico. Fluidos newtonianos apresentam uma taxa de cisalhamento proporcional à tensão de cisalhamento aplicada em uma dada temperatura. Dessa forma, considerando que a viscosidade pode ser expressa pela relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento (equação 4), conclui-se que a viscosidade de fluidos newtonianos permanece constante à medida que a tensão de cisalhamento varia. Fluidos que apresentam uma estrutura molecular simples e estável geralmente apresentam comportamento newtoniano. Porém, se essa relação não for constante, um fluido pode ser classificado como não-newtoniano. O fluxo não-newtoniano, por sua vez, seria originado devido à diferença na interação entre moléculas de tamanhos e formas variadas (KAZEMIAN; PRASAD; HUAT, 2010):

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (4)$$

Onde “ τ ” é a tensão 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). Fluidos não-newtonianos podem ainda ser subdivididos em pseudoplásticos, dilatantes e viscoplásticos. Os fluidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição na viscosidade aparente à medida que a tensão de cisalhamento aumenta. Já os fluidos dilatantes são geralmente soluções concentradas que exibem comportamento oposto ao pseudoplástico, ou seja, a viscosidade aparente dos materiais aumenta rapidamente com o emprego de tensões crescentes. O comportamento viscoplástico ocorre quando existe um limite de tensão a ser ultrapassado para que o material possa sofrer deformação, também conhecida como tensão de escoamento. Porém, ao contrário dos demais fluidos, a curva ascendente do gráfico não parte da origem. Na ausência de ações externas superiores à esse estresse limite, o fluido permanece com uma estrutura rígida e apresenta alta resistência ao fluxo. Porém, se uma tensão superior ao limite for aplicada, o fluido poderá apresentar comportamento newtoniano ou pseudoplástico (CHHABRA, 2010).

Já a curva decrescente de um gráfico de análise reológica contínua informa sobre se o material deformado é tixotrópico ou reopético. Esses fenômenos estão relacionados à recuperação da microestrutura após deformação em relação ao tempo (BARNES, 1997). Tixotropia pode ser definida como um efeito tempo-dependente em que ocorre a diminuição da viscosidade aparente do sistema sob deformação seguida de uma recuperação gradual da microestrutura (MEWIS, 1979). Já os reopéticos, por outro lado, recuperam a microestrutura inicial após o aumento da viscosidade do sistema.

A Figura 7 demonstra a análise reológica contínua da formulação F33 com e sem adição de muco artificial vaginal a 25°C. A formulação F33 apresenta comportamento newtoniano, o que é evidenciado através da relação linear constante entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, onde uma reta parte da origem dos eixos. Apesar da tendência à estruturação observada pela técnica de espalhamento a baixo ângulo, a formulação F33 ainda apresenta características semelhantes à microemulsões. FERREIRA et al. (2015) também observaram um comportamento de fluxo newtoniano para uma região de transição de microemulsão para cristal líquido lamelar. Eles atribuem esse fenômeno ao fato de que as possíveis forças interagindo estruturalmente não seriam suficientemente grandes para evitar deformações irreversíveis em relação ao cisalhamento. Porém, a microemulsão apresentou um leve desvio do comportamento Newtoniano para pseudoplástico, bem como o aparecimento de tixotropia à 37° C. Essa alteração estaria provavelmente relacionada à migração do formato esférico das gotículas para um formato cilíndrico (SHRESTHA, 2010).

Após adição do fluido simulado, os sistemas passaram a exibir comportamento viscoplástico tanto a 25° quanto a 37°C. Apesar da presença de sistemas microemulsionados, as curvas de fluxo ascendentes apresentaram predominantemente características semelhantes aos cristais líquidos lamelares. A tensão de escoamento é definida primariamente como um fenômeno químico que ocorre devido às interações intermoleculares na microestrutura do sistema (FUNK; DINGER, 1994). À 25° C, foi observado que o valor limite de tensão para que as amostras contendo 30 e 50% (p/p) de fluido sofressem deformação foi semelhante, enquanto que a formulação contendo maior quantidade de fluido apresentou uma maior resistência ao fluxo. Já a 37° C, menores tensões críticas foram necessárias para provocar deformações devido ao aumento do movimento Browniano do sistema (ZHAO et al, 2011). Porém, de uma forma geral, conclui-se que a adição do fluido simulado levou a um aumento no número de interações no sistema.

O emprego de um material plástico favorece a permanência da formulação no local da aplicação de forma dependente da tensão de escoamento. Portanto, a formação *in situ* desses sistemas de liberação na cavidade intravaginal provavelmente contribuiria com o aumento da mucoadesão. Além disso, como F33 100% apresentou maior tensão de escoamento, portanto espera-se que este sistema apresente uma maior mucoadesão quando comparada às demais.

Tensões superiores à tensão de escoamento levaram a uma diminuição gradativa da viscosidade da formulação devido ao alinhamento das fases lamelares em direção ao fluxo. Esse alinhamento ocorre principalmente devido ao deslizamento das estruturas lamelares entre as fases aquosas ou oleosas do sistema após o rompimento das interações conectivas (ZHAO et al, 2011).

Dessa forma, de acordo com a equação (4) e os valores de k (índice de consistência) e n (índice de fluxo), podemos confirmar o comportamento do fluxo das formulações. Fluidos dilatantes apresentam $n > 1$, fluido newtonianos apresentam $n = 1$ e $n < 1$ indica um fluido pseudoplástico. Assim, de acordo com a Tabela 5 podemos concluir que a formulação apresenta comportamento newtoniano devido à proximidade do valor de n ao número 1, porém ocorre um pequeno desvio desse comportamento com o aumento da temperatura, conforme constatado anteriormente. A adição de fluido vaginal causou uma diminuição expressiva nos valores de n , indicando que os fluidos se tornaram pseudoplásticos, bem como um aumento do valor de k , que está associado à viscosidade do sistema.

Tabela 5. Índices de consistência (k) e índice de fluxo (n) para os sistemas À 25 e 37°C

Formulação	25°C		37°C	
	K	n	K	n
F33	8,82	0,97582	16,24	0,91261
F33 30%	24,82	0,82839	73,006	0,58576
F33 50%	116,53	0,4515	62,25	0,52694
F33 100%	764, 06	0,0011	242,39	0,2135

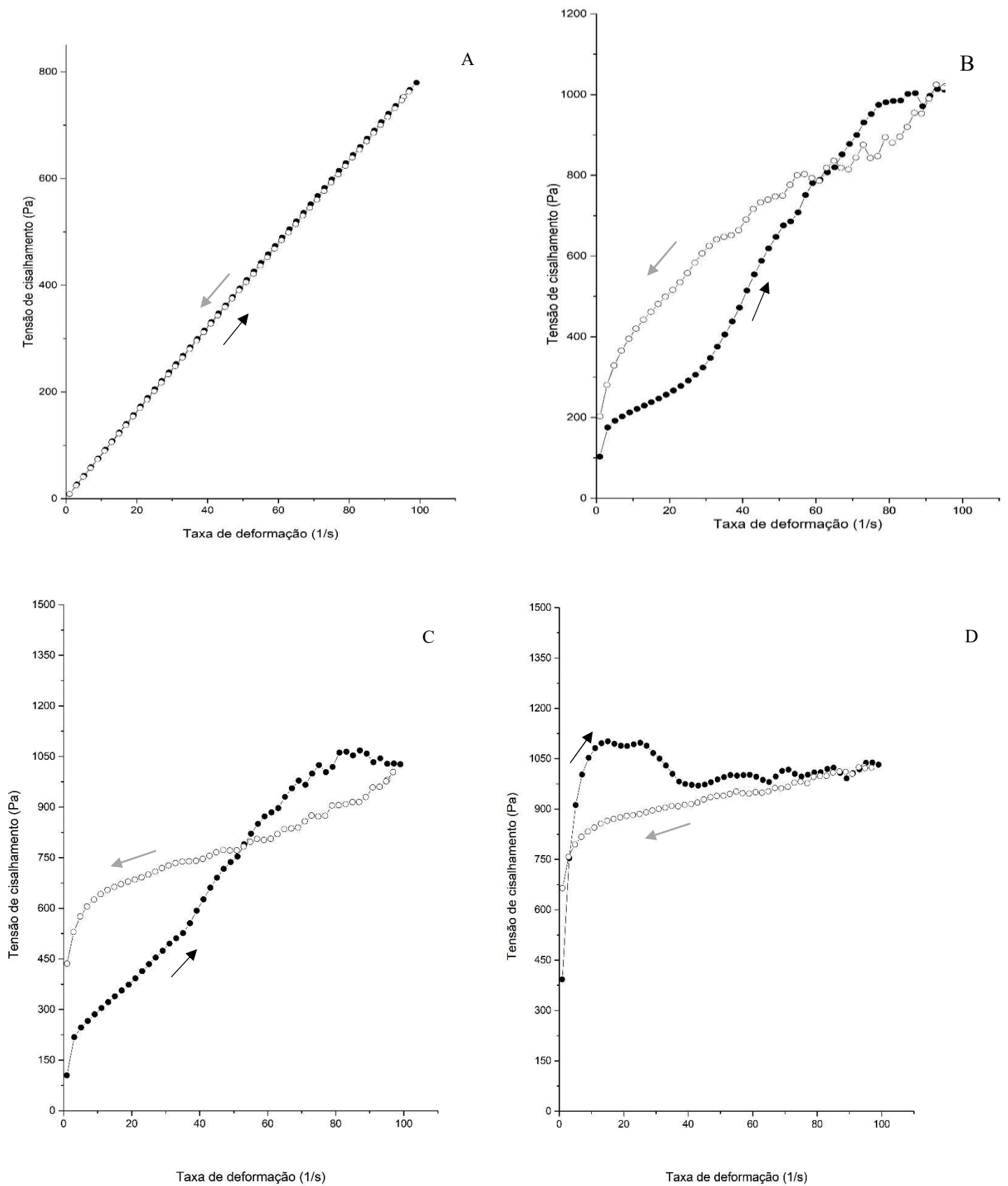


Figura 7. Curvas ascendentes (símbolo fechado e seta preta) e descendentes (símbolo aberto e seta cinza) em função da tensão e taxa de cisalhamento a 25°C, onde: A) F33; B) F33 30%; C) F33 50%; D) F33 100%

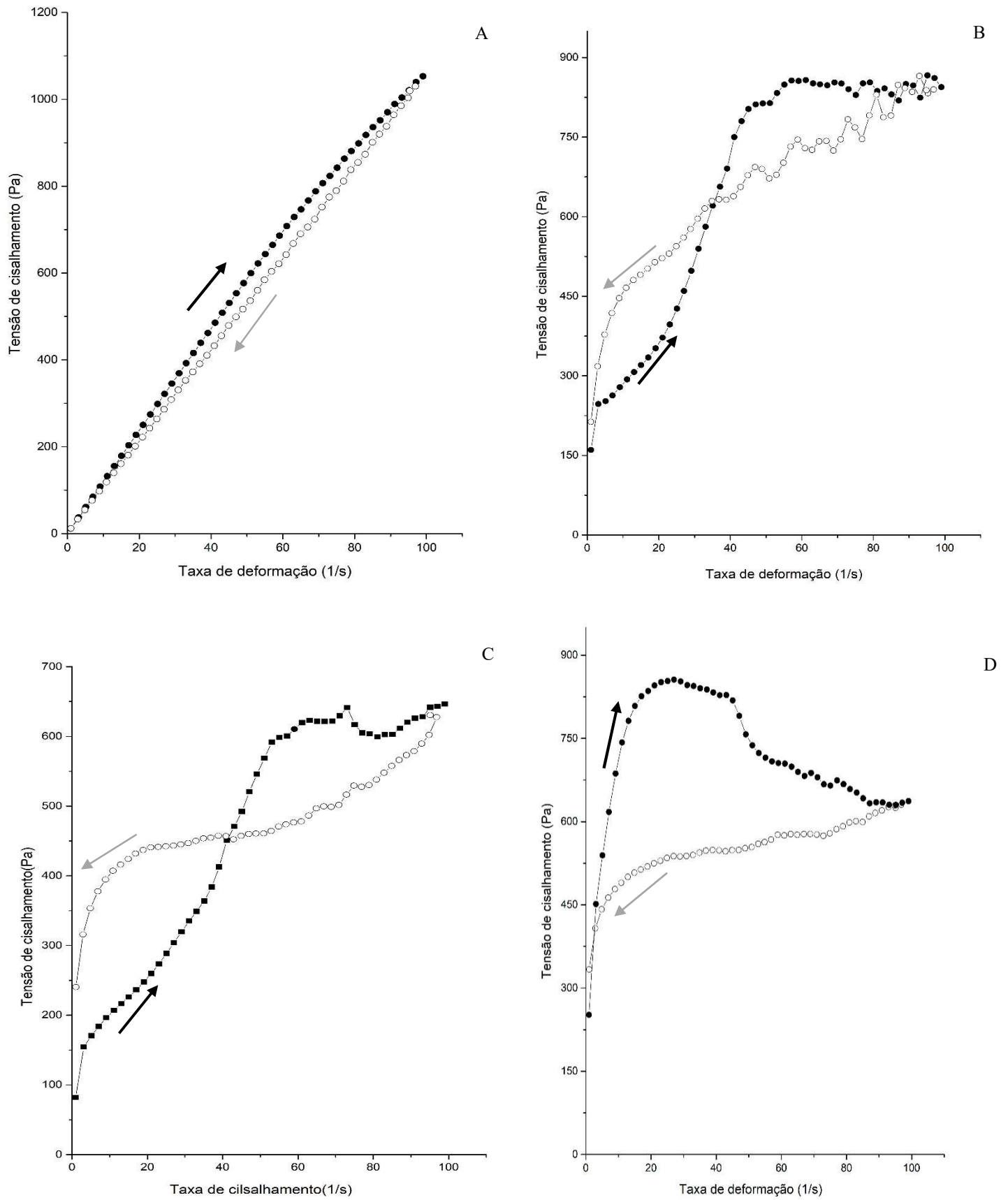


Figura 8. Curvas ascendentes (símbolo fechado e seta preta) e descendentes (símbolo aberto e seta cinza) em função da tensão e taxa de cisalhamento a 37°C, onde: A) F33; B) F33 30%; C) F33 50%; D) F33 100%

Diferentes comportamentos foram observados para as curvas descendentes em ambas temperaturas. F33 30% e F33 50% apresentaram um comportamento tixotrópico–antitixotrópico em ambas temperaturas tanto à 25 e à 37°C (Figuras 7 e 8). SOLTERO e colaboradores (1994) demonstram que o comportamento tixotrópico–antitixotrópico é dependente do histórico de deformação previamente sofrido, bem como o valor máximo e razão da variação da tensão aplicada. A rápida reestruturação em uma região de baixa taxa de cisalhamento ocorre devido à maior probabilidade de formação de ligações entre as partículas dispersas do material. O aumento da concentração de fluido simulado nos sistemas levou a um retardo na interação entre as cadeias.

Já F33 100% apresentou uma proeminente área de histerese com diminuição da tensão de cisalhamento em ambas temperaturas (Figuras 7 e 8). O comportamento tixotrópico ocorre devido ao elevado número de interações entre os domínios lamelares. Logo, um maior período de tempo seria necessário para reestabelecer a estrutura original da formulação. Notou-se ainda que a área de histerese aumentou à 37°C, o que seria explicado mais uma vez tanto pelo aumento na desordem do sistema (ZHAO et al, 2011), quanto devido a uma desestruturação promovida pelo cisalhamento. Verifica-se que após atingir um platô, a curva descendente diminui progressivamente a partir de uma determinada tensão aplicada.

4.3.2. Análise reológica oscilatória

Os testes oscilatórios dependentes de frequência fazem parte de um dos métodos mais comumente empregados para provar a viscoelasticidade de fluidos e coloides. As medidas são realizadas sob deformação constants na região viscoelástica linear, o que garante a preservação da microestrutura dos materiais analisados, bem como mimetizam as deformações sofridas em condição de repouso (WYSS, 2016).

A viscoelasticidade é o fenômeno que indica que uma dada substância possui tanto propriedades elásticas (característico de sistemas sólidos) quanto viscosas (característico de líquidos). Os testes de viscoelasticidade comparam a tensão exercida pela oscilação (frequência) e a deformação sofrida pelo sistema. Dessa forma, quanto maior a elasticidade, ou seja, a quanto maior for a recuperação da força exercida, mais próximo de um sólido o material estará, enquanto que maiores dissipações de energia são inerentes aos líquidos. A relação entre tensão exercida e deformação é expressa pelo módulo complexo de cisalhamento (G^*):

$$G^* = G' + iG'' \quad (5)$$

Onde G' é o módulo de armazenamento, i é um número complexo e G'' é o módulo viscoso. G' é definido como o componente elástico e parte real de G^* , enquanto que G'' é considerado como o módulo de perda e como a parte imaginária de G^* . Assim, a microestrutura de um sistema pode ser classificada qualitativamente ao observar a relação entre os dois módulos. Quando: $G' \gg G''$, o sistema estará quimicamente interligado; $G' > G''$, indica que ligações de ordem secundárias são predominantes; $G' < G''$, interações físicas predominam (CEULEMANS; LUDWIG, 2002).

A Figura 9 demonstra que F33 em temperatura ambiente apresenta $G'' > G'$, o que indica que a formulação é predominantemente fluida. Porém os sistemas passaram a apresentar um reograma semelhante a géis após a adição de fluido vaginal simulado. Observou-se que não existiu diferença nos módulos avaliados após a adição de 30 e 50% (p/p) de fluido vaginal para as formulações, uma vez que existe praticamente uma sobreposição das curvas de G' e G'' para essas diluições. Mas, após adição de 100% (p/p) de fluido simulado, o módulo G' aumentou significativamente. Os módulos elásticos de F33 30% e F33 50% foram aproximadamente 30 vezes maior que o de F33, enquanto que o módulo elástico de F33 100% foi aproximadamente 100 vezes maior. O aumento do módulo G' após adição muco poderia ser explicado devido à formação de uma rede elástica resultante do aumento entre interações internas e entre os microdomínios dos cristais líquidos. Assim, a adição de muco contribuiria para o aumento nas interações do tipo ponte de hidrogênio entre as cadeias etoxiladas do co-polímero e a água, bem como com as cadeias proteicas de mucina, que são conhecidas por possuírem oferecer vários pontos possíveis para formação de ligações de hidrogênio (MATSUMURA, 1996).

Em temperatura fisiológica, uma diminuição do módulo G' foi observada para todas as formulações, exceto F33 30%. Dessa forma, F33 30% passou a ter propriedades estruturais comparáveis às de F33 100% à 37° C. Nota-se também que apesar de apresentarem características semelhantes à temperatura ambiente, F33 30% e F33 50% passam a ter comportamentos distintos após aquecimento. Sugere-se que a elevação na temperatura poderia levar a uma alteração na curvatura dos tensoativos empregados na estabilização das gotículas da microemulsão presente em F33 30% - que provavelmente está presente em maior quantidade em relação às outras formulações contendo fluido simulado- o que causaria um rearranjo da estrutura do sistema. Porém, mais estudos seriam necessários para confirmar essa hipótese.

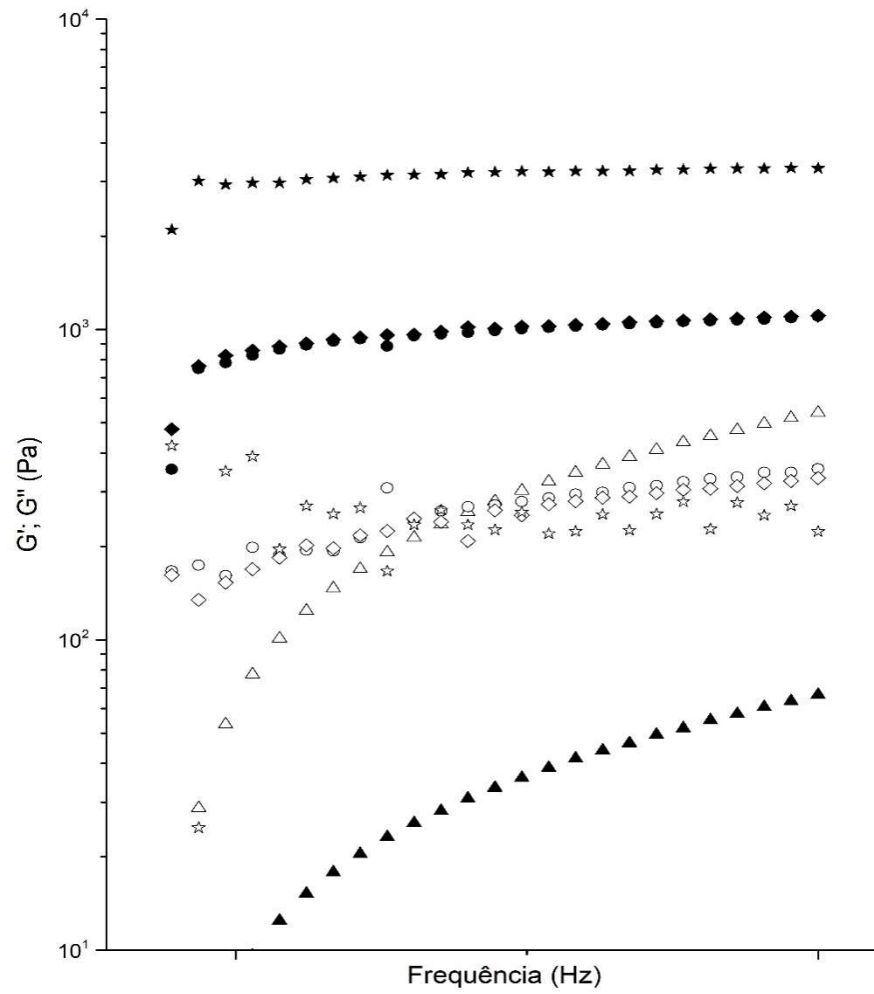


Figura 9. Módulo elástico (símbolos fechados) e módulo viscoso (símbolos abertos) para F33 (▲), F33 30% (●), F33 50% (◆) e F33 100% (★) à 25°C.

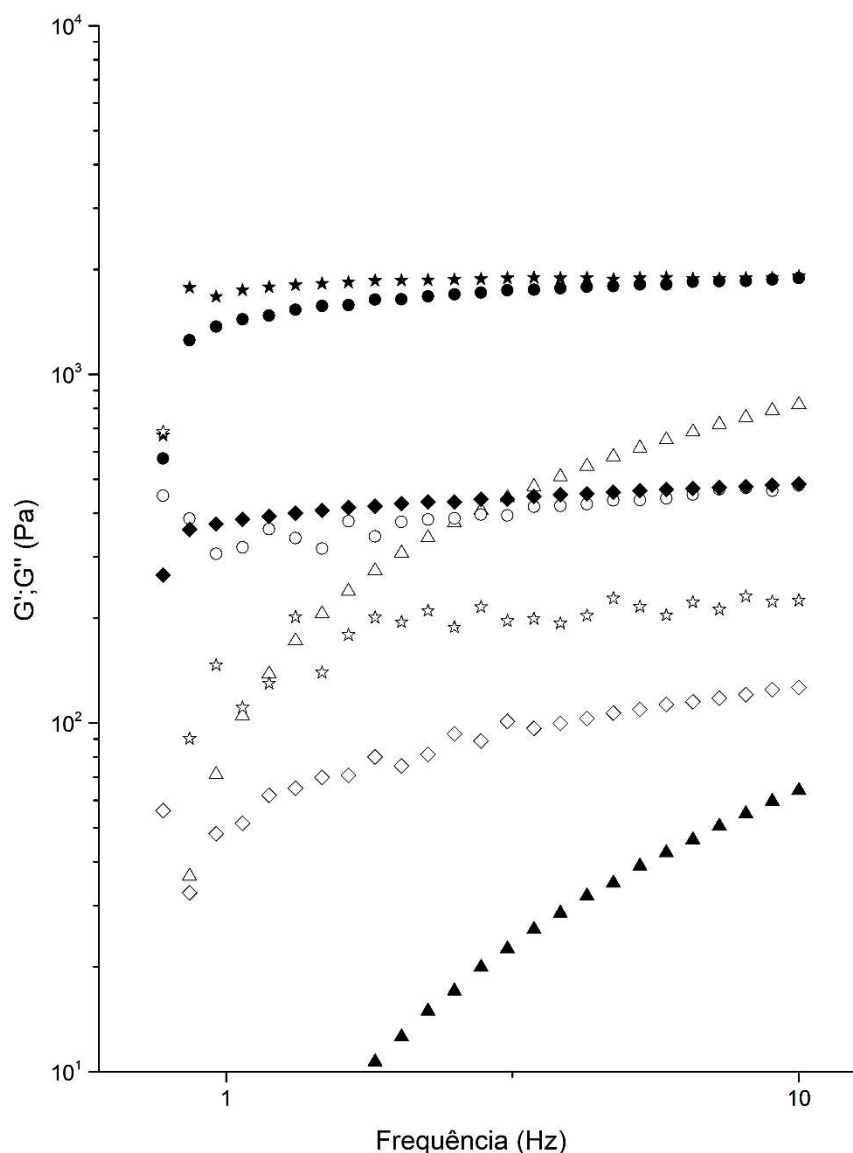


Figura 10. Módulo elástico (símbolos fechados) e módulo viscoso (símbolos abertos) para F33 (▲), F33 30% (●), F33 50% (◆) e F33 100% (★) à 37°C.

4.4. Perfil de textura

A análise de perfil de textura é uma técnica complementar à reologia que tem como objetivo avaliar as propriedades mecânicas de materiais semissólidos. Diferentes parâmetros tais como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão podem ser avaliados durante o ensaio (WANG, Z.2008). O método consiste basicamente em três estágios: Primeiro ocorre a introdução de uma sonda cilíndrica, a uma velocidade constante, no interior da amostra semissólida até atingir uma determinada profundidade (GRATIERI, T.2010). Durante a primeira compressão da amostra, obtêm-se os valores de dureza (força máxima necessária para causar uma dada

deformação) e compressibilidade (trabalho necessário para causar uma deformação) da amostra. Logo em seguida, a sonda analítica é retirada e depois reinserida novamente na amostra. Durante o período de retirada da sonda, a adesividade (trabalho necessário para superar as forças atrativas entre as superfícies da sonda e da amostra) seria determinada. Por fim, após a reinserção da sonda, a coesão (razão entre os trabalhos realizados entre a segunda e a primeira compressão) é obtida (JONES, WOOLFSON, e DJOKIC, 1996). A Figura 11 exibe uma curva de força-distância obtida durante a análise.

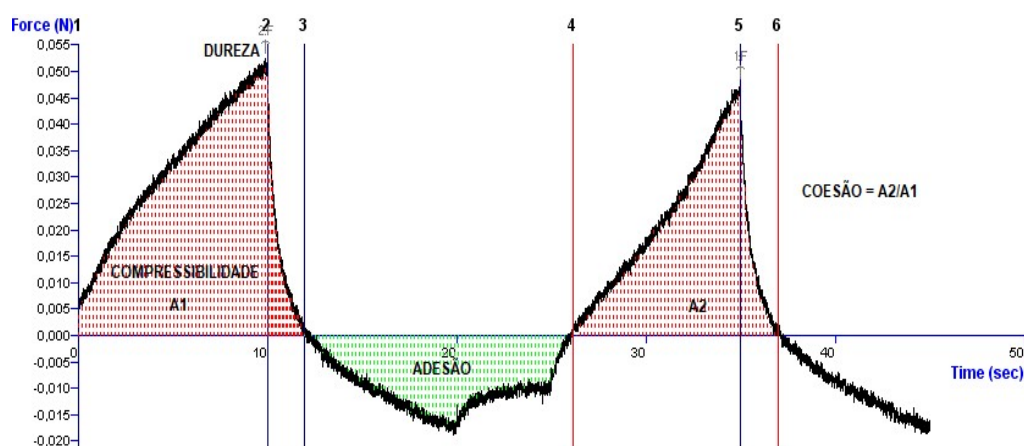


Figura 11. Curva força-distância

Os dados da Tabela 8 evidenciam que os parâmetros de textura das amostras corroboram com as características reológicas discutidas anteriormente. Podemos observar que F33 30% e F33 50% apresentaram resultados semelhantes em todos os parâmetros, enquanto que, com exceção da coesão, os valores dos parâmetros para F33 100% foram significativamente maiores. Assim, durante o primeiro ciclo de compressão, ao compararmos F33 100%% com os demais sistemas percebemos que a probe precisou exercer uma força quatro vezes maior sobre F33 100% para causar uma deformação semelhante à causada nas outras formulações. Essas observações reforçam o conceito de que o aumento da quantidade de muco no sistema leva a formação de uma rede elástica entre os domínios dos cristais líquidos. Além disso, os parâmetros de dureza e compressibilidade estão relacionados com a aceitabilidade da formulação pelo público alvo, pois estão ligados à fatores sensoriais. O valor da adesividade de F33 100%, por sua vez, serviu como indicativo de que esse sistema apresenta melhores propriedades mucoadesivas.

Tabela 8. Parâmetros de textura para formulações contendo muco artificial à 25° C

	Dureza	Compressibilidade	Adesividade	Coesão
F33 30%	5,713 ±0,15	38,313 ± 0,19	0,163 ± 0,01	0,647 ± 0,02
F33 50%	5,095 ±0,17	35,096 ± 0,64	0,149 ± 0,01	0,659 ± 0,04
F33 100%	21,3 ± 0,71	157,376 ± 6,02	0,955 ± 0,01	0,699 ± 0,69

4.5. Mucoadesão

A Figura 12 expressa os resultados relativos às forças de mucoadesão estabelecidas entre as superfícies dos sistemas analisados com os discos de mucina. Pode-se observar que quando comparado a F33, a forças necessárias para ocorrer o destacamento entre as superfícies aumentam com a incorporação de muco vaginal. Todos os sistemas contendo muco vaginal artificial foram significativamente mais mucoadesivos do que F33. Sistemas que apresentam maior resistência ao fluxo e propriedades mecânicas semelhantes aos materiais sólidos provavelmente aumentam o tempo do estágio de contato entre as superfícies. Após o contato inicial, diferentes forças de atração (tais como ligações iônicas, covalentes, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e de van der Waals podem contribuir no processo de mucoadesão (KARAVANA, 2012). Porém, observou-se também que apesar de o sistema F33 30% apresentar uma maior tendência à estruturação à 37°C, ele não apresentou uma mucoadesão semelhante a F33 100%.

Após o estágio de contato, um estágio de consolidação seria necessário para que os materiais mucoadesivos pudessem permanecer por mais tempo em contato com o muco. Duas principais teorias estão relacionadas à esse estágio: Os efeitos de interpenetração e de desidratação. A teoria de interpenetração está relacionada com a capacidade de cadeias poliméricas de matérias mucoadesivos interagirem com as cadeias de glicoproteínas do muco. A segunda teoria é atribuída aos matérias capazes de gelificarem rapidamente em ambiente aquoso. A elevada afinidade desses materiais pela água causaria um processo de desidratação da camada de gel de muco, o que forçaria a interação entre as duas superfícies devido ao surgimento de uma alta pressão osmótica (SMART, 2014). Quando comparamos uma formulação comercial (FC) contendo as mesmas proporções de fluido vaginal simulado (30%, 50% e 100%), podemos observar que a formulação comercial apresenta um comportamento contrário à F33, uma vez que o aumento gradual do fluido simulado leva à uma diminuição expressiva na mucoadesão da formulação. Portanto, notou-se que ao contrário de muitas

formulações convencionais, a incorporação de muco vaginal na formulação ajudou no aumento da organização do sistema e no aumento das propriedades mucoadesivas.

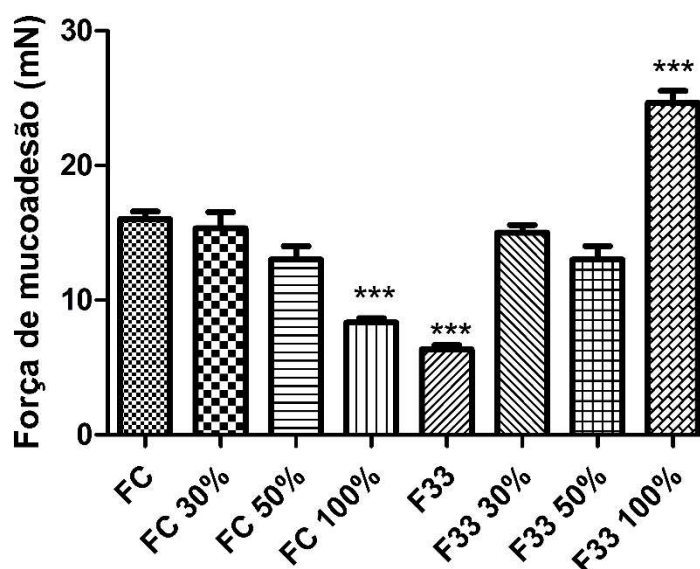


Figura 12. Força de mucoadesão em mN para F33 e formulação comercial (FC) sem e com diferentes proporções de fluido simulado (30, 50 e 100%).

4.6. Validação do método analítico para quantificação da hipericina em metanol

4.6.1. Seletividade

A seletividade é o parâmetro que informa sobre a capacidade do método de avaliar a presença da substância desejada de forma não equivocada mesmo na presença de interferentes. O método apresentou boa seletividade e não foram observadas influências dos componentes da fase móvel no formato ou detecção dos picos.

4.6.2. Linearidade

Três curvas analíticas foram obtidas após a injeção das concentrações selecionadas em triplicata. Em seguida, uma curva analítica final foi construída a partir das médias dos sinais obtidos para cada um dos pontos. Os coeficientes de variação (%CV) calculados estavam abaixo de 5% e o coeficiente de correlação (r^2) foi superior à 0,99, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2017).

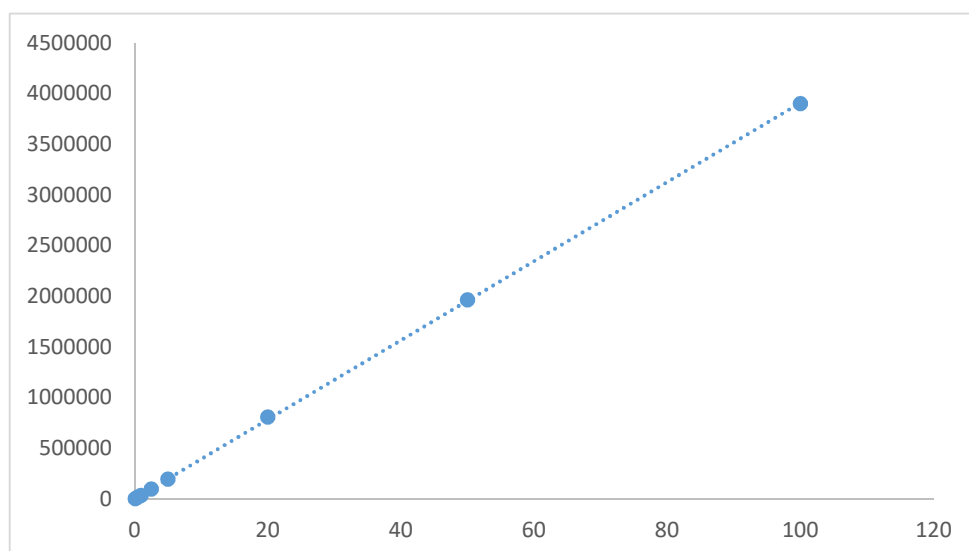


Figura 14. Curva analítica obtida por regressão linear para a hipericina em metanol

Tabela 9. Parâmetros obtidos a partir da curva analítica

Equação da reta	$y = 39056x + 4956,4$
Coefficiente de correlação (r^2)	0,999

O gráfico de resíduos comprova que existe proporcionalidade entre o sinal da área obtida em função da concentração dentro da faixa analisada. A análise dos dados estatísticos por ANOVA indicou que não existiu diferença significativa entre os dados reais obtidos e os valores ajustados obtidos na regressão linear, uma vez que o valor de F calculado foi menor que o F tabulado.

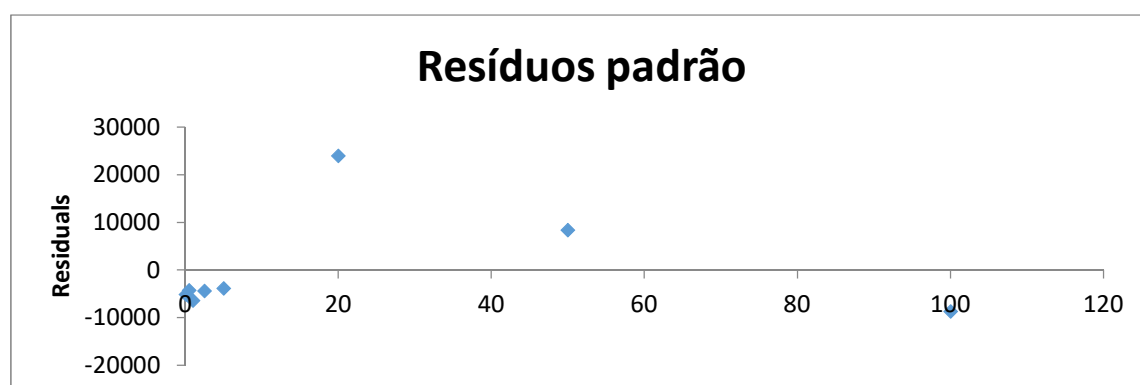


Figura 15. Gráfico dos resíduos padrão para curva analítica em metanol

Tabela 10. Resultados do teste estatístico ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	1	$1,36.10^{13}$	$1,36. 10^{13}$	97227,57	$7,34. 10^{-14}$
Resíduos	6	$8,4.10^8$	$1,4.10^8$		
Total	7	$1,36.10^{13}$			

4.6.3. Precisão e exatidão

Precisão é definida como a proximidade entre as respostas detectadas entre medidas individuais de uma amostra em determinadas condições. Já a exatidão informa a proximidade entre o valor teórico e o valor real quantificado por intermédio da curva de calibração. Pode-se concluir que o método foi preciso e exato, assim como os dados das Tabelas 11 e 12 evidenciam. As análises apresentaram coeficiente de variação menor que 5% para precisão e percentuais de recuperação entre 80 e 120%, estando conforme mais uma vez com os pré-requisitos da ANVISA (BRASIL, 2017).

Tabela 11. Precisão intra-dia (repetibilidade) e intermediária (reprodutibilidade)

Concentração (<u>µg/mL</u>)	<u>Repetibilidade</u>		Reprodutibilidade	
	Área	Coeficiente de variação (CV%)	Área	Coeficiente de <u>variação</u> (CV%)
0,5	17786,988	4,204	17670,01692	1,439
5	189562,805	1,884	210460,5723	1,735
100	4085190,333	1,865	4037223,133	2,051

Tabela 12. Exatidão intra-dia (repetibilidade) e intermediária (reprodutibilidade)

Concentração (<u>µg/mL</u>)	<u>Repetibilidade</u>		<u>Reprodutibilidade</u>	
	Valor	Percentual de	Valor	Percentual de
	experimental (<u>µg/mL</u>)	recuperação (%)	experimental (<u>µg/mL</u>)	recuperação (%)
0,5	0,43	86,4	0,47	94,4
5	4,73	94,7	4,74	94,8
100	94,5	94,6	99,5	99,5

4.6.4. Robustez

Robustez é definida como a capacidade de um método analítico resistir à pequenas variações experimentais. O aumento do pH levou à um maior tempo de retenção, porém, as demais variações não causaram mudanças significativas no valor das áreas, nem no tempo de retenção ou recuperação da amostra (Tabelas 13-16). Todas as análises foram feitas para a concentração de 5 µg/mL.

Tabela 13. Variação da vazão de 1 mL/min para 0,90 ou 0,95 mL/min

	<u>Fluxo de 0,90 mL/min</u>			<u>Fluxo de 0,95 mL/min</u>		
	Área	Tempo de retenção	Percentual	Área	Tempo de retenção	Percentual
			de recuperação (%)			de recuperação (%)
Média	203917,33	11,040		215676,22	11,547	
DP	8877,42	37,64306045	101,8	1457,02	131,089028	107,9
CV	4,35	0,34096975		0,947	1,1352320	

Tabela 14. Alteração da razão entre acetonitrila: metanol

	Fase móvel (53:37:10)			Fase móvel (55:35:10)		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	188139,01	11.384		179839,32	11.556	
DP	6289,01	89,02996	93,8	3701,80	11,815	89,5
CV	3,342	0,782039		2,058	1,0225	

Tabela 15. Efeito da mudança do comprimento de onda

	589 <u>nm</u>			591 <u>nm</u>		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	201290,3	10.872		214768,3	10.954	
DP	3815,240	96,99484522	100,5	3050,402	365,6915	107,4
CV	1,895391	0,892152734		1,420322	3,338328	

Tabela 16. Efeito da mudança no pH

	<u>pH</u> 5,04			<u>pH</u> 5,06		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	197345,9	11.585		211076,2	13.030	
DP	2609,430	228,421394	98,5	8525,296	89,7162	98,5
CV	1,322261	1,97164283		4,038967	0,688535	

4.7. Validação do método analítico para quantificação da hipericina no meio receptor

4.7.1. Seletividade

Assim como o método para quantificação da hipericina em metanol, nem o meio receptor e nem os componentes da fase móvel influenciaram no formato ou detecção dos picos.

4.7.2. Linearidade

Podemos observar que também existe correlação entre os sinais obtidos e as concentrações testadas de hipericina no meio receptor. Os coeficientes de variação (%CV) calculados estavam abaixo de 5% e o coeficiente de correlação (r^2) foi superior à 0,99, conforme preconizado pela ANVISA (Brasil, 2017). Os dados estatísticos também indicaram que não existiu diferença significativa entre os valores obtidos e ajustados.

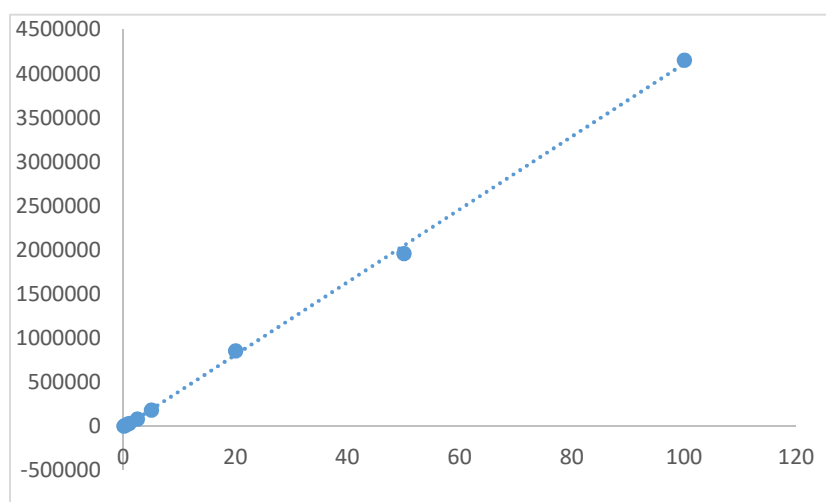


Figura 16. Curva analítica obtida por regressão linear para a hipericina em solução receptora

Tabela 17. Parâmetros obtidos a partir da curva analítica

Equação da reta	$y = 41317x - 14115$
Coeficiente de correlação (r^2)	0,992

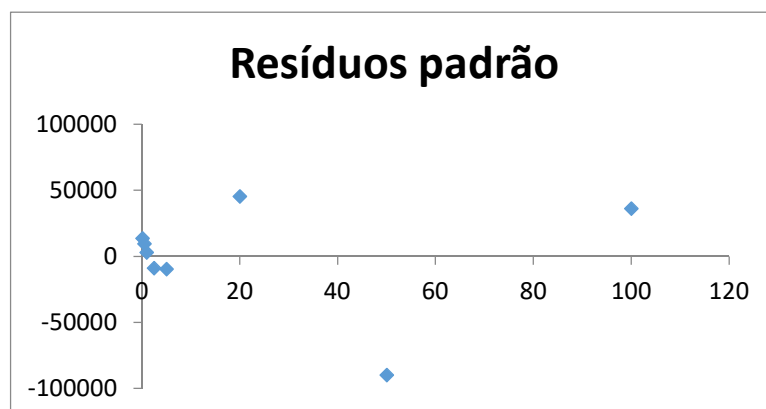


Figura 17. Gráfico dos resíduos padrão para curva analítica em metanol

Tabela 18. Resultados do teste estatístico ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	1	$1,52.10^{13}$	$1,52.10^{13}$	7676,787	$1,49.10^{-10}$
Residual	6	$1,19.10^{10}$	$1,98.10^9$		
Total	7	$1,52.10^{13}$			

4.7.3. Precisão e exatidão

O método desenvolvido para quantificação da hipericina em solução receptora também apresentou-se preciso e exato (Tabelas 19 e 20). Mais uma vez, as análises apresentaram coeficiente de variação menor que 5% para precisão e percentuais de recuperação entre 80 e 120%, estando conforme mais uma vez com os pré-requisitos da ANVISA (BRASIL, 2017).

Tabela 19. Precisão intra-dia (repetibilidade) e intermediária (reprodutibilidade)

Concentração (<u>$\mu\text{g/mL}$</u>)	<u>Repetibilidade</u>		<u>Reprodutibilidade</u>	
	Valor	Percentual de	Valor	Percentual de
	experimental (<u>$\mu\text{g/mL}$</u>)	recuperação (%)	experimental (<u>$\mu\text{g/mL}$</u>)	recuperação (%)
0,5	0,507	101,5	0,504	100,8
5	4,65	93,1	4,47	89,4
100	100,2	100,2	94,65	94,65

Tabela 20. Exatidão intra-dia (repetibilidade) e intermediária (reproducibilidade)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Área	Coefficiente de variação (CV%)	Área	Coefficiente de variação (CV%)
0,5	19986,3011	2,946	19560,42188	1,155
5	211425,377	1,7824	213616,575	3,0174
100	4153974,13	4,6522	3997260,22	2,9466

4.7.4. Robustez

Os mesmos parâmetros usados anteriormente para a validação da hipericina solubilizada em metanol foram analisados. As variações não causaram mudanças significativas no valor das áreas, nem no tempo de retenção ou recuperação da amostra (Tabelas 21-24).

Tabela 21. Variação da vazão de 1 mL/min para 0,90 ou 0,95 mL/min

	Fluxo de 0,90 mL/min			Fluxo de 0,95 mL/min		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	195617,53	14,740		189137,6	14,788	
DP	6770,4563	37,6430	101,5	3941,448	0,150164	98,3
CV	3,461	0,34096		2,083904	1,015447	

Tabela 22. Efeito da mudança do comprimento de onda

	<u>589 nm</u>			<u>591 nm</u>		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	196601,53	14,650		183362	14,998	
DP	4977,1895	0,390042	101,9	7351,663757	0,2389	95,5
CV	2,531	2,662407		4,009371493	1,5929	

Tabela 23. Efeito da mudança no pH

	<u>pH 5,04</u>			<u>pH 5,06</u>		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	196598,04	14,107		206693,99	14,724	
DP	1835,127	0,1668	101,2	5446,2684	0,526772563	106,8
CV	0,933441	1,1044		2,63494	3,57764577	

Tabela 24. Efeito da mudança na composição da fase móvel

	Fase móvel (53:37:10)			Fase móvel (55:35:10)		
	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)	Área	Tempo de retenção	Percentual de recuperação (%)
Média	197552,72	14,072		195604,21	14,68	
DP	6933,6138	0,0962	102,4	2259,5586	14,515	101,5
CV	3,509	0,6839		1,155	14,86	

4.8. Perfil de liberação *in vitro* da hipericina

A Figuras 17 demonstram o perfil de liberação da hipericina para o fotossensibilizador em solução e incorporado em diferentes formulações, respectivamente. Diferentes modelos matemáticos foram utilizados para analisar as curvas de liberação (Tabela 25). Os modelos que apresentaram valores de R^2 mais próximos de 1,00 foram considerados como mais adequados para descrever a cinética de liberação dos componentes avaliados. Assim, podemos observar que o modelo de distribuição Weibull é o que melhor explica a cinética de liberação de todos os sistemas analisados. A equação de Weibull é expressa da seguinte forma:

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t-T_i)^b}{a} \right] \quad (1)$$

Onde, m indica a fração de fármaco acumulada em função do tempo e T_i representa o tempo de atraso anterior ao processo de dissolução ou liberação, e em muitos casos é igual a zero. Os parâmetros a e b são constantes definidas como parâmetro de escala e de forma, respectivamente. A primeira constante está relacionada com o tempo, enquanto que o valor de b define o formato da curva (COSTA; LOBO, 2001). Papadopolou e colaboradores (2006) observaram uma correlação matemática entre o parâmetro b e o expoente n da equação de Peppas e concluíram que o parâmetro de forma b também está relacionado ao mecanismo de transporte do fármaco e às propriedades físicas da matriz de liberação. A equação de Peppas é definida da seguinte forma:

$$\frac{Mt}{M_\infty} = kt^n$$

Onde, M_t e M_∞ são as quantidades cumulativas de fármaco no tempo t e infinito, respectivamente, k é a constante cinética e n , o expoente relacionado ao mecanismo de difusão. Valores de $n = 0,5$ indicam que o mecanismo de difusão é predominante no processo de liberação (Caso I) e valores acima de 0,5 indicam um comportamento complexo, onde a liberação ocorre por meio de outro mecanismo além da difusão (Caso II). A partir da equação derivada da correlação entre os dois modelos, eles concluíram que valores de $b \leq 0,75$ indicam que o principal mecanismo de liberação do sistema em estudo é a difusão. Já valores de $b > 0,75$ correspondem ao caso II. Os valores de b para o fármaco livre, F33, F33 30% e F33 50% ficaram abaixo de 0,75, o que indica que a liberação da hipericina esses sistemas ocorreu por de difusão. Porém F33 100% apresenta um mecanismo de liberação complexo.

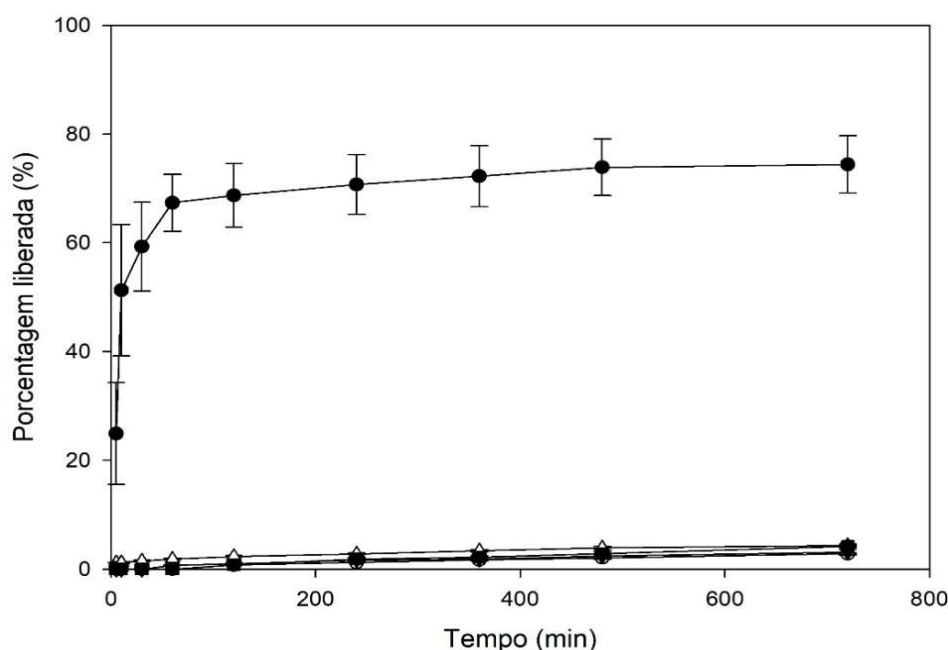


Figura 17. Perfis de liberação da hipericina em solução e da hipericina incorporada em diferentes formulações em função do tempo. Na figura os sistemas estão representados da seguinte forma: FL- fármaco livre (●), F33 (○), F33 30% (▼), F33 50% (△) e F33 100% (■).

Tabela 25. Modelos matemáticos e parâmetros utilizados

Modelo cinético	Parâmetro	FL	F33	F33 30%	F33 50%	F33 100%
Baker e Lonsdale	R^2	0	0,8768	0,9359	0,8457	0,8559
Higuchi	R^2	0	0,8778	0,9367	0,8421	0,8574
Hixon e Crowell	R^2	0	0,9709	0,9296	0,0526	0,9801
Peppas	R^2	0,7495	0,9775	0,9782	0,9864	0,9809
Primeira ordem	R^2	0	0,9712	0,9305	0,0598	0,9803
Weibull	R^2	0,9961	0,9959	0,9903	0,9969	0,9938
	b	0,3299	0,7321	0,6694	0,6608	0,7841

*FL: Fármaco livre

Além disso, quanto maior o valor de b, menor será a desordem do sistema (PAPADOPOULOU et al, 2006). Assim, em relação à F33, o aumento da quantidade de fluido vaginal no sistema até 50% levou a um aumento na desordem da formulação, o que casou um leve aumento na liberação da hipericina. Porém, após a adição de 100% de fluido, o sistema passou a ter um aumento na sua organização interna e um comportamento de liberação

diferente. Esses dados corroboram com os resultados mecânicos e reológicos de que provavelmente existe a formação de uma rede interligada entre as cadeias poliméricas do sistema e da mucina.

Outra questão importante é a discrepância entre a quantidade de hipericina liberada em solução e incorporada nos sistemas. Diferentes fatores podem estar associados à esse comportamento:

O colesterol é reconhecido como um agente que provoca a diminuição da fluidez de membranas e esse efeito é normalmente intensificado na presença de cadeias lipídicas saturadas ou com poucas insaturações, como o ácido oleico (PAN; TRISTRAM-NAGLE-NAGLE, 2009). Dessa forma, o empacotamento mais conciso dos domínios lipídicos provavelmente contribuiu para a diminuição da permeabilidade e difusão do fotossensibilizador (MICHALAK et al., 2013).

A concentração e a afinidade da hipericina pelo sistema são outros fatores importantes que influenciam o comportamento da sua liberação. A hipericina tende a migrar a partir de ambientes aquosos para porções lipídicas, onde permanece na forma monomérica. Porém, após atingir uma determinada concentração crítica nesses sistemas, as moléculas desse pigmento se associam e formam agregados não fluorescentes. Bánó e colaboradores (2011), por sua vez, evidenciaram que o coeficiente de difusão da hipericina é inversamente proporcional ao tamanho desses agregados.

Além disso, alguns estudos evidenciaram que a hipericina se acumula em regiões ricas em colesterol e lipídios saturados. Porém, o colesterol é identificado como o principal componente responsável pela atração da hipericina em membranas e sistemas de liberação devido à similaridade na morfologia entre as duas moléculas com configuração planar rígida (ERIKSSON; ERIKSSON, 2011; HO et al., 2009). Joniova et al (2014) estudaram a influência da razão do colesterol em vesículas unilamelares e demonstraram que o aumento da concentração de colesterol no sistema leva a uma diminuição da quantidade de moléculas na forma monomérica. Dessa forma, a elevada atração da hipericina pelo colesterol no sistema levaria a um aumento na probabilidade de interação entre as moléculas e a uma consequente formação de agregados, levando a retardo significativo na sua liberação.

4.9. Ensaio de permeabilidade e retenção

O emprego de modelo porcino é vantajoso porque é possível prever a permeabilidade de fármacos na vagina humana (LORENZEN, 2015). Ambas mucosas apresentam propriedades da barreira de permeabilidade devido à similaridade na morfologia e composição da camada epitelial (MACHADO et al., 2015), na resposta do sistema imune (LORENZEN, 2015), pH e secreções (SQUIER et al, 2008).

O processo de absorção da membrana vaginal pode ocorrer de forma ativa ou passiva, e o mecanismo passivo inclui os transportes transcelular e paracelular. Foi visto que o mecanismo de transporte passivo por meio da difusão constitui a principal rota de permeação de substâncias ativas na vagina. As junções de oclusão que são constituídas por diferentes proteínas transmembrana representam as principais barreiras para a permeação entre as células vaginais (MACHADO et al., 2015). A lipofilicidade, peso molecular, grau de ionização e a quantidade e composição do fluido vaginal são fatores que afetam a passagem de moléculas por essas junções (BRANNON-PEPPAS, 1993; MACHADO et al., 2015).

A hipericina não foi detectada pelo método cromatográfico para todos os sistemas analisados ao longo das 12 horas de experimento. Por outro lado podemos observar na Figura 18 que a retenção da hipericina na mucosa suína ocorreu de forma proporcional ao perfil de liberação dos sistemas estudados. Boiy et al (2007) observaram que a penetração da hipericina nas camadas da pele ocorre de acordo com a sua dissolução e afinidade pelo sistema de liberação. A alta afinidade da hipericina por determinados veículos acarretou em uma pobre retenção do fotossensibilizador na camada epitelial. Resultados semelhantes foram obtidos em veículos onde a hipericina era pobremente solúvel devido à formação de agregados de alto peso molecular. Porém, sistemas que continham componentes intensificadores de penetração levaram a um aumento da disponibilidade da hipericina na pele.

Já em outro estudo, Boiy e colaboradores (2007) concluíram que a concentração da hipericina nos sistemas de liberação que continham intensificadores de penetração influenciava a distribuição do fotossensibilizador dentro das camadas da pele. Menores concentrações de hipericina (0,01 -0,1%) levaram à uma retenção do pigmento nas camadas mais superficiais da pele, enquanto que maiores concentrações (1%) faziam com que a hipericina também ficasse retida na derme. Porém, apesar da detecção de uma maior permeabilidade da hipericina, eles não observaram a presença do pigmento na corrente sanguínea dos animais tratados. Resultados semelhantes foram obtidos por Montoya et al. (2015) e Kamuhabwa et al. (2010).

LOPES et al (2004), por sua vez concluíram que a concentração dos intensificadores de penetração influenciam de forma significativa na permeabilidade de fármacos. Eles observaram que cristais líquidos que continham até 10% de monooleína, um intensificador de penetração estruturalmente similar ao ácido oleico, induziam um aumento na permeabilidade da Ciclosporina A, o que fazia com que o peptídeo atingisse a corrente sanguínea. Porém, concentrações acima de 20% causavam a retenção da Ciclosporina A no tecido. Dessa forma, eles acreditam que a elevada afinidade do peptídeo pela monooleína, que permanece particionada nas camadas mais superficiais da pele, seria o principal responsável pela retenção do agente na camada epitelial.

Portanto, mais uma vez concluímos que a composição, o perfil de liberação, concentração da hipericina e a interação da formulação com a mucosa seriam os principais fatores responsáveis pela concentração do fotossensibilizador no sítio de ação. Isso indica que os sistemas testados fornecem um tratamento de forma localizada (RAJABALAYA et al., 2017) e impedem o surgimento de reações adversas de forma sistêmica Montoya et al., (2015). Esse efeito é desejado principalmente para evitar possíveis reações de fotossensibilização cutânea causadas pela hipericina em pessoas expostas à luz do sol (SCHMITT et al., 2006).

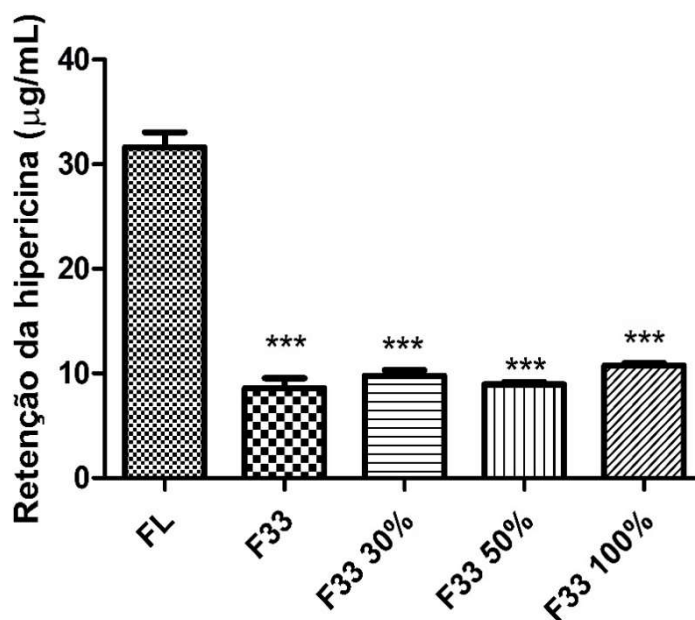


Figura 18. Retenção da hipericina (µg/mL) na mucosa suína após 12 horas de experimento. Quando comparada à fotossensibilizador em solução (FL), F33 e os demais sistemas contendo diferentes proporções de FVS (F33 30%, F33 50% e F33 100%) levaram à uma redução significativa na retenção da hipericina na mucosa suína, o que ocorre devido à composição e liberação sustentada das formulações. .

4.10. Inativação fotodinâmica

A Figura 19 demonstra o perfil de redução do número de leveduras de acordo com os parâmetros testados. O tratamento das leveduras apenas com emprego luz ou do fotossensibilizador sozinho não apresentaram reduções significativas no número de células viáveis. Já para os testes feitos com o emprego da luz podemos observar que para o tempo de 5 minutos de irradiação, houve uma redução de $\log_{10}$ 1,48 para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que não ocorreram reduções significativas para as demais concentrações testadas. O aumento do tempo de irradiação para 10 minutos, levou a uma redução de $\log_{10}$ 1,70 irradiação para 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e uma completa eliminação das leveduras a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Já o tempo para 15 minutos de irradiação casou uma redução total do no número de leveduras em relação ao controle de crescimento para todas as concentrações de hipericina. Dessa forma, considerando que a fonte de luz possui a mesma intensidade, podemos concluir que existiu uma dependência direta entre a efetividade da inativação do microorganismo e a dose luz e a concentração do fotossensibilizador. Quanto maior a dose de luz, menores concentrações de hipericina foram necessárias para diminuir a viabilidade das leveduras em suspensão. Resultados semelhantes foram observados por Rezusta e colaboradores (2012), bem como por Paz-Cristobal e colaboradores (2014).

López-Chicón et al (2012) identificaram que o mecanismo de fotoinativação das leveduras de *Candida albicans* ocorre tanto por meio do mecanismo tipo I quanto tipo II. O tipo de espécie reativa originada depende do compartimento no qual a hipericina é internalizada. Eles observaram a formação de oxigênio singlete em cepas de *Candida albicans* e concluíram que a hipericina é provavelmente armazenada em organelas que apresentam disponibilidade de oxigênio. Por outro lado, quando leveduras foram tratadas em meios com baixa concentração de oxigênio, radicais superóxido foram detectados. Porém, eles observaram que a presença de peróxido de hidrogênio nas células teve uma atuação mais significativa na redução da viabilidade das leveduras.

A partir desses resultados, o tempo de 10 minutos foi escolhido para avaliar se a formulação aumentaria a eficácia da inativação das leveduras, pois foi o menor tempo que apresentou melhores resultados e uma evidente dose subinibitória da hipericina. Porém, o tempo de incubação passou a ser de 2 horas e meia. Esse seria o menor tempo necessário para que uma quantidade de hipericina semelhante à concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, levando em consideração o perfil de liberação dos formulações. A figura mostra que as formulações F33 30%, F33 50%

e F33 100% com e sem hipericina não apresentam toxicidade para as leveduras na ausência de luz.

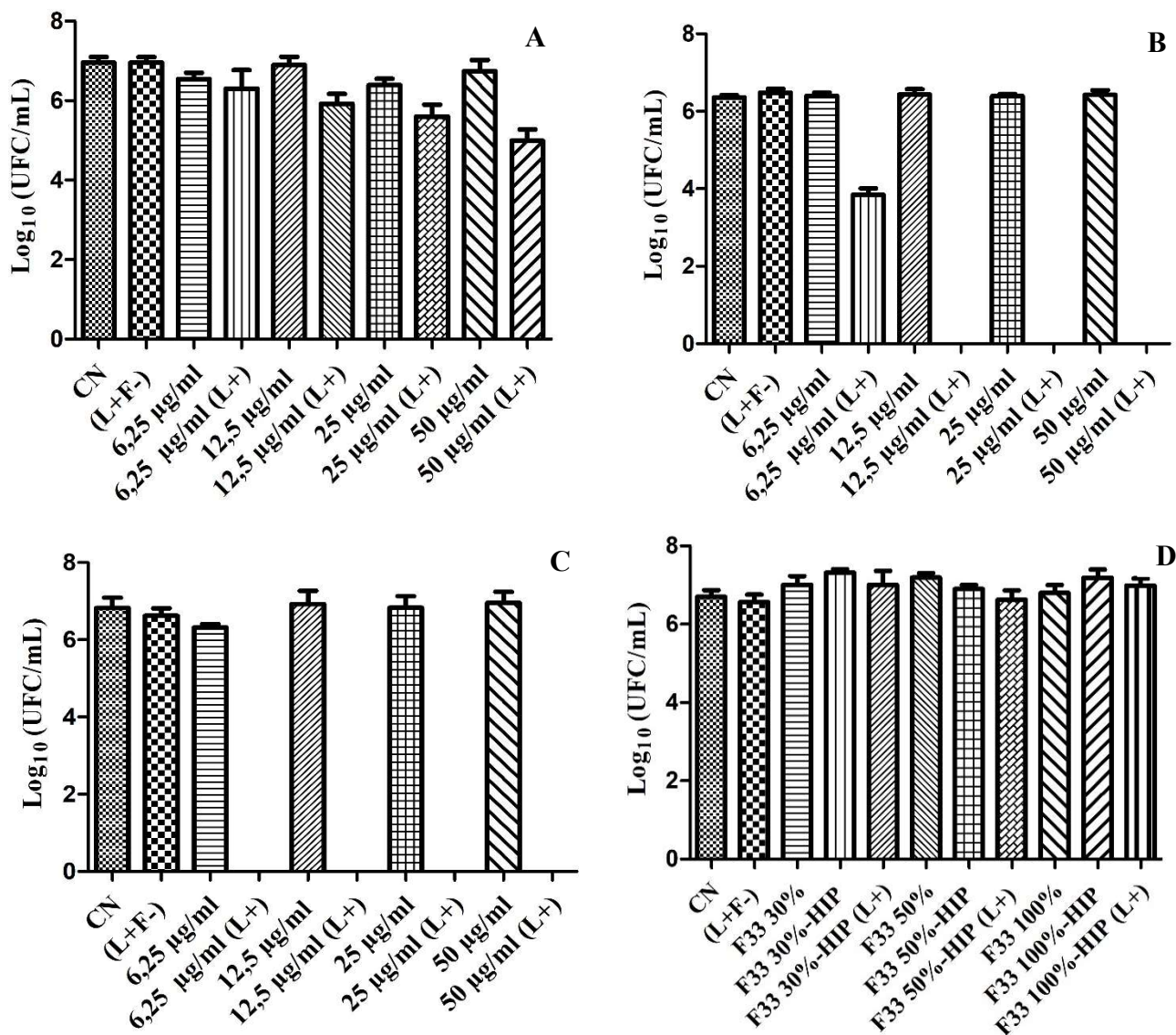


Figura 19. Inativação fotodinâmica de leveduras de *Candida albicans* com hipericina livre (A-C) e formulações contendo hipericina (D). CN (controle negativo) indica as células não passaram por nenhum tratamento. O controle (L+F-) representa o grupo tratado apenas com luz e sem fotossensibilizador. Diferentes concentrações de hipericina foram testadas sem o emprego da luz (6,25, 12,5, 25 e 50 µg/mL) e com o emprego da terapia fotodinâmica (L+). F33 30%, F33 50%, F33 100% são os controles de toxicidade das formulações sem hipericina, F33 30%-HIP, F33 50%-HIP, F33 100%-HIP são os controles com hipericina sem emprego de luz e F33 30%-HIP (L+), F33 50%-HIP (L+), F33 100%-HIP (L+), com hipericina e emprego de luz.

Já o tratamento realizado as formulações com hipericina incorporada pelo tempo de 10 minutos demonstrou que não existiram reduções significativas no número de unidades formadoras de colônias. Esse fato está provavelmente associado à pobre liberação do fotossensibilizador já prevista pelo ensaio de liberação *in vitro*. Dessa forma, mais ensaios seriam necessários para verificar a viabilidade da formulação, tais como testes em modelos animais *in vivo*. Porém, levando em consideração apenas os testes *in vitro*, apesar de as formulações apresentarem um aumento na mucoadesão, prováveis ajustes na composição do sistema precursor seriam necessários para modular uma maior liberação da hipericina, mantendo-se a capacidade de manter o fotossensibilizador de forma localizada no tecido tratado.

4.11. Ensaio de citotoxicidade

A Figura 20 demonstra a citotoxicidade das formulações F33 e os demais sistemas contendo diferentes proporções de fluido vaginal simulado sobre células da linha L292. Podemos observar que, todas as formulações com e sem hipericina incorporada foram significativamente menos citotóxicas que o controle positivo (células tratadas com 100% DMSO), exceto F33 HIP. De uma forma geral, a incorporação da hipericina nas formulações levou a um leve aumento no número de células mortas, porém essa diferença apenas foi significativa entre F33 e F33 HIP.

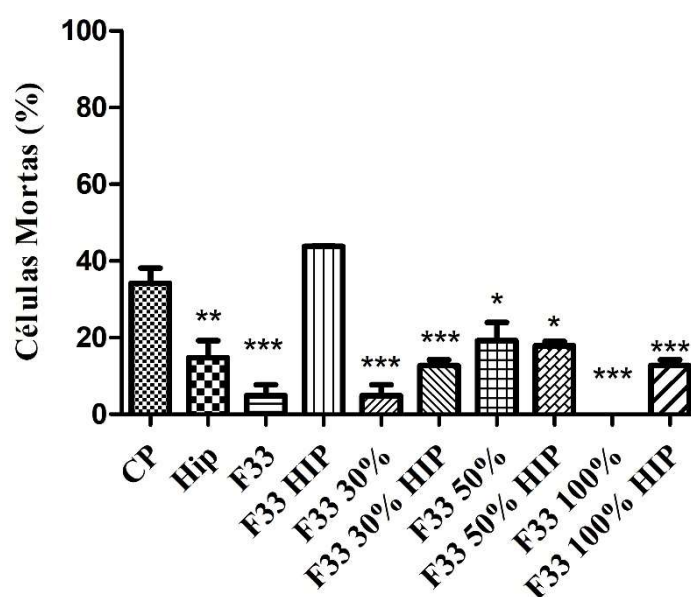


Figura 20. Citotoxicidade da hipericina sobre a linhagem celular L 292 expresso pelo número de células mortas (%). O gráfico indica a redução do número de células viáveis em relação ao controle positivo (CP) para as diferentes formulações com e sem hipericina.

Considerando que o período de incubação das células com as diferentes formulações foi realizada em ausência de luz, acredita-se que a diminuição da viabilidade das células provavelmente não ocorreu devido à atividade de espécies reativas de oxigênio. É importante notar que as células L292 pertencem à um linha de fibrossarcoma murino e apesar de a hipericina geralmente apresentar baixa toxicidade no escuro, alguns estudos afirmam que a hipericina pode apresentar atividade antiproliferativa para células tumorais mesmo na ausência de luz (JENDŽELOVSKÁ et al., 2016). Além disso, o efeito mais pronunciado de F33 HIP deve ocorrer devido à maior facilidade de migração hipericina presente na fase oleosa da formulação para as membranas das células em relação às moléculas de fotossensibilizador presas nas bicamadas dos cristais líquidos lamelares.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o sistema isotrópico e transparente F33 apresentou características de microemulsão em uma região próxima a transição de fases. Quando em contato com fluido vaginal simulado (FVS) em diferentes proporções (30, 50 e 100%), as formulações passaram a exibir anisotropia e picos característicos de cristais líquidos lamelares na técnica de espalhamento de Raio-X à baixo ângulo. O aumento da concentração de FVS provocou uma provável diminuição da organização das mesofases lamelares até a concentração de 50% de FVS, o que pode ser observado por meio da análise das propriedades mecânicas e reológicas das formulações. Porém, a adição de 100% de FVS levou à aumento significativo na organização do sistema, o que deve estar associado à formação de uma rede em que ocorre a interpenetração entre as cadeias do copolímero e as cadeias da mucina presentes do fluido vaginal. Essa possível interação justificaria o aumento significativo nas propriedades mucoadesivas do sistema. Além disso, os sistemas apresentaram uma liberação sustentada da hipericina e levaram à retenção do fotossensibilizador de forma localizada na mucosa vaginal suína. Ensaios de citotoxicidade em células murinas indicaram que as formulações apresentam baixa toxicidade, a incorporação da hipericina nos sistemas não causou uma otimização do tratamento devido ao longo período necessário para liberação do fotossensibilizador. Futuros estudos *in vivo* seriam necessários para avaliar se a formulação é realmente efetiva de acordo com a composição empregada.

6. REFERÊNCIAS

1. ANDREWS, G; LAVERTY, T; JONES, D. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.71, p.505–518, 2009.
2. ARAMAKI, K et al. Miscibility of Block Copolymers and Surfactants in Lamellar Liquid Crystals. **Macromolecules**, v. 36, p. 9443-9450, set. 2003.
3. BARBOSA, C. et al. Anti-fungal treatment with azole compounds for uncomplicated vulvovaginal candidiasis. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 3, n. 6, p.118-123, 2012.
4. BARNES, H. A. Thixotropy: a review. **J Non-Newtonian Fluids Mech.**, v. 56, p. 21, 1997.
5. BOIKO, Y. et al. Effects of liquid crystal systems based on cholesterol esters on skin permeability. **Pharm Chem J.**, v.47, p.393-396, 2013.
6. BOIY, A. et al. Photosensitizing activity of hypericin and hypericin acetate after topical application on normal mouse skin. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 2, p.360-369, 28 nov. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08329.x>.
7. BOIY, Annelies et al. Effect of vehicles and esterification on the penetration and distribution of hypericin in the skin of hairless mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, n. 2, p.130-139, jun. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2007.02.002>.
8. BRANNON-PEPPAS, Lisa. Novel vaginal drug release applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 1-2, p.169-177, jul. 1993. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0169-409x\(93\)90031-x](http://dx.doi.org/10.1016/0169-409x(93)90031-x).
9. BURDUCEA, G. Lyotropic Liquid Crystals I. Specific Structures. **Romanian Reports in Physics**, v. 56, n. I, p.66-86, 2004.
10. CALANDRA, P. et al. How self-assembly of amphiphilic molecules can generate complexity in the nanoscale. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 484, p. 164–183, 2015.
11. CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p.1-17, mar. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502010000100002>.
12. CARVALHO, F. et al. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 84, p. 219–227, 2013.

13. CEULEMANS, J.; LUDWIG, A. Optimizations of carbomer viscous eye drops: an *in vitro* experimental design approach using rheological techniques. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p 41-50, 2002.
14. CHNABLEGGER, H.; SINGH, Y. **The SAXS guide**: getting acquainted with the principle. 3rd. ed. Austria: Anton Paar GmbH, 2013.
15. CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.
16. COLLINGS, P. J.; HIRD, M. **Introduction to liquid crystals**: chemistry and physics. Philadelphia: Taylor & Francis, 1997.
17. COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p.123-133, maio 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0928-0987\(01\)00095-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0928-0987(01)00095-1).
18. CRODA. Personal Care: Procetyl™ AWS. Edison, 2010.
19. DANTAS, A. S. et al. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p.111-118, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>.
20. DONNELLY, Ryanf et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p.89-100, jan. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.76478>
21. DOVNIK, Andraž et al. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica Et Adriatica**, v. 24, n. 1, p.5-7, 15 mar. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15570/actaapa.2015.2>.
22. ENE, I. V. et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 9, p.1319-1335, 5 jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x>.
23. ERIKSSON, E. S. E. Properties and Permeability of Hypericin and Brominated Hypericin in Lipid Membranes. **J. Chem. Theory Comput.**, v.5, p. 3139–3149, 2009.
24. ERIKSSON, E. S. E.; ERIKSSON, L. A. The Influence of Cholesterol on the Properties and Permeability of Hypericin Derivatives in Lipid Membranes. **Journal of Chemical Theory And Computation**, v. 7, n. 3, p.560-574, 8 mar. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ct100528u>

25. ERIKSSON, E. S. E.; ERIKSSON, L.A. The Influence of Cholesterol on the Properties and Permeability of Hypericin Derivatives in Lipid Membranes. **J. Chem. Theory Comput.**, v.7, p. 560–574, 2011.
26. FALK, H.; MEYER, J. On the Homo- and Heteroassociation of Hypericin. **Monatshefte für Chemie**, v. 125, p. 753-762, 1994.
27. FERNÁNDEZ-GUARINO, M. Photodynamic Therapy: New Indications. **Actas Dermosifiliogr**, n. 98, p.377-395, abr. 2007.
28. FERREIRA, S.G. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, p.190–196, 2015.
29. FRANK, C. et al. Influence of Amphiphilic Block Copolymers on Lyotropic Liquid Crystals in Water-Oil-Surfactant Systems. **Langmuir**. v. 21, p. 9058-9067, 2005
30. FUNK, J. E.; GINGER, D. Viscosity and Rheology. In: **Predictive Process Control of Crowded Particulate Suspensions**. Boston: Springer, 1994. p. 235-252.
31. GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews In Microbiology*, v. 42, n. 6, p.905-927, 21 dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2015.1091805>.
32. GONZÁLEZ, I. D. et al. Patient preferences and treatment safety for uncomplicated vulvovaginal candidiasis in primary health care. **Bmc Public Health**, v. 11, n. 1, 31 jan. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-11-63>.
33. GRATIERI, T. et al. 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.
34. GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n.23/24, p.1032-1040, 2010.
35. HARTLEY, P.G.; SHEN, H.-H. Nanocharacterization of Lyotropic Liquid Crystalline Systems. In: SOMASUNDARAN, P; GARTI, N.; MAZZENGA,R. **Self Assembled Supramolecular Architectures**. New Jersey: Wiley, 2012.
36. HO, Y.F. et al. Lipid mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1788, p. 1287-95, 2009.
37. HO, Yunn-fang et al. Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p.1287-1295, jun. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.017>.

38. HOSSAIN, M.K. et al. Phase Behavior of Poly(Oxyethylene)–Poly(Oxypropylene)–Poly(Oxyethylene) Block Copolymer in Water and Water–C12EO5 Systems. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 24, n. 3 e 4, p. 411–422, 2003.
39. HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. **Methods Mol. Biol.**, v. 635, p. 155–173, 2010.
40. ISHIZUKA, C.; ARIMA, S.; ARAMAKI, K. Head group effects on molecular packing in lamellar liquid crystals. **J Colloid Interface Sci.**, v.361, p.148-153,2011.
41. JENDŽELOVSKÁ, Zuzana et al. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. **Frontiers In Plant Science**, v. 7, p.1-20, 6 maio 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00560>.
42. JONES, D.; WOOLFSON, D.; DJOKIC, J. Texture Profile Analysis of Bioadhesive Polymeric Semisolids: Mechanical Characterization and Investigation of Interactions Between Formulation Components. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, p. 2229-2234, 1996.
43. JONIOVA, Jaroslava et al. Incorporation of photosensitizer hypericin into synthetic lipid-based nano-particles for drug delivery and large unilamellar vesicles with different content of cholesterol. In: PROCEEDINGS SPIE, v. 9166, Biosensing and Nanomedicine VII, 916604, San Diego, California, 27 August 2014; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1117/12.2060672>.
44. JORI, G. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles. In: HAMBLIN, M. R.; JORI, G. **Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens Medical and Environmental Applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011.
45. JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 403–405, 2004.
46. KAMAL, A et al. A Validated HPLC Method for the Quantification of Hypericin in *Hypericum perforatum*. **Asian Journal of Chemistry**. v. 24, n. 10, p. 4689-4692, out 2012.
47. KAMUHABWA, Appolinary R.; GEBOES, Karel R.; WITTE, Peter A. de. Investigation of the Absorption of Hypericin into the Skin of Hairless Mice. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v. 52, n. 5, p.487-494, maio 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1211/0022357001774264>.
48. KARAM EL-DIN, Al-Zahraa A. et al. Critical factors affecting the adherence of *Candida albicans* to the vaginal epithelium. **Journal of Taibah University For Science**,

- v. 6, n. 1, p.10-18, dez. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2012.10.001>.
49. KARIOTI, A.; BILIA, A. R. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. **Int. J. Mol. Sci.**, v.11, p. 562-594, 2010.
 50. KELLO, M. et al. PUFAs enhance oxidative stress and apoptosis in tumour cells exposed to hypericin-mediated PDT. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.9, p.1244–1251, 2010.
 51. KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Cellular Mechanisms and Prospective Applications of Hypericin in Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 18, p.2189-2204, 1 ago. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/092986706777935267>
 52. KRATKY, O. S.A Survey. In: GLATTER, O; KRATKY, O. Small Angle X-Ray Scattering. London: Academic Press, 1982.
 53. LAVIE, G. et al. The Chemical and Biological Properties of Hypericin-A Compound with a Broad Spectrum of Biological Activities. **Medicinal Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 111-119, 1995.
 54. LI, Weijia; ZHOU, Jing; XU, Yuyin. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 5, p.617-620, 19 jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3892/br.2015.481>.
 55. LIANG, Y. et al. Photodynamic therapy as an antifungal treatment. **Experimental And Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p.23-27, 11 maio 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3336>.
 56. LIEBERT, M. Final Report on the Safety Assessment of Oleic Acid, Laurie Acid, Palmitic Acid, Myristic Acid, and Stearic Acid. **J Am Coll Toxicol.**, v. 6, p. 321-401, 1987.
 57. LODISH, H. et al. Biomembranes and the Subcellular Organization of Eukaryotic Cells. In: **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. Freeman, 2000.
 58. LOPES, Luciana B.; COLLETT, John H.; BENTLEY, M. Vitória L. Topical delivery of cyclosporin A: an *in vitro* study using monoolein as a penetration enhancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p.25-30, maio 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.12.003>
 59. LÓPEZ-CHICÓN, P. et al. On the mechanism of Candida spp. photoinactivation by hypericin. **Photochem Photobiol Sci.**, v.11, p.1099-1107, 2012.

60. LÓPEZ-CHICÓN, Patricia et al. On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 6, p.1099-1107, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c2pp25105a>
61. LORENZEN, Emma et al. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using mini pigs as a model of human genital Chlamydia infection. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p.1-13, 28 set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0241-9>.
62. MACDONALD, Ian J.; DOUGHERTY, Thomas J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)**, v. 5, n. 2, p.105-129, fev. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jpp.328>.
63. MACHADO, Rita Monteiro et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p.14-26, set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.003>.
64. MALMSTEN, M. **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**. New York: Marcel Dekker, 2002.
65. MASON, T. G.; WEITZ, D. A. Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. **Physical Review Letters**, v. 74, p. 1250-53, 1995.
66. MATSUMURA, Y.; MORI, T. Gelation. In: HALL, G.M. **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996.
67. MELO, M. et al. A Systematic Review for Anti-Inflammatory Property of Clusiaceae Family: A Preclinical Approach. **Evidence-Based Complementary Altern. Med.**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
68. MEWIS, J. Thixotropy- A General Review. **J. Non-Newtonian Fluids.**, v.6, p.1, 1979.
69. MICHALAK, Zuzanna et al. Effect of Monoglyceride Structure and Cholesterol Content on Water Permeability of the Droplet Bilayer. **Langmuir**, v. 29, n. 51, p.15919-15925, 9 dez. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/la4040535>.
70. MOGALIAN, E. et al. Pharmaceutical Solvents for Pulmonary Drug Delivery. In: AUGUSTIJNS, P; BREWSTER, M. **Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. New York: Springer, 2007.
71. MONTROYA, Andrés et al. Development of a Novel Formulation with Hypericin To Treat Cutaneous Leishmaniasis Based on Photodynamic Therapy *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p.5804-5813, 13 jul. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00545-15>.

72. MYTHRI, G. et al. Novel Mucoadhesive Polymers –A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 1, p.37-42, out. 2011.
73. O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, n.5, p. 1053-1074, 2009.
74. OKADA, H.; HILLERY, A. M. Vaginal Drug Delivery. In: HILLERY, A. M.; LOYD, A. W.; SWARBRICK, J. **Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. New York: Taylor & Francis, 2001.
75. OWEN, Derek H.; KATZ, David F. A Vaginal Fluid Simulant. **Contraception**, New York, n. 59, p.91-95, jan. 1999.
76. OWEN, M.K.; CLENNEY, T. L. Management of vaginitis. **Am. Fam. Physician**, v. 11, n. 70, p.2125-2132, dez. 2004.
77. PAN, Jianjun; TRISTRAM-NAGLE, Stephanie; NAGLE, John F. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. **Physical Review**, v. 80, n. 2, p.1-12, 25 ago. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1103/physreve.80.021931>.
78. PAPADOPOULOU, Vasiliki et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p.44-50, fev. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>.
79. PATEL, H; PATEL R.; PATEL, M.M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **Int J PharmTech Res**. v. 1, p. 299-303, 2009.
80. PAZ-CRISTOBAL, M. P. et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p.35-42, 12 jun. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12099>.
81. PEPPAS, N. A.; LITTLE, M. D. HUANG, Y. Bioadhesive Controlled Release Systems. In: WISE, D. L. **Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology**. New York: Marcel Dekker, 2000.
82. PEREIRA, R. R. A.; BRUSCHI, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 6, p.643-652, 15 out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2011.623355>.
83. POLIZZI, S; SPINOZZI, F. Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) with Synchrotron Radiation Sources. In: MOBILIO, S. et al. **Synchrotron Radiation: Basics, Methods and Applications**. London: Springer, 2015.

84. QUELLET, C. et al. Transient Networks in ABA Block Copolymer-Microemulsion Systems. **Macromolecules**, v. 23, p. 3347-3352, 1990.
85. RAJABALAYA, Rajan et al. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. **Drug Design, Development And Therapy**, v. 11, p.393-406, fev. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s103505>.
86. RAMOS, M. et al. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **Int J Nanomed.**, v.10,p. 7455-7466, 2015.
87. REZUST, A. et al. *In Vitro* Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species. **Photochem Photobiol.**, v. 88, p. 613–619, 2012.
88. REZUSTA, Antonio et al. *In Vitro* Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p.613-619, 30 dez. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01053.x>.
89. RINGDAHL, E. N. Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **American Family Physician**, v. 11, n. 60, p.3306-3312, jun. 2000.
90. ROSA, L. P. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 03, n. 04, p.1-7, ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0703.1000158>.
91. RYTER, S. W.; TYRRELL, R.M. Singlet Molecular Oxygen (1O_2): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1520–1534, 1998.
92. SANDRI, G. et al. Strategies to improve systemic and local availability of drugs administered via vaginal route. In: TOUITOU, E.; BARRY, B. W. **Enhancement in Drug Delivery**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011.
93. SCHMITT, Laura A. et al. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 2, p.118-130, nov. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.06.001>.
94. SEGURA, T. et al. Materials with Fungi-Bioinspired Surface for Efficient Binding and Fungi-Sensitive Release of Antifungal Agents. **Biomacromolecules**, v. 15, p.1860–1870, 2014.
95. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 11, p. 507-517, 1999.

96. SHRESTHA, L.K. et al. Structure and rheology of reverse micelles in dipentaerythrityl tri-(12-hydroxystearate)/oil systems. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.13, p. 4911–4918, 2011.
97. SMART, J. Theories of Mucoadhesion. In: KHUTORYANSKIY, V. V. (Ed.). **Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems**. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2014.
98. SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p.15-21, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.067>.
99. SOBEL, J.D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 2, n. 178, p.203-211, 1998.
100. SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v. 369, n. 9577, p.1961-1971, jun. 2007. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60917-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60917-9).
101. SOLTERO, A. et al. Thixotropic–antithixotropic behavior of surfactantbased lamellar liquid crystals under shear flows. : **Journal of Rheology**, v. 39, p. 235, 1995.
102. SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-13, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/204237>.
103. SQUIER, Christopher A. et al. Porcine Vagina Ex Vivo as a Model for Studying Permeability and Pathogenesis in Mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p.9-21, jan. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21077>.
104. SYTAR O, et al. Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. **Pharm. Biology.**, v. 54, n. 12, p. 3121- 3125, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1211716>.
105. TALAEI, Zahra et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Could It Be Related to Cell-Mediated Immunity Defect in Response to Candida Antigen? **Int J Fertil Steril**, Irã, v. 3, n. 11, p.134-141, set. 2017.
106. WHITE, D J; VANTHUYNE, A. Vulvovaginal candidiasis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 82, n. 4, p.28-30, dez. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/sti.2006.023168>.
107. WILKINSON, F.; HELMAN, W.P.; ROSS, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in

- Solution. An Expanded and Revised Compilation. **J. Phys. Chem. Ref. Data**, v. 24, n.2, p. 663-669, 1995.
- 108.WYSS, H. M. Rheology of Soft Materials. In: FERNANDEZ-NIEVES, A.; PUERTAS, A. M. Fluids, **Colloids and Soft Materials**: an introduction to soft matter physics. New Jersey: Wiley, 2016.
- 109.YOW, C. M. N. et al. Hypericin-mediated Photodynamic Antimicrobial Effect on Clinically Isolated Pathogens. **Photochem Photobiol.**, v.88,p. 626–632, 2012.
- 110.ZHAO, J. et al. Phase Behavior and rheological properties of the lamellar liquid crystals formed in dodecyl polyoxyethylene polypropylene ether/water system. **Indian Journal of Chemistry**, v. 50A, p,641-649 May 2011.