



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à
Farmácia

Victor Hugo Sousa Araujo

Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para co-
encapsulação de curcumina e fluconazol dispersos em hidrogéis
termorresponsivos no tratamento de candidíase vulvovaginal

Araraquara - SP

2023

Victor Hugo Sousa Araujo

Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para co-encapsulação de curcumina e fluconazol dispersos em hidrogéis termorresponsivos no tratamento de candidíase vulvovaginal

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

Orientador: Marlus Chorilli

Araraquara - SP

2023

Araujo, Victor Hugo Sousa.

A663a Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para co-encapsulação de curcumina e fluconazol dispersos em hidrogéis termorresponsivos no tratamento de candidíase vulvovaginal / Victor Hugo Sousa Araujo. – Araraquara: [S.n.], 2023.
163 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. Carreador Lipídico Nanoestruturado. 3. Curcumina. 4. Fluconazol. 5. Hidrogel. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE VICTOR HUGO SOUSA ARAUJO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA.

Aos 11 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de VICTOR HUGO SOUSA ARAUJO, intitulada **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA COENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA E FLUCONAZOL DISPERSOS EM HIDROGÉIS TERMORREPONSIVOS NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP, Profa. Dra. TANIA UEDA NAKAMURA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Farmácia / Universidade Estadual de Maringá, Profa. Dra. RUTH MERI LUCINDA DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Universidade do Vale do Itajaí - Univali, Prof. Dr. JOÃO PAULO FIGUEIRÓ LONGO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Marlus
Chorilli:
21539386864

Assinado digitalmente por Marlus Chorilli:
21539386864
DN: cn=Marlus Chorilli, 21539386864,
ou=UNESP - Universidade Estadual
Paulista, 31 de Març, 2023, 14:00:00
C=BR
Razão: Eu sou o autor deste documento
Localização: sua localização de

AGRADECIMENTOS

A escrita dessa tese foi carregada de inúmeras vitórias e superações, e este momento seria impossível sem auxílio de diversas personagens-chave neste processo.

Agradeço imensamente à tríade de mães que me criou, me conduziu e acreditou no meu potencial até esse momento: à Simone Sousa Araujo de Moraes, à Sônia Cristina Sousa Araujo e à Marineusa Sousa Araujo.

Ao meu tio, Paulo José Sousa Araujo, ao meu avô, João Batista Araujo e à minha tia, Cintia Rejane Sousa Araujo Gonçalves, obrigado por todo o carinho e suporte nessa jornada.

Aos meus irmãos, Sofia Sousa Araujo de Moraes, Arthur Sousa Araujo de Moraes e ao meu primo, Nuri Barros Araujo por me evocarem a necessidade de dar o meu melhor e ser o melhor exemplo que eu poderia ser.

Aos meus amigos que criei em Araraquara, Maurício Palmeira, Fernanda Borges de Almeida, Bruna Furquim, Jennifer Cavalcante, Alberto Tavares e Bruno Fonseca-Santos, obrigado por todo o companheirismo e suporte.

Aos meus amigos remanescentes, fora do meio acadêmico, obrigado por todo carinho e hombridade. Ao Luís Eduardo Melo por toda atenção e colaboração nos momentos mais difíceis.

À Graziella Anselmo Joanitti por acreditar no meu potencial e ter aberto a mim as portas ao mundo científico. À Patrícia Bento da Silva por ter de fato me orientado no mestrado, por todo apoio e inspiração. Ao meu orientador de doutorado Marlus Chorilli, por acreditar no meu potencial e promover meu crescimento.

O conteúdo deste trabalho também se deve ao esforço dos colaboradores.

Ao Gabriel Davi Marena, à Professora Thais Bauab e Bruna Furquim por todo o suporte com os ensaios microbiológicos. À Professora Paula Aboud Barbugli por auxiliar com os experimentos de confocal. À Professora Izabel Cristina Rodrigues da Silva por todos os conselhos e auxílio com os experimentos celulares. À Suzana Carvalho, Jennifer Cavalcante e Fernanda Borges de Almeida por me darem suporte nos experimentos finais.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dessa pesquisa e auxílio financeiro, sob processo nº 19/10261-2.

“Da Ceilândia para o mundo, meu filho.”

Marineusa Sousa Araujo

RESUMO

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma patologia que acomete boa parte da população de sexo feminino. O tratamento com agentes azólicos é amplamente prescrito e o número de isolados resistentes vem crescendo. Desta forma, se faz necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Curcumina (CUR) demonstra ser uma alternativa promissora visto a sua bioatividade versátil e amplamente discutida na literatura. Em estudos, a associação de CUR com outros insumos farmacêuticos ativos (IFAs), como o fluconazol (FL) proporcionou otimização de atividade. Em virtude da baixa solubilidade da CUR, sua incorporação em sistemas de liberação nanoestruturados, como carreador lipídico nanoestruturado (CLN) pode ser interessante, de forma a otimizar sua ação biológica. Considerando a alta fluidez de CLN e aplicação intravaginal, o estudo avaliou a sua dispersão em hidrogel termorresponsivo. Desta forma, este projeto buscou avaliar o potencial de CLN para co-encapsulação de CUR e FL dispersos em hidrogéis termorresponsivos no tratamento de CVV. O desenvolvimento do CLN foi realizado com a abordagem *Quality by Design* (QbD) com intuito de obter um desenvolvimento baseado na qualidade. Desta forma, um estudo Box-Behnken (3³) foi conduzido. Diferentes técnicas de caracterização físico-químicas foram abordadas e foi possível obter CLN monodispersa, com diâmetro hidrodinâmico médio de 142,5 nm, com alta eficiência de encapsulação de CUR e FLU, liberação prolongada, índice de cristalinidade reduzido e forma esférica. Os hidrogéis foram obtidos utilizando CLN como fase aquosa (H-CLN) e a avaliação das propriedades mecânicas de H-CLN demonstrou que cada hidrogel teve um comportamento diferente de acordo com a CLN utilizada. A atividade da combinação CUR e FLU, a nanoestruturada (CLNFC) e hidrogel (H-CLNFC) foi avaliada em modelos *in vitro* com células planctônicas. Avaliação *in vitro* com biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, *in vivo* em modelo de *Galleria melonella* e anti-inflamatória *in vitro* (doseamento de TNF-alfa, IL-6, IL-10, IL-2) foram realizados com CLNFC. Os resultados indicaram o potencial anti-cândida da combinação CUR + FL e a otimização da atividade quando em CLNFC. Os resultados de H-CLNFC demonstraram redução do potencial antifúngico demonstrado por CLNFC. A citotoxicidade das amostras foi avaliada indicando que CLNFC não se apresentou tóxica em linhagens de macrófagos murinos e de células epiteliais de mucosa vaginal, além de exercer atividade anti-inflamatória. Desta forma, o sistema desenvolvido tem potencial no tratamento de CVV, visto as atividades antifúngica e anti-inflamatória demonstradas.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal, Carreador Lipídico Nanoestruturado, Curcumina, Fluconazol, Hidrogel.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (CVV) is a pathology that affects a large part of the female population. Treatment with azole agents is widely prescribed and the number of isolates resistant to these agents has been growing. Thus, it is necessary to research new therapeutic alternatives. Curcumin (CUR) proves to be a promising alternative given its versatile bioactivity. In other studies, the combination of CUR with other APIs provided activity optimization. Thus, the present study evaluated the potential of the combination of CUR and fluconazole (FL) against strains of *Candida* spp. in a nanostructured lipid carrier (NLC), in view of the potential optimization intermediated by CLN. Considering the high fluidity of CLN and intravaginal application, the study evaluated its dispersion in thermoresponsive hydrogel. Thus, this project sought to evaluate the potential of CLN for co-encapsulation of CUR and FL dispersed in thermoresponsive hydrogels in the treatment of CVV. The development of CLN was carried out with the *Quality by Design* (QbD) approach in order to obtain a development based on quality. In order to obtain a working region based on the established quality criteria, a Box-Behnken study (3³) was conducted. Different physicochemical characterization techniques were approached and it was possible to obtain monodisperse CLN, with an average hydrodynamic diameter of 142.5 nm, with high encapsulation efficiency of CUR and FLU, prolonged release, reduced crystallinity index and spherical shape. The hydrogels were made using CLN as the aqueous phase (H-CLN) and the evaluation of the mechanical properties of H-CLN showed that each hydrogel had a different behavior according to the CLN used. The activity of the combination CUR and FLU, and the same nanostructured (CLNFC) was evaluated in *in vitro* models with planktonic cells and biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata*, as well as in *vivo model*. The results indicated the anti-candida potential of the CUR + FL combination and the optimization of the activity when in CLNFC. The cytotoxic potential of the samples was evaluated and it indicated that CLNFC is innocuous in murine macrophage and epithelial cells of the vaginal mucosa. The anti-inflammatory activity was evaluated by the determination of TNF-alpha, IL-6, IL-10, IL-2, in which anti-inflammatory activity of CLNFC was evidenced. Thus, the developed system has potential in the treatment of CVV, given the antifungal and anti-inflammatory activities demonstrated.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, Nanostructured Lipid Carrier, Curcumin, Fluconazole, Hydrogel

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	4
<i>Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos</i>	4
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1. Candidíase vulvovaginal	21
2.1.1. Patogênese e dados epidemiológicos	21
2.1.2. Sintomatologia e tratamentos	22
2.2. Antifúngicos azóis e fluconazol	24
2.3. Produtos naturais e curcumina para tratamento de CVV	26
2.4. Nanocarreadores	29
2.4.1. Carreador Lipídico Nanoestruturado.....	30
2.5. Administração vaginal de sistemas de entrega de fármacos (SEF)	31
2.6. Hidrogéis	33
2.6.1. Quitosana	33
3. OBJETIVO	34
3.1. Objetivos específicos	34
CAPÍTULO 2	35
<i>Carreadores Lipídicos Nanoestruturados</i>	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1. Definição dos QTPPs	37
2.2. Determinação dos CQAs.....	38
2.3. Determinação dos CMAs e CPPs	38
2.4. Avaliação de risco prévia	38
2.5. Estudo de pré-formulação	39
2.5.1. Avaliação de cristalinidade por microscopia de luz polarizada	39

2.5.2. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	39
2.6. Desenvolvimento dos CLN.....	39
2.7. Box–Behnken (BB) para otimização dos CLN e determinação do Design Space (DS)	40
2.8. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, e potencial zeta.....	41
2.9. Validação do método analítico para quantificação de fluconazol e curcumina 41	
2.10. Eficiência de encapsulação e drug-loading.....	41
2.11. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	42
2.12. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	43
2.13. Estudo de difusão in vitro	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1. Definição do QTPP e CQAs para CLN de uso intravaginal.....	44
3.2. Análise de risco prévia	49
3.3. Estudos de pré-formulação	56
3.4. Desenvolvimento dos CLN.....	59
3.5. Obtenção do design-space e seleção do CLN	70
3.6. Desenvolvimento de CLN-controle e resumo de caracterização.....	72
3.7. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	74
3.8. Microscopia eletrônica de transmissão	77
3.9. Liberação de curcumina e fluconazol in vitro	78
4. Resumo de resultados – CLN: Desenvolvimento e caracterização	81
CAPÍTULO 3	83
<i>Desenvolvimento e caracterização dos hidrogéis termorresponsivos</i>	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1. Desenvolvimento dos hidrogéis	84
2.2. Teste de inversão de tubo.....	85

2.3. Perfil de análise de textura (TPA)	85
2.4. Avaliação da força mucoadesiva por disco de mucina.....	86
2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1. Desenvolvimento dos hidrogéis e avaliação do perfil de análise de textura (TPA)87	
3.2. Perfil de análise de textura (TPA)	88
3.3. Avaliação da força mucoadesiva com disco de mucina	90
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	92
4. Resumo de resultados – Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis	94
CAPÍTULO 4	95
<i>Avaliações in vitro e in vivo</i>	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. MATERIAIS E MÉTODOS	97
2.1. Cultivo das cepas estudadas	97
2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	97
2.3. Estudo de combinação (Checkerboard)	98
2.4. Inibição da formação de biofilmes	99
2.5. Atividade em biofilmes pré-formados	99
2.6. Análise da atividade em biofilmes pré-formados com microscopia confocal 100	
2.7. Ensaio in vivo alternativo com <i>Galleria mellonella</i>	101
2.7.1. Condições de infecção da <i>G.mellonella</i>	101
2.7.2. Quantificação da eficácia terapêutica anti- <i>C.albicans</i> na hemolinfa. ...	101
2.8. Cultivo de células RAW 264.7 e CRL-2616.....	103
2.9. Ensaio de viabilidade celular	104
2.10. Estudo em cultura de macrófagos RAW 264.7 e propriedades anti- inflamatórias.....	105

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1. Determinação inicial da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM).....	106
3.2. Ensaio combinatório.....	107
3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM) das amostras desenvolvidas.....	108
3.4. Atividade em biofilme	112
3.5. Análise da atividade contra biofilmes pré-formados por microscopia confocal	120
3.6. Ensaio in vivo em modelo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	124
3.7. Viabilidade celular	125
3.8. Atividade anti-inflamatória	126
4. Resumo de resultados – Avaliações <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	130
CAPÍTULO 5	132
<i>Considerações finais</i>	132
1. Considerações finais.....	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento de candidíase vulvovaginal de acordo com Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020.	23
Tabela 2. Classificação da curcumina e do fluconazol de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), bem como as propriedades de solubilidade e permeabilidade dos fármacos alocados em cada classe.	27
Tabela 3. Perfil do produto (QTPP) para CLN contendo FL e CUR.	45
Tabela 4. Variáveis testadas no estudo de filtragem.	59
Tabela 5. Variáveis usadas no estudo de BB.	61
Tabela 6. Sumário estatístico após análise com BB da variável “DH”.	62
Tabela 7. Sumário estatístico após análise com BB da variável “PDI”.	64
Tabela 8. Sumário estatístico após análise com BB da variável “EE% CUR”.	66
Tabela 9. Sumário estatístico após análise com BB da variável “EE% FL”.	68
Tabela 10. Resultados obtidos após caracterização coloidal das CLN, bem como a eficiência de encapsulação e <i>drug-loading</i>	73
Tabela 11. Resultados obtidos com análise de DSC do colesterol, dos fármacos e das CLNs.	74
Tabela 12. Modelos matemáticos aplicados à liberação de curcumina.	80
Tabela 13. Modelos matemáticos aplicados à liberação de fluconazol.	80
Tabela 14. Atributos Críticos de Qualidade versus CLN obtida no final do estudo de desenvolvimento.	82
Tabela 15. Grupos experimentais avaliados pelo modelo em <i>G.mellonella</i>	102
Tabela 16. Resultados do ensaio combinatório entre curcumina e fluconazol utilizando as cepas de <i>C. albicans</i> 18804 e <i>C.glabrata</i> 2001.	107
Tabela 17. Valores de CIM e CFM obtidos.	111
Tabela 18. Viabilidade celular nas linhagens RAW 264.7 e CRL-2616. IC ₅₀ = concentração do composto necessária para 50% de viabilidade.	126

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Atributos de qualidade e CQAs para CLN contendo FL e CUR.....	48
Quadro 2. Matriz utilizada para classificação de risco.....	50
Quadro 3. Análise de risco prévia.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do fluconazol.	25
Figura 2. Solubilidade do FL em diferentes pH. Dado disponível em Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions”, 2023.	25
Figura 3. Fórmula estrutural da curcumina.....	27
Figura 4. Representação esquemática de: 1) Nanopartícula lipídica sólida, 2) Carreador lipídico nanoestruturado, 3) Transição polimórfica para estado de menor energia com expulsão do fármaco. Figura baseada no trabalho de (ARAUJO et al., 2020c).	31
Figura 5. Fluxograma das etapas contempladas na abordagem por QbD no desenvolvimento de um produto.	37
Figura 6. Diagrama de Ishikawa evidenciando a relação de causa-e-efeito entre variáveis de processo e material aos atributos do CLN.	49
Figura 7. Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada de: (a) colesterol; (b) colesterol e óleo de rícino; (c) colesterol e MM; (d) colesterol, MM e óleo de rícino.	57
Figura 8. Curvas de calorimetria obtidas após a análise dos analitos fluconazol (FL), curcumina (CUR), miristrato de miristila (MM) e colesterol (COL).....	58
Figura 9. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável DH, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.	63
Figura 10. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável PDI, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.	65
Figura 11. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável EE% CUR, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.....	67
Figura 12. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável EE% FL, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.....	69
Figura 13. DS obtido com avaliação dos CQAs com auxílio do modelo BB.	71

Figura 14. Termogramas obtidos após análise de DSC das amostras: colesterol (COL), miristrato de miristila (MM), curcumina (CUR), fluconazol (FL), CLNBLANK, CLNC, CLNF, e CLNFC.	75
Figura 15. Micrografias obtidas por MET das amostras CLNBLANK (A), CLNF (B), CLNC (C), e CLNFC (D).....	77
Figura 16. Perfil de liberação comparativo dos fármacos em solução e em CLN.....	79
Figura 17. Propriedades mecânicas, Dureza (A), Adesão (B) e Coesão (C), dos hidrogéis formados (H-CLNBLANK, H-CLNC, H-CLNF, e H-CLNFC).....	90
Figura 18. Força de mucoadesão e trabalho de mucoadesão avaliados com disco de mucina dos hidrogéis formados (H-CLNBLANK, H-CLNC, H-CLNF, e H-CLNFC). ..	92
Figura 19. Micrografias obtidas por MEV das amostras H-CLNBLANK (a), H-CLNF (b), H-CLNC (c), e H-CLNFC (d).	93
Figura 20. Fases de formação de biofilme.	96
Figura 21. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre a adesão do biofilme (A) e a viabilidade (B) do mesmo de <i>C.albicans</i> 18804.	113
Figura 22. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre a adesão do biofilme (A) e a viabilidade (B) do mesmo de <i>C.glabrata</i> 2001.	114
Figura 23. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre biofilme pré-formado após 24h (A), e o plaqueamento (B), de <i>C.albicans</i> 18804.	115
Figura 24. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre biofilme pré-formado após 24h (A), e a ação fungicida (B), de <i>C.glabrata</i> 2001.....	116
Figura 25. Atividade das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) contra biofilmes de <i>C.albicans</i> 18804 após 48h (A) e 72h (B) de desenvolvimento.....	117
Figura 26. Atividade das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) contra biofilmes de <i>C.glabrata</i> 2001 após 48h (A) e 72h (B) de desenvolvimento.....	118
Figura 27. Integridade da membrana e biomassa de <i>C.albicans</i> ATCC 18804 por microscopia confocal com coloração <i>Live and Dead</i> . Verde: Microrganismo vivo marcado positivamente com Syto9. Amarelo/Vermelho: Microrganismo morto	

marcado positivamente com iodeto de propídio. Onde, a) Controle crescimento, b) Controle morte; c) CUR; d) FL; e) CUR e FL; f) Controle solução; g) CLNBLANK; h) CLNC; i) CLNF; e j) CLNFC.122

Figura 28. Integridade da membrana e biomassa de *C.glabrata* ATCC 2001 por microscopia confocal com coloração *Live and Dead*. Verde: Microrganismo vivo marcado positivamente com Syto9. Amarelo/Vermelho: Microrganismo morto marcado positivamente com iodeto de propídio. Onde, a) Controle crescimento, b) Controle morte; c) CUR; d) FL; e) CUR e FL; f) Controle solução; g) CLNBLANK; h) CLNC; i) CLNF; e j) CLNFC.123

Figura 29. Gráficos com espessuras dos biofilmes de (A) *C.albicans* ATCC 18804 e (B) *C.glabrata* ATCC 2001, obtidos pela técnica de confocal, em contato com as amostras avaliadas.123

Figura 30. Tratamento *in vivo* em modelo alternativo de infecção de *G.mellonella* por *C.albicans*.....125

Figura 31. Níveis de produção da citocina TNF- α em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações (P<0,001, ANOVA).127

Figura 32. Níveis de produção da citocina IL-6 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações (P<0,001, ANOVA).128

Figura 33. Níveis de produção da citocina IL-2 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações (P<0,001, ANOVA).129

Figura 34. Níveis de produção da citocina IL-10 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações (P<0,001, ANOVA).130

CAPÍTULO 1

Introdução, Revisão Bibliográfica e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

Candidíase Vulvovaginal (CVV) é uma patologia cujos sinais e sintomas estão relacionados a inflamação em resposta à presença de *Candida spp.*. A sintomatologia é inespecífica e pode ser confundida com uma gama de patologias vaginais tais como tricomoníase, gonorreia e outras infecções bacterianas. Prurido vulvonar, ardência seguida de irritação vaginal, dor durante o contato íntimo e disúria, são os sintomas mais comuns presentes em casos de CVV. Também há relatos de eritema, edema e fissuras vaginais e vulvonares. Apesar da CVV não estar associada a mortalidade, a patologia pode afetar a esfera social da paciente.

O tratamento antimicótico de CVV dispõe de apresentações tópicas e orais, sendo os agentes azólicos orais os mais prescritos. Contudo, esse grupo de medicamentos possui uma gama de efeitos adversos quando administrado por via oral e são pouco eficazes em CVV ocasionada por *cândida não-albicans*, as quais são capazes de desenvolver alta resistência a estes agentes. Vale a pena ressaltar que, em comparação com as terapias antibacterianas, a terapia antifúngica apresenta poucas opções de medicamentos. Desta forma, se faz necessário a busca de novas estratégias terapêuticas eficazes, com redução de efeitos adversos.

A curcumina (CUR) vem tomando atenção da comunidade científica visto a sua bioatividade de ampla aplicação, incluindo atividade antimicrobiana de amplo espectro (antibacterianas, antivirais, antifúngicas) e anti-inflamatória. Visando otimizar a terapia antimicrobiana de agentes já comercializados, e tendo em vista a atividade promissora da CUR, diferentes estudos avaliaram a associação destes agentes comprovando o potencial desta associação. Nesses estudos, foi avaliada a associação de CUR e fluconazol (FLU) contra cepas resistentes a esse agente, onde foi observada otimização da sua atividade.

Contudo, a CUR é insolúvel em meio aquoso o que dificulta a sua dissolução, o acesso ao local de ação e reduz a sua biodisponibilidade no organismo. Visto isso, a utilização de sistemas de liberação de fármacos para proporcionar maior solubilidade e proteção deste bioativo demonstra ser uma alternativa promissora.

Pesquisas focadas na tecnologia farmacêutica têm sido realizadas com o intuito de otimizar a dissolução de fármacos e moléculas bioativas. Entre as estratégias desenvolvidas, a nano-veiculação destas moléculas tem sido utilizada como alternativa para aumentar a solubilização e promover a liberação controlada destas.

Nanocarreadores são materiais compreendidos em escala nanométrica os quais são capazes de transportar múltiplos fármacos e/ou agentes de imagem e biomoléculas. Ao transportar os insumos farmacêuticos ativos (IFAs) em seu interior, os nanocarreadores usados como *drug-delivery systems* (DDS) podem promover a liberação prolongada dos mesmos e impedir a sua degradação no sistema biológico.

Entre os nanocarreadores mais estudados pode-se citar os baseados em lipídios tais como lipossomas, micro e nanoemulões e nanopartículas lipídicas. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são considerados a segunda geração das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), pois surgiram com o intuito de aprimorar as suas características. Diferentemente das NLS, os CLN apresentam em sua composição ao menos um lipídio líquido além do lipídio sólido em temperatura ambiente estruturalmente responsável pela organização da partícula. A presença do lipídio líquido promove aumento da desorganização estrutural do núcleo apolar da nanopartícula, favorecendo a encapsulação de fármacos apolares e impedindo a expulsão dos mesmos. Os CLN são desenvolvidos com a utilização de ácidos graxos, triglicerídeos e ceras como componentes de sua matriz, e de tensoativos como estabilizantes coloidais, tornando capaz de carregar moléculas hidrofílicas e lipofílicas.

Alguns estudos relatam a possibilidade de co-*delivery* de moléculas bioativas por CLN, e tendo em vista as características previamente citadas este nanossistema demonstra ser um candidato promissor para veicular CUR e FL simultaneamente. Por outro lado, CLN são nanossuspensões, o que dificulta a aplicação intravaginal visto a sua baixa viscosidade e alta escoabilidade, reduzindo o tempo de contato do sistema com a mucosa vaginal. Portanto é necessário o emprego de alternativas tecnológicas para aumentar a viscosidade destes sistemas.

Os hidrogéis vêm sido vastamente empregados como uma alternativa para veiculação de fármacos de administração tópica, devido a sua versatilidade e conforto em comparação a outros veículos. Assim, a utilização deste sistema em conjunto com CLN é uma alternativa para otimizar o tempo de contato dos nanossistemas com a mucosa vaginal, com consequente aumento do valor terapêutico.

Desta forma, neste trabalho pretende-se avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para co-encapsulação de curcumina e fluconazol dispersos em géis termorresponsivos no tratamento de candidíase vulvovaginal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Candidíase vulvovaginal*

2.1.1. *Patogênese e dados epidemiológicos*

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma patologia cujos sinais e sintomas estão relacionados à infecção e ao processo inflamatório decorrente da presença de *Candida spp.* (SANGAMITHRA et al., 2013). As leveduras de *Candida spp.* compõem a microbiota de seres humanos e estão presentes em mucosas, cavidade oral, unhas e pele (FREDLUND et al., 2013). A permanência desses microrganismos como componentes da microbiota vaginal é garantida pelos seus mecanismos de defesa, como a presença de lactobacilos e respostas imunes (FERRER, 2000). Fatores internos e externos que possam prejudicar esse equilíbrio podem favorecer o desenvolvimento de CVV. Entre esses fatores pode-se citar variações hormonais, diabetes, uso de antibióticos, imunodepressão e estresse (GONÇALVES et al., 2016).

A patogênese e o progresso da CVV são mediados por fatores de virulência, os quais incluem formação de biofilme, adesão, troca fenotípica (de levedura para hifa) e excreção de proteases (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019a; TAMURA et al., 2007). As espécies mais comuns associadas à CVV são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, sendo a maioria dos casos ocasionados por *C. albicans* seguida por *C. glabrata* (GONÇALVES et al., 2016).

Depois da vaginose bacteriana, a CVV é a causa mais comum de vaginite, e estima-se que cerca de 70-75% das mulheres irão manifestá-la em algum momento da vida (ANDERSON et al., 1989; DONDEERS; SOBEL, 2017). Segundo a revisão de Gonçalves et al. (2016) as incidências de CVV variam entre países e o Brasil

apresenta o terceiro maior índice global (AMOURI et al., 2011; ANDRIOU et al., 2009; OKUNGBOWA; ISIKHUEMHEN; DEDE, 2003). Em uma revisão sistemática realizada pelo nosso grupo de pesquisa, a prevalência estimada de CVV no Brasil é de 18%, podendo ser uma porcentagem maior tendo em vista a subnotificação por não se tratar de uma doença de notificação compulsória (CARVALHO et al., 2021). Recentemente, um subtipo crônico da CVV tem sido relatado na literatura, denominado como candidíase vulvovaginal recorrente (RCVV). A RCVV é arbitrariamente definida pelo número de quatro ou mais episódios de CVV ao ano, e sua patogênese é pouco conhecida tendo indícios de um componente genético associado (DENNING et al., 2018; SOBEL, 2016).

2.1.2. Sintomatologia e tratamentos

A sintomatologia que acompanha a CVV é inespecífica, o que muitas vezes pode ser confundida com outras infecções vaginais, tais como tricomoníase e gonorreia (ANDERSON; KLINK; COHRSEN, 2004). Os sintomas mais comuns associados a CVV são: prurido vulvar, ardência, dor durante o contato íntimo e disúria. Há também relatos de eritema, edema e fissuras vaginais e vulvares (ANDERSON; KLINK; COHRSEN, 2004; SOBEL, 2017). A CVV pode promover dor e grande desconforto, afetando a esfera social da paciente, desempenho no trabalho e, em casos de pacientes imunocomprometidos, pode gerar infecções sistêmicas graves (ASCIOGLU et al., 2002; DONDEERS; SOBEL, 2017).

O tratamento antimicótico de CVV dispõe de apresentações tópicas e orais, sendo os azóis orais os mais prescritos (SHIOZAWA et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2016). A terapia oral ou tópica com uso de azóis apresenta taxa de cura de 80 a 95% (DE CÁSSIA ORLANDI SARDI et al., 2021; FELIX; DE BRITO RÖDER; DOS SANTOS

PEDROSO, 2019). Contudo, quando a espécie responsável pela infecção é resistente ou possui sensibilidade reduzida, outras alternativas terapêuticas e terapias complementares devem ser consideradas (FELIX; DE BRITO RÖDER; DOS SANTOS PEDROSO, 2019). Para casos de CVVR, o esquema terapêutico inclui agentes azóis orais e sistêmicos, ou como alternativa, uso concomitante de agentes azóis orais e tópicos (DE CÁSSIA ORLANDI SARDI et al., 2021; FELIX; DE BRITO RÖDER; DOS SANTOS PEDROSO, 2019). Fármacos como FLU, miconazol e cetoconazol, são considerados como primeira escolha para o tratamento de infecções ocasionadas por *C.albicans* (DE CÁSSIA ORLANDI SARDI et al., 2021).

Na **Tabela 1** pode ser observado o tratamento preconizado pelo Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020 (DE CARVALHO et al., 2021).

Tabela 1. Tratamento de candidíase vulvovaginal de acordo com Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020.

Classificação	Tratamento	Observações
Primeira opção	Miconazol creme a 2% ou outros derivados imidazólicos, via vaginal, um aplicador cheio, à noite ao deitar-se, por 7 dias OU Nistatina 100.000 UI, uma aplicação, via vaginal, à noite ao deitar-se, por 14 dias	Parceiros sexuais não precisam ser tratados, exceto os sintomáticos.
Segunda opção	Fluconazol 150mg, via oral (VO), dose única OU Itraconazol 100mg, 2 comprimidos, VO, 2x/dia, por 1 dia	É comum durante a gestação, podendo haver recidivas pelas condições
Candidíase vulvovaginal		propícias do pH vaginal que se

complicada e recorrente	Indução: fluconazol 150mg, VO, 1x/dia, nos dias 1, 4 e 7 OU Itraconazol 100mg, 2 comprimidos, VO, 2x/dia, por 1 dia OU Miconazol creme vaginal tópico diário por 10-14 dias Manutenção: fluconazol 150mg, VO, 1x/semana, por 6 meses OU Miconazol creme vaginal tópico, 2x/semana OU Miconazol óvulo vaginal, 1x/semana, durante 6 meses	estabelecem nesse período. Tratamento em gestantes e lactantes: somente por via vaginal. O tratamento oral e o uso de triazóis está contraindicado.
----------------------------	---	--

2.2. Antifúngicos azóis e fluconazol

Os antifúngicos azóis abrangem duas grandes classes, os imidazóis e os triazóis. A ação antifúngica dessa classe de medicamentos advém da inibição 14 α -esterol desmetilase, comprometendo a biossíntese do ergosterol presente na membrana plasmática fúngica, e promove o aumento da concentração de 14- α -metilesteróis, que por sua vez interferem na permeabilidade celular (GOODMAN; GILMAN, 2010).

O FL, CAS 86386-73-74, é um triazólico ou bistriazólico fluorado (**Figura 1**) (CASALINUOVO; DI FRANCESCO; GARACI, 2004). O FL possui coeficiente de partição octanol/água (LogP) entre 0,4 e 0,5 e coeficiente de solubilidade (LogS) de -2,3, ponto de fusão entre 138 e 140°C, e macroscopicamente se apresenta como pó branco cristalino (BHESANIYA; NANDHA; BALUJA, 2014; BLOKHINA et al., 2020; CORRÊA; SALGADO, 2011; ORGOVÁN; KELEMEN; NOSZÁL, 2016).

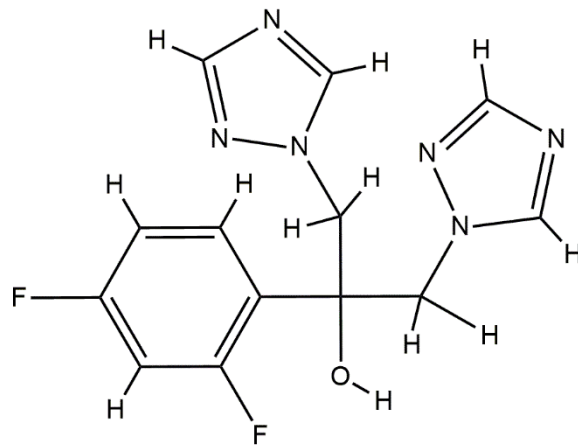


Figura 1. Fórmula estrutural do fluconazol.

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o FL é classificado como Classe III (**Tabela 2**) considerando alta solubilidade e baixa permeabilidade intestinal (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004). Contudo, a sua solubilidade em meio aquoso varia conforme a faixa de pH em que se encontra, conforme é apontado pela **Figura 2**, na qual pode ser observado que a solubilidade de FL decai significativamente em uma ampla faixa de pH, o que pode comprometer o seu uso por diferentes vias de administração.

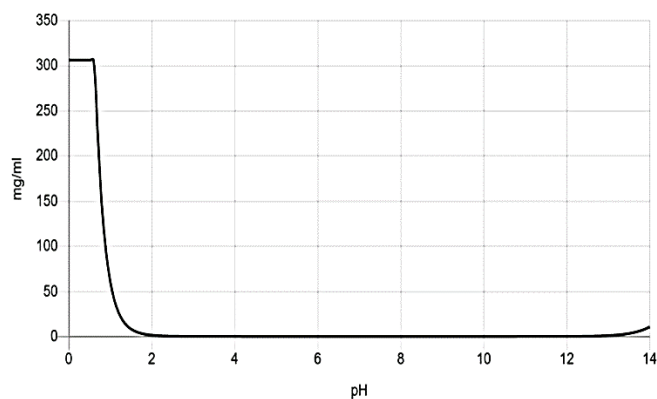


Figura 2. Solubilidade do FL em diferentes pH. Dado disponível em Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions”, 2023.

Do ponto de vista terapêutico, o FL possui menor toxicidade em comparação a anfotericina B, o que tem contribuído para seu amplo uso (CASALINUOVO; DI FRANCESCO; GARACI, 2004). Contudo, observa-se um aumento de isolados clínicos de *C.albicans* bem como de espécies não-*albicans* com baixa sensibilidade a esse fármaco (CASALINUOVO; DI FRANCESCO; GARACI, 2004; GONÇALVES et al., 2016; MARCHAIM et al., 2012). Vale a pena ressaltar que, em comparação com as terapias antibacterianas, a terapia antifúngica apresenta poucas opções de fármacos (DOS SANTOS RAMOS et al., 2019; RODERO et al., 2018).

Estudos clínicos relatam que na ausência de tratamento ou em casos de tratamento ineficaz de CVV as pacientes podem apresentar complicações associadas, tais como doença inflamatória pélvica, abscesso pélvico, aborto espontâneo e até mesmo infertilidade (GONÇALVES et al., 2016). Desta forma, se faz necessária a busca de novas estratégias terapêuticas eficazes.

2.3. Produtos naturais e curcumina para tratamento de CVV

Historicamente, produtos de origem natural tem sido explorados para a descoberta de novas terapêuticas. Essa busca decorre da alta biodiversidade e da sua capacidade de produzirem espécies moleculares diferenciadas frente a estímulos ambientais (MISHRA; TIWARI, 2011). Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, somos capazes de isolar espécies moleculares, bem como desenvolver novas moléculas com base nessas (MISHRA; TIWARI, 2011). Segundo a revisão de Rycher e colaboradores, (2020) as moléculas de origem natural permanecem como uma das melhores fontes para a descoberta de moléculas bioativas para tratamento de doenças infecciosas, em decorrência da alta biodiversidade associada a descoberta de novos mecanismos de ação (DE RYCKER et al., 2020).

Como exemplo de produtos naturais usados como tratamento alternativo encontra-se a curcumina (**Figura 3**), ou diferulonilmetano (CAS 458-31-7), que é uma molécula encontrada no rizoma da espécie *Curcuma longa* (L) e possui aspecto cristalino em cor amarelo vibrante (AJAZUDDIN et al., 2014; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013) . A CUR possui ainda LogP entre 3,29 e 3,69, baixa solubilidade em água, e ponto de fusão de aproximadamente 183°C (LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Ainda, de acordo com o SCB a CUR é classificada como Classe IV (**Tabela 2**), baixa solubilidade e baixa permeação intestinal (BHAT et al., 2019).

Tabela 2. Classificação da curcumina e do fluconazol de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), bem como as propriedades de solubilidade e permeabilidade dos fármacos alocados em cada classe.

Insumo Farmacêutico Ativo	Classificação	Solubilidade e Permeabilidade	Referência
Fluconazol	Classe III	Alta/Baixa	(Lindenberg; Kopp; Dressman, 2004)
Curcumina	Classe IV	Baixa/Baixa	(Bhat et al., 2019)

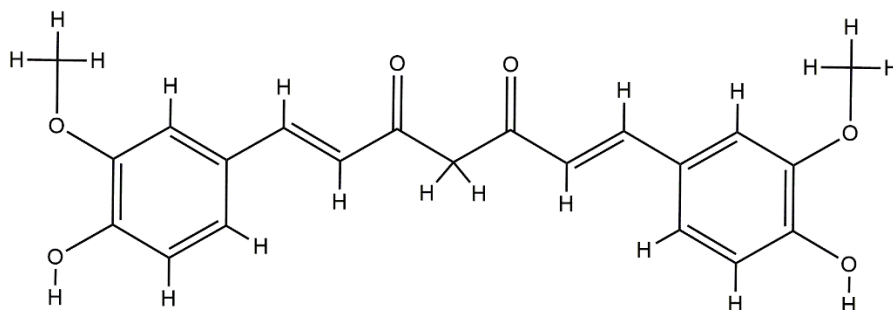


Figura 3. Fórmula estrutural da curcumina.

Do ponto de vista terapêutico, a CUR vem despertando a atenção da comunidade científica visto a sua bioatividade de ampla aplicação, para qual foi possível observar atividade antimicrobiana de amplo espectro, incluindo atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas; além de atividade antioxidantes e anti-inflamatórias que podem promover alívio de sintomas provocados por infecções (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

O potencial anti-*Candida spp.* da curcumina foi observado em diversos estudos nos quais a molécula apresentou atividade fungicida frente à 4 cepas de ATCC e 10 isolados clínicos, assim como em 38 espécies diferentes de isolados clínicos resistentes a FL (KHAN et al., 2012). A literatura relata diferentes formas pelas quais a CUR induz efeito anti-*Candida spp.* No estudo de Lee et al., (2014) foi observado que a biomolécula promove alterações na membrana plasmática de *C. albicans* (ATCC 90028). Sharma et al. (2010) avaliaram o comportamento de cepas de *C. albicans* e não-*albicans* após o tratamento com CUR e observaram aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio e mRNAs relacionados ao estresse oxidativo, assim como inibição do desenvolvimento de hifas por inibição de TUP1 (captação de timidina 1). Adicionalmente, no estudo de Khan et al. (2012) foi demonstrado que a curcumina promoveu inibição do efluxo de H⁺ levando à acidificação intracelular e morte de diferentes tipos de *Candida spp.*

Outros estudos ainda descreveram que a associação da CUR com outros compostos apresentou um efeito mais significativo em relação ao fármaco isolado, podendo ser utilizada em terapia combinada (GALLATE et al., 2018; JAVAN et al., 2019; LI et al., 2019; TSAO; YIN, 2000; YANG et al., 2018). Garcia-Gomes et al., (2012) demonstraram em seu estudo o potencial sinérgico de CUR e FL frente a *C. albicans* resistentes aos azóis.

Apesar do potencial da associação de CUR e FLU, alguns aspectos devem ser considerados para viabilidade de sua aplicação intravaginal. O FL apresenta redução de solubilidade em pH ácido-vaginal e a CUR é insolúvel em meio aquoso, tornando necessário o uso de DDS para explorar adequadamente efeitos biológicos dessa associação.

2.4. Nanocarreadores

Pesquisas na área de Tecnologia Farmacêutica estão sendo conduzidas com o intuito de otimizar a aplicação de fármacos e moléculas bioativas. Entre as estratégias desenvolvidas, a utilização de nanopartículas como DDS tem sido pesquisada como alternativa para aumentar a solubilidade, liberação modificada, e aumento de estabilidade de IFAs (BEHBAHANI et al., 2019; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012; GERA et al., 2017; PEER et al., 2007a).

A nanociência é uma área de estudo multidisciplinar, idealizado por Richard Feynman em 1959, que integra diferentes áreas do conhecimento visando uma variedade de estruturas submicrométricas (KOOPMANS; AGGELI, 2010). Entre os objetos de estudo da nanociência, pode-se citar o desenvolvimento de nanocarreadores para o tratamento de patologias (PEER et al., 2007b).

Os nanocarreadores são materiais compreendidos em nanoescala e são capazes de transportar fármacos e/ou agentes de imagem (OCHEKPE; OLORUNFEMI; NGWULUKA, 2009). O transporte de fármacos em nanoestrutura pode prevenir a degradação do fármaco em contato com o sistema biológico, aumentar estabilidade e solubilidade, promover a manutenção da janela terapêutica e, em alguns casos, contornar mecanismos de resistência de microrganismos (PEER et al., 2007a). Entre os nanossistemas destinados ao carreamento de fármacos podemos citar as

nanopartículas metálicas, nanopartículas de sílica mesoporosa, nanopartículas poliméricas, nanossistemas à base de lipídios, entre outros.

Uma diversidade de nanossistemas à base de lipídios pode ser encontrada na literatura, com diferentes características que podem ser exploradas de acordo com o alvo e a resposta terapêutica almejados. Entre os nanossistemas dessa classe pode-se citar os lipossomas, niossomas, nano e microemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, etc, os quais apresentam características físico-químicas distintas (ARAUJO et al., 2020a).

2.4.1. Carreador Lipídico Nanoestruturado

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são considerados como a terceira geração de nanoemulsões e a segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). São sistemas coloidais, compreendidos em nanoescala, com núcleo hidrofóbico dispersos em meio aquoso e estabilizados por moléculas tensoativas, tornando-os capazes de carrear moléculas lipo e hidrofílicas (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

Os métodos de obtenção, caracterização e biocompatibilidade de CLN são muito semelhantes aos de NLS (PARDESHI et al., 2012; SHAH; KAKUMANU; BANSAL, 2006), mas a substituição parcial do lipídio sólido (LS) por líquido lipídio (óleo), fornece vantagens ao CLN sobre seus antecessores (ARAUJO et al., 2020b; PARDESHI et al., 2012). Essa substituição parcial, além de associar as vantagens da presença de LS que inclui maior resistência e liberação controlada de fármacos, também reduz os eventos cristalinos causados por eles, evitando a expulsão do fármaco durante o desenvolvimento e armazenamento (**Figura 4**), bem como aumenta a capacidade do sistema de carrear fármacos (GARCÊS et al., 2018; SAEDI et al., 2018; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

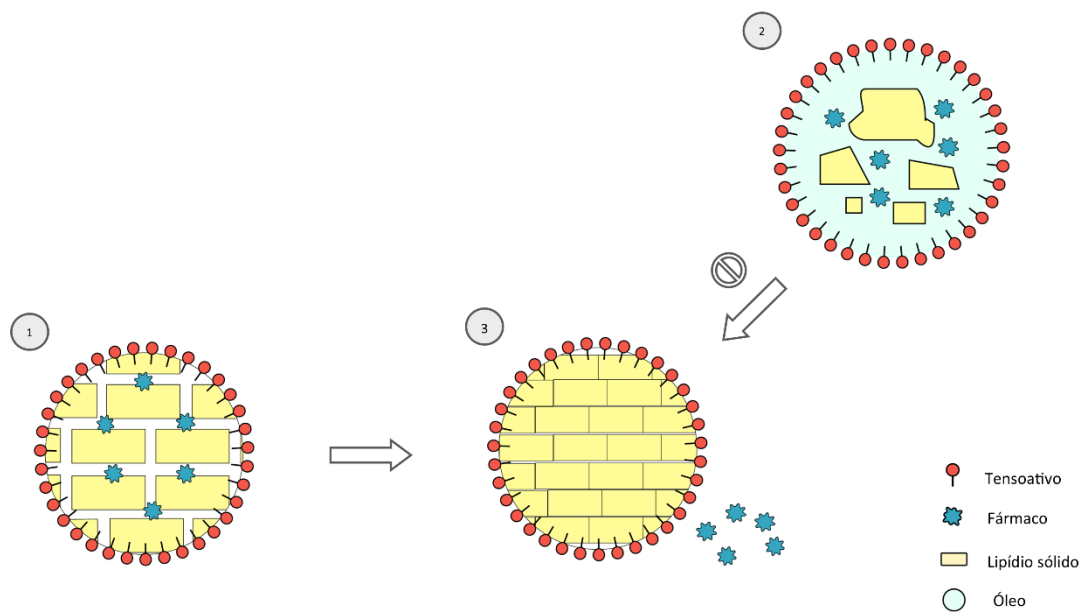


Figura 4. Representação esquemática de: 1) Nanopartícula lipídica sólida, 2) Carreador lipídico nanoestruturado, 3) Transição polimórfica para estado de menor energia com expulsão do fármaco. Figura baseada no trabalho de (ARAUJO et al., 2020c).

Em decorrência das características supracitadas, o CLN vem sendo idealizado visando várias vias de administração, incluindo vaginal.

2.5. Administração vaginal de sistemas de entrega de fármacos (SEF)

A administração intravaginal de sistemas de entrega de fármacos (SEF) demonstra ser uma via alternativa promissora para tratamentos de ação local, visto que a mesma evita o metabolismo de primeira passagem impedindo a inativação dos fármacos, reduz incidência de efeitos adversos e de interações medicamentosas, é de fácil administração, e reduz o número de doses necessárias (ALEXANDER et al., 2004). Apesar de seu potencial, observa-se que esta via de administração é pouco explorada (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Alexander e colaboradores (ALEXANDER et al., 2004) descreveram as características ideais de DDS para administração intravaginal como:

fácil aplicação, indolor, dispensa auxílio profissional para aplicação, impacto mínimo no cotidiano, e alta biocompatibilidade. Adicionalmente, a administração intravaginal de SEF proporciona atividade local do fármaco bem como a capacidade de promover a absorção e gerar efeitos sistêmicos (ALEXANDER et al., 2004; HUSSAIN; AHSAN, 2005).

A via intravaginal tem sido tradicionalmente explorada para a administração local de agentes antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, antivirais, espermicidas, e hormônios sexuais (EL-HAMMADI; ARIAS, 2021). O processo de desenvolvimento de DDS para aplicação intravaginal deve levar em consideração as características fisiológicas, como o pH ácido ($\geq 4,5$), a microbiota, e as alterações fisiológicas cíclicas e relacionadas a idade da paciente (HUSSAIN; AHSAN, 2005; LINHARES et al., 2011), para garantir a eficácia e segurança do tratamento proposto.

Considerando esses aspectos, a utilização de nanocarreadores como DDS para aplicação vaginal é promissora, visto que os mesmos são capazes de reduzir a influência dos fatores fisiológicos vaginais sobre o IFA, bem como preservar o microambiente de aplicação (ENSIGN; CONE; HANES, 2014; RAMOS et al., 2015).

No capítulo de El-Hammadia e Arias (EL-HAMMADI; ARIAS, 2021) os autores discorrem que algumas características de nanossistemas determinam o sucesso do uso de nanopartículas (NPs) para aplicação intravaginal, como o tamanho, a carga e modificações de superfície. Contudo, assim como as formulações convencionais para uso intravaginal, as nanossuspensões estão associadas a baixa retenção no epitélio vaginal, apresentando alta escoabilidade, o que favorece o vazamento e a redução do tempo de contato do fármaco com a região de aplicação causando desconforto do usuário (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Desta forma, atualmente os estudos destinados

ao desenvolvimento de DDS para aplicação intravaginal vêm utilizando polímeros bioadesivos em formas farmacêuticas semi-sólidas para contornar tais problemas.

2.6. Hidrogéis

Os hidrogéis são uma alternativa interessante para incorporar sistemas que tenham alto escoamento, como os CLN (AKA-ANY-GRAH et al., 2010; REGINA et al., 2012). Hidrogéis são estruturas tridimensionais poliméricas com capacidade de intumescer em água ou em fluídos biológicos sem a quebra de sua estrutura (WANG et al., 2019; MOHAMMED et al., 2017). Os hidrogéis termorresponsivos têm ganhado destaque visto a sua fácil aplicação com fluxo livre em temperatura ambiente, e geleificação a temperatura fisiológica (32–37 °C), permitindo sua aplicação por *spray* ou injetável (WANG et al., 2019). Os sistemas termossensíveis com base em Polaxamer (Pluronic®) são amplamente descritos pela literatura em virtude da sua capacidade de promover adesão de nanoestruturas em mucosas, com consequente aumento no valor terapêutico (CORREA et al., 2021; LEROUX; RUEL-GARIE, 2004). Ainda, observa-se na literatura, o acréscimo de matérias-primas com propriedades mucoadesivas para otimizar as propriedades de hidrogéis termorresponsivos, como a quitosana (ARAUJO et al., 2021).

2.6.1. Quitosana

A quitosana é um polímero obtido após a desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente na estrutura de fungos, insetos e crustáceos (WANG; LI; YAO, 2011). A mucoadesão promovida pela quitosana decorre da interação entre o biopolímero e a mucina, envolvendo interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos (SOGIAS; WILLIAMS; KHUTORYANSKIY, 2008). Em decorrência

desta capacidade, a quitosana tem sido empregada para aumentar a mucoadesão de diferentes DDS destinados a aplicação vaginal, incluindo hidrogéis (ARAUJO et al., 2021).

3. OBJETIVO

O objetivo principal do presente trabalho é avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para co-encapsulação de curcumina e fluconazol dispersos em géis termorresponsivos no tratamento de candidíase vulvovaginal.

3.1. *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Desenvolver CLN utilizando o racional de QbD;
- Avaliar o potencial sinérgico de CUR e FL *in vitro* por *checkerboard*;
- Caracterizar sob o aspecto físico-químico o CLNFC desenvolvido;
- Caracterizar fisicamente os hidrogéis desenvolvidos;
- Realizar avaliação antifúngica *in vitro* do CLNFC e H-CLN desenvolvidos;
- Avaliar *in vitro* o potencial do CLNFC em biofilmes;
- Realizar avaliação antifúngica *in vivo* do CLNFC em modelo de *Galleria melonella*;
- Determinar a toxicidade *in vitro* de CLNFC;
- Determinar o potencial anti-inflamatório de CLNFC.

CAPÍTULO 2

Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Desenvolvimento e Caracterização

1. INTRODUÇÃO

A qualidade baseada no projeto (*Quality by design*, QbD) é uma abordagem sistemática na qual a qualidade é construída com profundo conhecimento do produto, do processo e dos riscos inerentes à sua fabricação, a fim de mitigar os riscos atrelados (BEZERRA; RODRIGUES, 2017). A Conferência Internacional de Harmonização (ICH), por meio do documento técnico ICH Q8(R2) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009) estabelece as diretrizes para implementação do QbD no desenvolvimento farmacêutico, e por meio do ICH Q9 (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005) aborda o gerenciamento de riscos da qualidade e ferramentas que podem ser empregadas com este objetivo.

O QbD é iniciado com a definição de objetivos, com foco no produto, e no entendimento do processo, baseado em conhecimento científico sólido e no gerenciamento de risco. Para isso, deve haver a determinação do perfil do produto (*quality target product profile*, QTPP), dos atributos críticos de qualidade (*critical quality attributes*, CQAs), atributos críticos de material (*critical material attributes*, CMAs) e parâmetros críticos de processo (*critical processes parameters*, CPPs), bem como a análise de risco, com intuito de identificar atributos de material e parâmetros de processo que podem potencialmente afetar os CQAs do produto (KOVÁCS et al., 2017). O fluxograma da abordagem QbD no desenvolvimento de formulações pode ser observado na **Figura 5**.

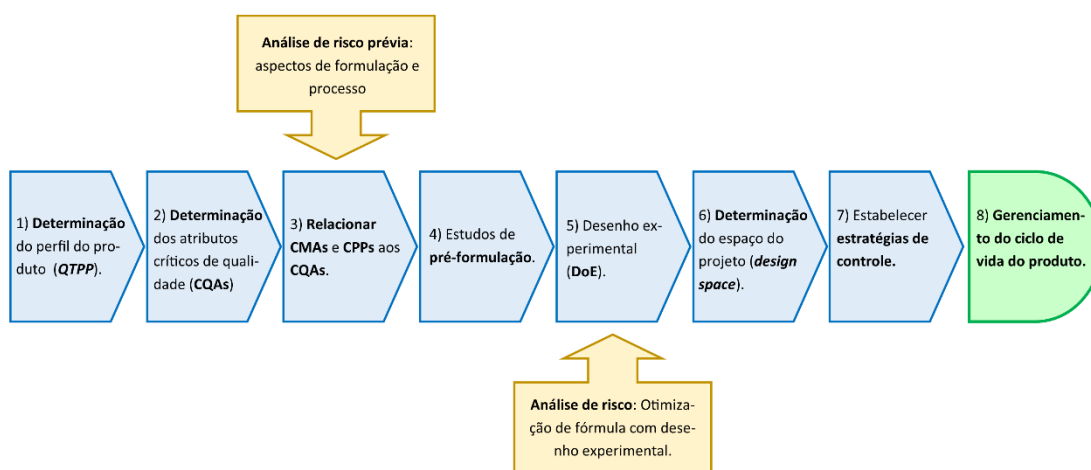


Figura 5. Fluxograma das etapas contempladas na abordagem por QbD no desenvolvimento de um produto.

Segundo Elliott et al., (2013), o QbD promove benefícios que incluem: o melhor desenvolvimento de produto, redução de problemas durante o desenvolvimento, compreensão e mitigação de riscos, redução de custos de produção, promoção da melhoria contínua, entre outros. Desta forma, o presente estudo buscou incorporar em seu escopo de desenvolvimento das nanoestruturas com a abordagem por QbD a fim de obter um desenvolvimento racional e baseado na qualidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Definição dos QTPPs

O primeiro passo para o desenvolvimento de um produto com base no QbD é definir o perfil do produto almejado (QTPPs) fundamentado nos requisitos regulatórios, expectativas do paciente e aspectos industriais. Nesta etapa, deve ser definida a via de administração desejada, forma farmacêutica, doses máximas e mínimas, aparência, etc. Visto a definição prévia, se faz necessário o levantamento de características fundamentais para assegurar a qualidade, segurança e eficácia do

produto idealizado, como estabilidade, perfil de dissolução, atributos farmacocinéticos, etc (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009).

2.2. Determinação dos CQAs

O próximo passo no QbD é resumir os atributos de qualidade do produto que devem ser assegurados durante o desenvolvimento a fim de atingir a qualidade almejada do produto. Os CQAs abordam propriedades físico-químicas e biológicas que devem estar dentro de limites determinados para garantir a qualidade desejada do produto (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009).

2.3. Determinação dos CMAs e CPPs

O terceiro passo no desenvolvimento baseado em QbD é definir os atributos do material (CMAs) e os parâmetros críticos de processo (CPPs) que podem influenciar nos CQAs. Nesta etapa, são abordadas propriedades do IFA, dos excipientes e parâmetros de processo (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009).

2.4. Avaliação de risco prévia

A avaliação de risco consiste na identificação e avaliação de riscos detectados à uma determinada formulação. Esta avaliação pode ser feita por diferentes ferramentas que permitem discriminar as fontes de variação de um sistema e priorizar os pontos de investigação de um processo (BEZERRA; RODRIGUES, 2017; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

2.5. Estudo de pré-formulação

O estudo de pré-formulação contempla análises que são empregadas a fim de auxiliar no desenvolvimento do produto em questão.

2.5.1. Avaliação de cristalinidade por microscopia de luz polarizada

Tendo em vista que o alto potencial cristalino do colesterol (COL), foi realizada a combinação com óleo de rícino (OR) e miristrato de miristila (MM). A cristalinidade dos lipídeos foi avaliada pela microscopia de luz polarizada utilizando o equipamento Leica DM2700M. Para este estudo foi realizada avaliação da cristalinidade do colesterol isolado, colesterol com OR (60:40 m/m), colesterol com MM (60:40 m/m), colesterol com OR e MM (36:24:40 m/m). As amostras foram inicialmente aquecidas à 90°C e misturadas por 5 min. Após a solidificação em temperatura ambiente, as amostras foram depositadas em lâminas e avaliadas em aumento de 20 vezes.

2.5.2. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise de DSC foi realizada usando um calorímetro Q10 DSC (TA Instruments), ar seco dinâmico foi usado para TGA-DSC a uma taxa de fluxo de 50 mL/min. Uma taxa de aquecimento de 10°C/min foi adotada, com amostras pesando cerca de 10 mg em cadinhos de alumina. Para esta técnica foi utilizada uma faixa de temperatura de 25°C a 250°C.

2.6. Desenvolvimento dos CLN

As amostras foram preparadas pelo método de homogeneização por cisalhamento a quente, como previamente descrito por Araujo e colaboradores (ARAUJO et al., 2020b). A fase oleosa (CL, MM, TW20 e OR) e fase aquosa (água deionizada) foram

aquecidas separadamente a 90°C. Os fármacos foram adicionados na fase oleosa a uma concentração de 1 mg/mL de CUR e 100 µg/mL de FLU. Após completa fusão do colesterol, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa com seguido cisalhamento em Ultra-Turrax IKA® (Staufen, Alemanha) a uma rotação de 10.000 rpm por 5 min. Posteriormente, a pré-emulsão formada foi submetida a agitação magnética branda até o arrefecimento do sistema a temperatura ambiente e subsequente formação dos CLN.

2.7.Box–Behnken (BB) para otimização dos CLN e determinação do Design Space (DS)

O desenho experimental BB está entre os métodos estatísticos úteis para a modelagem e análise de variáveis em formulação, com objetivo principal de otimizar as respostas frente a vários parâmetros, bem como um dos métodos estatísticos mais utilizados para otimização de CLN (JAZULI et al., 2019; KUDARHA et al., 2015; SOUTO et al., 2020). Adicionalmente, este tipo de projeto quantifica a relação entre as variáveis independentes e dependentes (KUDARHA et al., 2015).

No presente trabalho, o BB (3³) foi utilizado para avaliar o efeito combinado da proporção entre colesterol e miristrato de miristila (CL:MM), a proporção entre LS e OR, e proporção entre fase lipídica total e quantidade de tensoativo (Tween 20), em parâmetros como diâmetro hidrodinâmico médio (HD), índice de polidispersão (Pdl) e eficiência de encapsulamento (EE%) de CUR e FLU. Para o desenvolvimento deste estudo foi fixada a relação de 7,5% (m/m) de fase orgânica, e as concentrações de 1 mg/mL de CUR e 100 µg/mL de FLU, com base nos resultados microbiológicos prévios.

As amostras foram preparadas pelo método de homogeneização por cisalhamento a quente, como previamente descrito por Araujo e colaboradores (ARAUJO et al.,

2020b). A fase oleosa (CL, MM, TW20 e OR) e fase aquosa (água deionizada) foram aquecidas separadamente a 90°C. Os fármacos foram adicionados na fase oleosa a uma concentração de 1 mg/mL de CUR e 100 µg/mL de FLU. Após completa fusão do CL, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa com seguido cisalhamento em Ultra-Turrax IKA® (Staufen, Alemanha) a uma rotação de 10.000 rpm por 5 min. Posteriormente, a pré-emulsão formada foi submetida a agitação magnética branda até o arrefecimento do sistema a temperatura ambiente e subsequente formação dos CLN.

2.8. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas (DH), assim como Índice de Polidispersão (PDI) foram determinados pelo método de dispersão dinâmica de luz e o potencial zeta (PZ) método de mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern, EUA). As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em água deionizada.

2.9. Validação do método analítico para quantificação de fluconazol e curcumina

Desenvolveu-se um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para detecção simultânea de FL e CUR, validado de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos para Uso Humano) – Q2 (R1) e Food and Drug Administration - Guidance for Bioanalytical Method. O método utilizado para a validação bem como os parâmetros estão descritos detalhadamente no artigo apresentado no apêndice.

2.10. Eficiência de encapsulação e drug-loading

A eficiência de encapsulação indica a porcentagem de fármaco adicionado que está presente dentro do DDS. Para a determinação desta porcentagem, foi realizado o método indireto descrito por Bahrami & Farhadian, 2020 (BAHRAMI; FARHADIAN, 2020) e por Araujo e colaboradores, 2020 (ARAUJO et al., 2020b), com modificações. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida o sobrenadante contendo as nanoestruturas foi coletado e diluído em acetonitrilo promovendo o rompimento do nanossistema e liberação dos fármacos mantidos em seu interior. Posteriormente a solução formada foi filtrada em filtro PTFE de 0.22 µm, e a quantificação foi realizada por HPLC através do método previamente validado. A eficiência de encapsulação e o *drug-loading* foram calculados de acordo com as **Equações 1 e 2**.

$$EE\% = \left(\frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$DL\% = \left(\frac{\text{Massa de fármaco encapsulada}}{\text{Massa do conteúdo lipídico total}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.11. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Todas as amostras foram diluídas 1:10.000 com água bidestilada. A NTA foi realizada com microscópio digital LM10 HS System (NanoSight, Wiltshire, UK). As amostras diluídas foram injetadas com seringas estéreis na câmara de amostra equipada com laser de diodo 640 nm (vermelho). Todas as amostras foram medidas em um único obturador e modo de ganho por 90 s com obturador manual, ganho, brilho e ajustes de limiar em temperatura ambiente. As imagens de vídeo das partículas, movendo-se sob movimento browniano, foram capturadas e analisadas pelo software de análise de imagem NTA 2.0 NanoSight LM10 HS (NanoSight Ltd., Minton Park, Amesbury, Wiltshire SP47RT, Reino Unido), laser de 635 nm com uma

câmera de alta sensibilidade (EMCCD). Os valores médios de tamanho e SD obtidos pelo software NTA foram baseados nos valores aritméticos calculados com os tamanhos de todas as partículas analisadas pelo software para determinar o D10, D50, D70 e D90 como distribuições de tamanho de diâmetros médios numéricos. O valor Span de distribuição foi calculado com base na **Equação 3**.

$$\text{Span} = D90 - D10/D50 \quad (3)$$

2.12. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise DSC foi realizada usando um calorímetro Q10 DSC (TA Instruments). Ar seco dinâmico foi usado para TGA-DSC a uma taxa de fluxo de 50 mL min⁻¹. Uma taxa de aquecimento de 10 °C min min⁻¹ foi adotada, com amostras pesando cerca de 10 mg analisadas em cadinhos de alumina. Para esta técnica foi utilizada uma faixa de temperatura de 25°C a 250°C. Os índices de recristalização (IR) foram calculados de acordo com o estudo de Freitas & Müller (FREITAS; MÜLLER, 1999) pela **Equação 4**:

$$\text{IR}(\%) = \left(\Delta H_{\text{CLN DISPERSÃO}} / \Delta H_{\text{Lípido sólido}} \times \text{Fase lipídica}(\%) \right) \times 100 \quad (4)$$

2.13. Estudo de difusão in vitro

O estudo de difusão foi realizado usando células de difusão vertical do tipo Franz (área de difusão de 1,77 cm²). O sistema foi equipado com membrana de poliestersulfona de 0,45 µm, como modelo de barreira a fim de separar a amostra do compartimento acceptor. A solução acceptora selecionada para o estudo foi uma solução hidroalcóolica a 10% (v/v) com 1% (m/v) de TW20, para qual foi realizada a avaliação previa de condição *sink* para ambos os IFAs em estudo. A solução acceptora foi mantida em agitação branda (300 rpm) à 37°C durante todo o período do teste. Coletas de 2,0 mL de meio acceptor eram realizadas em tempos pré-definidos (0,5, 1,0,

1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 20,0 e 24,0 horas). CUR e FL foram quantificados por CLAE, cujas especificações de análise foram validadas conforme **item 2.9** e **ANEXO 1**.

A fim de avaliar o mecanismo de liberação de CUR e FL, diferentes modelos de cinética (Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, Weibull, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin) foram aplicados aos dados de difusão obtidos experimentalmente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Definição do QTPP e CQAs para CLN de uso intravaginal

O presente estudo buscou desenvolver CLN contendo FL e CUR para aplicação tratamento de candidíase vulvovaginal, e para isso, optou-se por utilizar o desenvolvimento por QbD a fim de obter um sistema robusto.

Como previamente mencionado, a determinação do perfil do produto (QTPP) é o primeiro passo para o desenvolvimento baseado em QbD, em que são elencadas características do produto que serão alcançadas para garantir a qualidade desejada, levando em consideração a segurança e eficácia (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009; KOVÁCS et al., 2017). Na **Tabela 3** podem ser observados os parâmetros de QTPP, bem como o alvo e as justificativas da escolha.

Tabela 3. Perfil do produto (QTPP) para CLN contendo FL e CUR.

Parâmetros de QTPP	Alvo	Justificativa
Forma farmacêutica	Nanossuspensão - CLN	Como amplamente descrito na literatura, nanoestruturas tem sido utilizado como DDS para promover otimização na terapia de fármacos já prescritos. CLN são nanossistemas biocompatíveis, de estabilidade elevada, capazes de incorporar altas concentrações de fármacos lipossolúveis e fármacos hidrossolúveis.
Via de administração	Intravaginal	Via de administração promissora para tratamentos locais, visto que a mesma evita o metabolismo de primeira passagem impedindo a inativação dos fármacos, reduz incidência de efeitos adversos e de interações medicamentosas, é de fácil administração, e reduz o número de doses necessárias.
Efeito terapêutico	Anti-cândida	O FL é um triazol utilizado para o tratamento de candidíases, porém o número de espécies pouco sensíveis ou resistentes a esse fármaco vem crescendo. A CUR é uma molécula de origem natural com potencial anti- <i>Candida</i> spp. amplamente descrito na literatura. Há estudo evidenciando o potencial sinérgico da associação de CUR e FL frente a <i>C.albicans</i> resistentes aos azóis.

Estabilidade (físico-química e biológica)	Sem sinais de agregação após um mês de preparo e armazenamento em temperatura ambiente	A estabilidade é necessária a fim de manter o efeito terapêutico do fármaco e indispensável para comercialização.
Perfil de liberação	Liberação prolongada	A liberação prolongada possibilita a manutenção da concentração de fármaco na janela terapêutica reduzindo a probabilidade de efeitos adversos, bem como a redução do número de doses necessárias.
Dose	> CIM ₉₀ > CFM <i>in vivo</i>	Tendo em vista que o potencial da combinação entre CUR e FL será testado de maneira empírica, a dose será determinada com base em dados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .

Após a análise e determinação dos parâmetros de QTPP, se faz necessário a identificação dos atributos críticos de qualidade (CQAs) os quais devem ser preservados para assegurar a qualidade do produto em estudo. Neste momento foram avaliados aspectos físico-químicos, biológicos e microbiológicos que devem estar em um limite, faixa ou distribuição apropriados para garantir a qualidade do produto (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009). No **Quadro 1** são elencados os CQAs que potencialmente oferecem riscos à qualidade do produto desenvolvido.

Quadro 1. Atributos de qualidade e CQAs para CLN contendo FL e CUR.

Atributos de qualidade	Alvo	É considerado um CQA?	Justificativa
Características macroscópicas	Dispersão amarelada, opalescente e sem odor.	NÃO	O atributo não é tido como CQA visto que o mesmo não oferece risco à eficácia e segurança do paciente.
Tamanho de partícula	Tamanho de partícula em torno de 100 a 200 nm	SIM	O tamanho de partícula acima da faixa descrita, descaracteriza o sistema como CLN e como nanoestrutura. O tamanho de partícula está relacionado com maior interações biológicas (SHANG; NIENHAUS; NIENHAUS, 2014). Ainda, o tamanho está relacionado ao contato da nanoestrutura com o muco (EL-HAMMADI; ARIAS, 2021).
Distribuição do tamanho de partícula	PDI < 0,2	SIM	Valores baixos de PDI indicam monodispersão da suspensão. A monodispersão de nanossistemas lipídicos está relacionada a maior estabilidade de armazenamento.
Perfil de liberação	Prolongada	SIM	Necessário para obter liberação prolongada dos IFAs, e desta forma manter os benefícios terapêuticos atrelados a nanoestruturas utilizadas como DDS.
Eficiência de encapsulação	90% a 110%	SIM	Indicativo da concentração de fármaco efetivamente incorporado na nanoestrutura.
pH	≤ 4,5	NÃO	Sistemas ideais para aplicação intravaginal não podem ser capazes alterar o pH vaginal (HUSSAIN; AHSAN, 2005; LINHARES et al., 2011). A nanossuspensão não será feita em meio tamponado, incapaz de interferir no pH vaginal.

3.2. Análise de risco prévia

Diagrama de causa e efeito, ou diagrama de Ishikawa, é uma ferramenta que permite identificar variáveis que podem ter impacto no atributo de qualidade desejado e auxilia na estruturação da gestão de riscos e na organização dados, facilitando na tomada de decisões (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

O diagrama de Ishikawa foi desenvolvido no presente trabalho a fim de evidenciar a relação de causa-e-efeito entre variáveis de processo e de material aos atributos do CLN, o qual está representado na **Figura 6**.

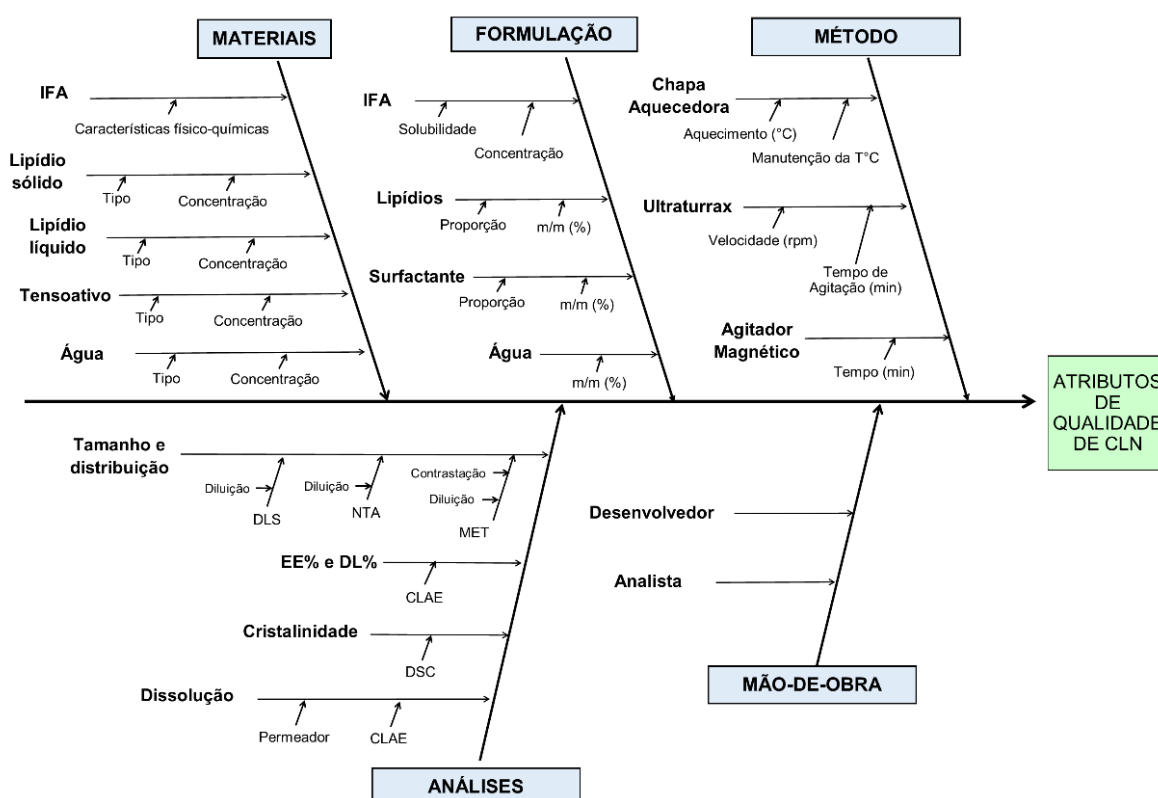


Figura 6. Diagrama de Ishikawa evidenciando a relação de causa-e-efeito entre variáveis de processo e material aos atributos do CLN.

Após mapeamento das variáveis que podem impactar nos atributos de qualidade utilizando o diagrama de Ishikawa, foi elaborada uma planilha de análise de risco

prévia visando descrever os riscos e classificá-los. A análise de risco prévia pode ser observada no **Quadro 3**, onde o risco classificado como “aceitável” é aquele que representa risco baixo e não precisa de maiores investigações, “moderado” é aquele que oferece risco médio onde investigações mais detalhadas não são necessárias e “crítico” é aquele que oferece risco alto tornando necessária investigação detalhada. A classificação do risco foi realizada conforme a matriz do **Quadro 2**.

Quadro 2. Matriz utilizada para classificação de risco.

Impacto		Muito baixo	Baixo	Médio	Alto	Muito alto
Probabilidade	Muito Alto	Moderado	Moderado	Crítico	Crítico	Crítico
	Alto	Aceitável	Moderado	Moderado	Crítico	Crítico
	Médio	Aceitável	Moderado	Moderado	Crítico	Crítico
	Baixo	Aceitável	Aceitável	Moderado	Moderado	Crítico
	Muito baixo	Aceitável	Aceitável	Aceitável	Moderado	Moderado

Quadro 3. Análise de risco prévia.

ANÁLISE DE RISCO PRÉVIA									
Atributo	Risco	Descrição e CQA impactado	Risco inerente (sem controles)			Controles	Risco residual (com controles)		
			Probabilidade	Impacto	Classificação do risco		Probabilidade Residual	Impacto residual	Classificação do risco residual
MATERIAIS	Varição polimórfica do IFA.	A variação polimórfica pode alterar a propriedade de solubilidade do IFA. CQAs impactados: taxa de dissolução e EE%.	Muito Baixo	Muito Alto	Moderado	No presente estudo serão utilizados IFAs de mesmo lote. Ainda, as variações polimórficas dos IFAs em estudo não apresentam impacto significativo em sua solubilidade.	Muito baixo	Muito baixo	Aceitável
	Degradação dos lipídios.	Degradação dos lipídios pode promover alteração de propriedades químicas. Alterações físico-químicas de lipídios utilizados como matriz da CLN podem impactar estruturalmente no sistema final. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%.	Médio	Muito Alto	Crítico	Os lipídios utilizados serão armazenados de acordo com a descrição do fabricante a fim de reduzir a possibilidade de sua degradação.	Baixo	Alto	Moderado

	Degradação do tensoativo.	A degradação do tensoativo impede com que o mesmo exerça a sua função de reduzir a tensão superficial e formação das nanopartículas. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%.	Médio	Muito Alto	Crítico	O tensoativo utilizado será armazenado de acordo com a descrição do fabricante a fim de reduzir a possibilidade de sua degradação.	Baixo	Alto	Moderado
	Água com contaminações particulares e microbiológicas.	Água com contaminação particulada ou microbiológica pode impactar nas análises de tamanho a serem feitas. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição.	Médio	Médio	Moderado	Será utilizada água ultrapura a fim de mitigar o risco pontuado.	Baixo	Baixo	Aceitável
FORMULAÇÃO	A proporção não-ideal entre lipídio líquido e sólido, bem como sua concentração em fórmula (m/m).	A proporção não-ideal entre lipídio líquido e sólido pode inviabilizar a formação de CLN, ou formar outros sistemas. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%	Alto	Muito Alto	Crítico	A proporção entre lipídio líquido e sólido será definida com base na literatura. Contudo, por se tratar de uma formulação inovadora, maiores investigações serão necessárias a fim de investigar o impacto em CQAs	Alto	Alto	Crítico

	A proporção não-ideal entre tensoativo e lipídios, bem como sua concentração em fórmula (m/m).	A proporção não-ideal entre tensoativos e lipídios pode inviabilizar a formação de CLN, ou formar outros sistemas. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%	Alto	Muito Alto	Crítico	A proporção entre tensoativo e lipídios será definida com base na literatura. Contudo, por se tratar de uma formulação inovadora, maiores investigações serão necessárias a fim de investigar o impacto em CQAs	Alto	Alto	Crítico
	A quantidade de água insuficiente.	A quantidade de água insuficiente pode inviabilizar a formação de CLN. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%	Alto	Muito Alto	Crítico	A quantidade de água será definida com base em dados da literatura. Mesmo se tratando de uma formulação inovadora, esse componente não oferece alto impacto em CQA utilizando dados da literatura.	Baixo	Alto	Moderado
	A concentração insuficiente de IFA.	A concentração insuficiente de IFA acarretando na ineficácia terapêutica.	Alto	Muito Alto	Crítico	A concentração de IFA na formulação será feita com base em estudos <i>in</i>	Muito baixo	Alto	Moderado

						<i>vitro</i> prévios associados a dados da literatura.			
MÉTODO	Aquecimento e manutenção de temperatura ineficientes.	O aquecimento é um parâmetro fundamental para o desenvolvimento de CLN pelo método selecionado. Caso aquecimento ineficiente, compromete a formação de CLN. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%.	Alto	Muito Alto	Crítico	A temperatura utilizada será baseada no que é amplamente descrito na literatura (mínimo 5°C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido). Durante o processo, serão feitas avaliações periódicas de temperatura com termômetro infravermelho.	Baixo	Alto	Moderado
	Velocidade e tempo de rotação ineficiente.	A velocidade e tempo de rotação, utilizando Turrax, são parâmetros fundamentais para a formação de CLN visto que estão diretamente ligados à quantidade de energia imposta no sistema. Caso insuficientes, inviabiliza a formação de CLN. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição, taxa de dissolução e EE%.	Alto	Muito Alto	Crítico	A velocidade e tempo de agitação serão definidos com testes prévios e dados da literatura.	Baixo	Alto	Moderado

	Tempo de agitação para arrefecimento insuficiente.	Tempo de agitação insuficiente para o arrefecimento do sistema pode promover formação heterogênea de CLN. CQAs impactados: tamanho de partícula e distribuição.	Médio	Alto	Crítico	O controle de temperatura para arrefecimento do sistema à temperatura ambiente será feito com auxílio de um termômetro infravermelho.	Muito baixo	Baixo	Aceitável
--	--	---	-------	------	---------	---	-------------	-------	-----------

Baseado na análise de risco prévia (**Quadro 3**), os riscos residuais classificados como moderados foram acompanhados durante o desenvolvimento. Os riscos classificados como críticos, foram avaliados detalhadamente com auxílio de um desenho experimental (3³) posteriormente descrito.

3.3. Estudos de pré-formulação

Os CLN são sistemas com alta complexidade devido a suas características únicas as quais variam de acordo com cada composição e proporções dos componentes. No presente trabalho o colesterol (COL) foi selecionado como lipídio sólido (LS) com base na sua similaridade com o ergosterol presente na membrana dos fungos, a fim de aumentar a interação do sistema com as cepas. Contudo, este esterol apresenta alto ponto de fusão e organização cristalina estável o que poderia reduzir a capacidade do sistema de compartimentalizar dois fármacos (SUHALIM et al., 2012). Desta forma, optou-se por um segundo LS, o miristrato de miristila (MM), que possui baixo ponto de fusão e aumentaria a desorganização interna do sistema (TOFANI; SUMIRTAPURA; DARIJANTO, 2016). Considerando ainda que o método utilizado para desenvolver as CLN foi o de cisalhamento a quente, o óleo de rícino (OR) foi utilizado devido à sua alta resistência térmica.

Desta forma, com base nos aspectos citados, foi realizada a avaliação da cristalinidade por microscopia de luz polarizada do colesterol e suas combinações, com MM e OR, após a fusão dos LS (**Figura 7**).

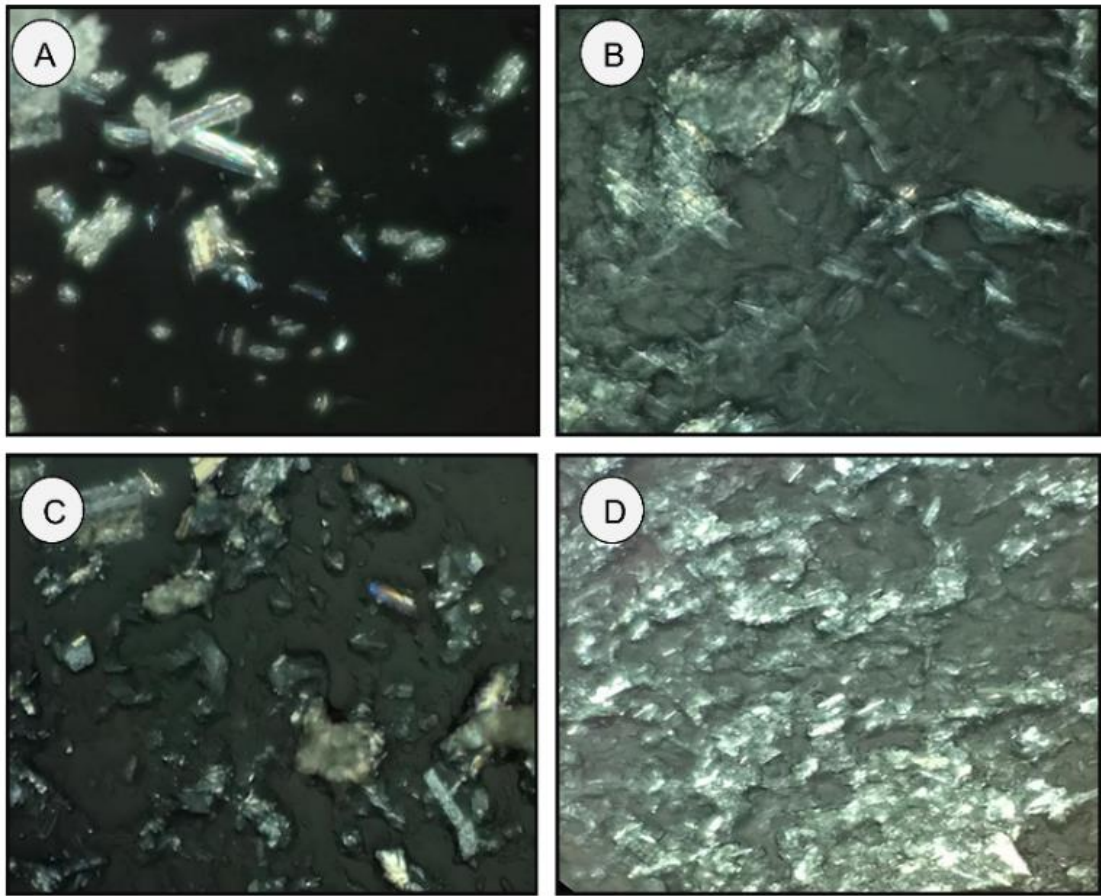


Figura 7. Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada de: (a) colesterol; (b) colesterol e óleo de rícino; (c) colesterol e MM; (d) colesterol, MM e óleo de rícino.

Como pode ser observado na **Figura 7a** o COL apresentou-se altamente cristalino, assim como sugerido pela literatura (SUHALIM et al., 2012). A mistura com MM e óleo de rícino (**Figuras 7b** e **7c**) separadamente, suprimiu a formação de cristais mais organizados em comparação ao COL isolado. Quando realizada a análise com a mistura dos três lipídeos, foi possível observar redução significativa de eventos cristalinos, com formação de estruturas mais amorfas (**Figura 7d**). Desta forma, a mistura realizada dos componentes suprime os eventos cristalinos do COL assim como o almejado.

Após a avaliação das estruturas cristalinas, foi realizada a análise do comportamento térmico dos componentes por calorimetria diferencial exploratória (Figura 8).

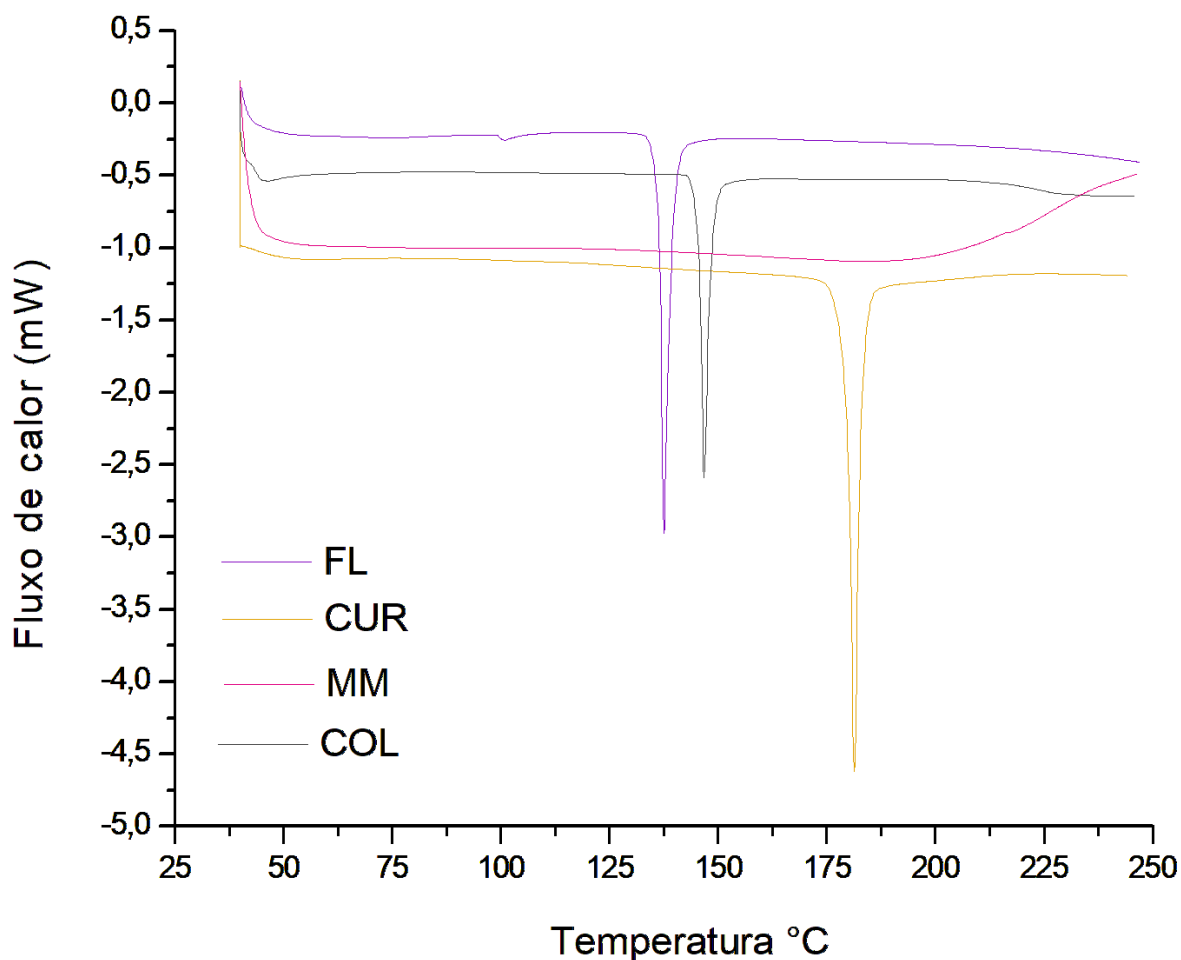


Figura 8. Curvas de calorimetria obtidas após a análise dos analitos fluconazol (FL), curcumina (CUR), miristrato de miristila (MM) e colesterol (COL).

Como ilustrado na **Figura 8**, os eventos endotérmicos ocasionados pela fusão do COL, CUR e FL (147,76°C, 183°C, e 137°C) corroboram o observado na literatura (148°C, 183°C, e 138°C), sugerindo a qualidade das matérias-primas utilizadas (CAROLINA ALVES et al., 2019; DARWESH; ALDAWSARI; BADR-ELDIN, 2018; WILLIAMS; MAHAGUNA; SRIWONGJANYA, 1998). Para MM observa-se um evento

endotérmico não definido a partir do 38°C, o que corrobora com o seu baixo ponto de fusão descrito na literatura (BARBOSA et al., 2013).

3.4. Desenvolvimento dos CLN

Baseado na análise de risco prévia (**Quadro 3**), os riscos classificados como críticos aos atributos críticos de qualidade foram avaliados detalhadamente com auxílio de desenhos experimentais.

Desta forma, a fim de explorar inicialmente o produto almejado, foi realizado um desenho experimental de triagem de três níveis e dois fatores (3^2), utilizando o software Minitab Versão 18.1, para avaliar a viabilidade e o impacto da proporção dos lipídeos na formulação. Os testes de triagem são aplicados para avaliar e determinar as variáveis mais influentes, bem como determinar a faixa de variação entre os fatores mais apropriada para seguir em estudo de otimização (CARLSON, 2001).

As proporções de referência foram baseadas no estudo de Araujo e colaboradores, 2020 (ARAUJO et al., 2020b), adotando 7,5% (m/m) de fase orgânica e 1:1 (m/m) de tensoativo em relação a lipídeos utilizados.

Tabela 4. Variáveis testadas no estudo de filtragem.

Variáveis independentes	Níveis		
	+1	0	-1
A: COL:MM	50:50	60:40	70:30
B: LS:OR	70:30	60:40	50:50
Variáveis dependentes (CQAs)	Almejado		
Diâmetro hidrodinâmico médio (DH)	100 a 200 nm		
Índice de polidispersão (PDI)	PDI < 0,2		

Onde, “COL” colesterol; “MM” miristrato de miristila, “LS” lipídeos sólidos” e “OR” óleo de rícino.

A equação gerada pelo modelo (**Equação 5**) encontra-se a seguir:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_4A^2 + b_5B^2 + b_7AB \quad (5)$$

O desenho experimental gerou 13 experimentos distintos, e por meio destes foram obtidas nanopartículas com características que variavam de 129,25 a 440,36 nm e PDI de 0,098 a 0,515. Ressalta-se que os critérios de avaliação dos resultados obtidos foram baseados nos CQAs previamente definidos (**Quadro 1**), onde o diâmetro almejado esteja na faixa de 100 a 200 nm e $PDI < 0,2$.

O aumento da concentração de OR proporcionou aumento significativo ($p < 0,05$) do DH ($R^2 = 0,869$), bem como o aumento do PDI ($R^2 = 0,956$) sugerindo a saturação deste óleo na matriz lipídica sólida, levando a formação de nanossuspensões de tamanho heterogêneo. Ainda em relação ao PDI, observa-se que a proporção entre os LS impactou significativamente nesta variável, onde o nível intermediário gerou valores mais baixos deste parâmetro. Sugere-se que tal comportamento decorre da miscibilidade entre estes LS.

Com base nos resultados obtidos, notou-se que as variáveis testadas impactaram significativamente nos CQAs e conseqüentemente nos atributos de qualidade almejados, tornando necessário o uso de estudos mais detalhados e robustos a fim de determinar as melhores condições de desenvolvimento, tendo como base as faixas estudadas.

Após avaliação das variáveis significativas, bem como estudo da faixa de variação, um estudo de otimização foi performedo. Os testes de otimização tem como objetivo prever valores de resposta para todas as combinações possíveis de fatores dentro da região experimental e identificar uma região experimental ótima (CARLSON, 2001).

O desenho experimental Box-Behnken (BB) está entre os métodos estatísticos úteis para a modelagem e análise de variáveis em formulação, com capacidade de otimizar as respostas frente a vários parâmetros, bem como um dos métodos estatísticos mais utilizados para otimização de CLNs (JAZULI et al., 2019; KUDARHA

et al., 2015; SOUTO et al., 2020). Adicionalmente, este tipo de projeto quantifica a relação entre as variáveis independentes e dependentes, auxiliando na determinação do *design space* (KUDARHA et al., 2015).

Com intuito avaliar o impacto das variáveis nos CQAs e obter uma região ótima de trabalho, a fim de preservar os atributos críticos de qualidade do produto, foi realizado um delineamento BB. Para este estudo foram selecionadas como variáveis independentes a proporção entre COL e MM (m/m), proporção entre LS e OR (m/m) e proporção entre conteúdo lipídico (FL) e tensoativo (TW20). (**Tabela 5**) A equação obtida com o modelo é descrita pela **Equação 6**. As variáveis dependentes selecionadas para estudo foram diâmetro hidrodinâmico (HD), índice de polidispersão (PDI) e eficiência de encapsulamento (EE%), com base nos CQAs previamente elencados.

Tabela 5. Variáveis usadas no estudo de BB.

Variáveis independentes	Níveis		
	+1	0	-1
A: COL:MM	70:30	60:40	50:50
B: LS:OR	55: 45	60:40	70:30
C: TW20:FL	2:1	1.5:1	1:1
Variáveis dependentes (CQAs)	Almejado		
Diâmetro hidrodinâmico (DH)	Minimizar		
Índice de polidispersão (PDI)	Minimizar		
Eficiência de encapsulação (EE%)	Maximizar		

Onde: “COL:MM” – proporção entre colesterol e miristrato de miristila; “LS:OR” – proporção entre lipídios sólidos totais e óleo de rícino; “TW20:FL” proporção entre Tween 20 e fase lipídica total.

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C ++ b_4A^2 + b_5B^2 + b_6C^2 + b_7AB + b_8AC + b_9BC \quad (6)$$

Tendo em vista as variáveis supracitadas, foi desenvolvida uma matriz de planejamento contendo um total de 15 experimentos, com três pontos centrais e 1

repetição. O planejamento foi idealizado com auxílio do software Design Expert Versão 13.0.

A primeira variável dependente avaliada com o modelo BB foi o diâmetro hidrodinâmico médio (DH), cujo sumário estatístico encontra-se descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6. Sumário estatístico após análise com BB da variável “DH”.

Fonte	<i>F</i> -valor	<i>p</i> -valor
Model	24,59	< 0,0001
A-COL:MM	0,0061	0,9398
B-LS:OR	1,56	0,2470
C-TW20:FL	97,62	< 0,0001
AB	23,34	0,0013
A²	11,39	0,0097
C²	15,40	0,0044
Falta de ajuste	18,13	0,0532
R²	0,94896	
R² ajustado	0,910	
R² previsto	0,7096	
Precisão Adeq	13,4774	

Onde, “COL:MM” – proporção entre colesterol e miristrato de miristila; “LS:OR” – proporção entre lipídios sólidos totais e óleo de rícino; “TW20:FL” proporção entre Tween 20 e fase lipídica total.

O *F*-valor de 24,59 implica que o modelo para a variável avaliada é significativo, e há apenas 0,01% de chance de que o modelo possa ser impactado por ruído. Valores de *p* inferior a 0,050 indicam quais os termos do modelo são significativos. Neste caso, a variável isolada “C” e interações “AB”, “A²”, “C²” são termos significativos do modelo. Os termos sem significância foram removidos do modelo para melhor adequação.

A falta de ajuste não demonstrou ser significativo à adequabilidade do modelo. A precisão, parâmetro que mede a relação sinal-ruído, apresentou valor superior a 4 sendo desejável. Por fim, considerando a precisão obtida de 13,477, que indica um

sinal adequado, e todos os parâmetros supracitados, o modelo se torna elegível para análise da variável estudada e construção do *Design Space* (DS).

Após avaliação da adequabilidade do modelo, foi realizada a análise das variáveis independentes significativas à variável DH. Para auxiliar na análise, foram construídos dois gráficos considerando como variáveis fixas “A: COL:MM” e “B: LS:OR”, com alteração de -1 (**Figura 9a**) e +1 (**Figura 9b**) da variável significativa “C: TW20:FL”.

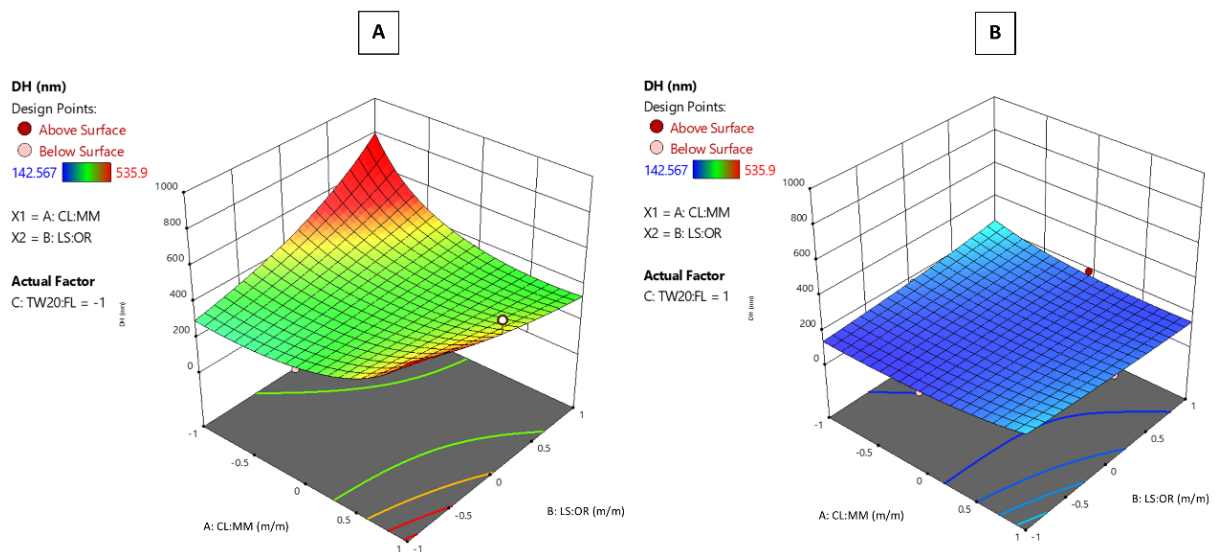


Figura 9. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável DH, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.

Com análise dos gráficos de superfície, observa-se que o aumento das concentrações de tensoativo proporcionou redução proporcional de DH. Na **Figura 9a**, onde temos a menor concentração de TW20 (nível -1), observa-se obtenção de partículas de até 800 nm, enquanto com a maior concentração (nível +1) observa-se homogeneidade inferior da variação de DH mesmo sob alteração das outras variáveis. A obtenção destes resultados corroboram com um comportamento amplamente descrito na literatura, em que o aumento da concentração do tensoativo promove redução do DH, visto que o componente em questão é capaz de reduzir a tensão superficial entre as fases imiscíveis (WAGHULE et al., 2019).

Posteriormente, foi feita análise da variável PDI, a qual está relacionada ao CQA de distribuição de tamanho de partícula. O sumário estatístico do modelo aplicado à variável encontra-se descrito na **Tabela 7**.

Tabela 7. Sumário estatístico após análise com BB da variável “PDI”.

Fonte	F-valor	p-valor
Modelo	97,10	<0,0001
A-COL:MM	25,42	0,0040
B-LS:OR	264,29	<0,0001
C-TW20:FL	265,66	<0,0001
AB	144,23	<0,0001
AC	10,16	0,0243
BC	93,61	0,0002
A ²	43,34	0,0012
B ²	13,91	0,0136
C ²	10,35	0,0236
Falta de ajuste	8,45	0,1076
R ²	0,9943	
R ² ajustado	0,9841	
R ² previsto	0,9147	
Precisão Adeq	37,7878	

Onde, “COL:MM” – proporção entre colesterol e miristrato de miristila; “LS:OR” – proporção entre lipídios sólidos totais e óleo de rícino; “TW20:FL” proporção entre Tween 20 e fase lipídica total.

O valor *F* do modelo de 97,10 implica que o modelo é significativo e há apenas 0,01% de chance de que o modelo possa impactado pelo ruído. Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C² são termos significativos do modelo.

A falta de ajuste não demonstrou ser significativo à adequabilidade do modelo. A precisão, parâmetro que mede a relação sinal-ruído, apresentou valor superior a 4 sendo desejável. Por fim, considerando a precisão obtida de 37,788 que indica um sinal adequado, e todos os parâmetros supracitados, o modelo se torna elegível para análise da variável estudada e construção do *Design Space* (DS).

Após avaliação da adequabilidade do modelo, foi realizada análise das variáveis independentes significativas à variável PDI. Para auxiliar na análise, foram construídos dois gráficos considerando como variáveis fixas “A: CL:MM” e “B: LS:OR”, com alteração de -1 (**Figura 10a**) e +1 (**Figura 10b**) da variável “C: TW20:FL”.

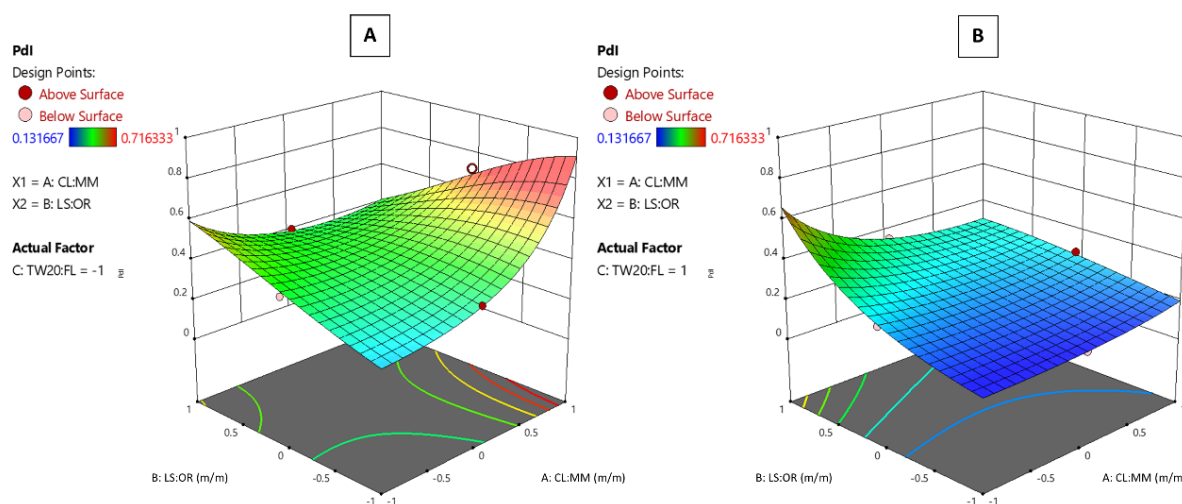


Figura 10. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável PDI, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.

Observa-se que as variáveis “B: LS:OR” e “C: TW20:FL” impactaram significativamente e de maneira antagônica, onde o aumento da concentração de óleo de rícino aumenta a polidispersão do nanossistema e o aumento da concentração de tensoativo reduz (**Figura 10**). Estima-se que este comportamento decorre de dois fatores, da miscibilidade entre os componentes lipídicos e dos eventos cristalinos decorrentes desta interação, o que corrobora com o estudo anterior. Desta forma, o

aumento de PDI proporcional à concentração de óleo de rícino sugere uma possível saturação do óleo utilizado na matriz lipídica, levando a formação nanoestruturas de tamanhos e até mesmo de tipos diferentes (SUHALIM et al., 2012).

A análise da variável EE% CUR, a qual está relacionada ao CQA de eficiência de encapsulação de curcumina, foi também avaliada. O sumário estatístico do modelo aplicado à variável encontra-se descrito na **Tabela 8**.

Tabela 8. Sumário estatístico após análise com BB da variável “EE% CUR”.

Fonte	F-valor	p-valor
Modelo	9,35	0,0023
A-COL:MM	6,08	0,0314
C-TW20:FL	18,55	0,0012
C ²	3,42	0,0916
Falta de ajuste	8,37	0,1112
R ²	0,7267	
R ² ajustado	0,6522	
R ² previsto	0,4242	
Precisão Adeq	9,3027	

Onde, “COL:MM” – proporção entre colesterol e miristrato de miristila; “TW20:FL” proporção entre Tween 20 e fase lipídica total.

O valor *F* do modelo de 9,35 implica que o modelo é significativo para qual há apenas 0,23% de chance de ser impactado pelo ruído. Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos e, neste caso, apenas “A: COL:MM” e “C: TW20:FL” são termos significativos. A falta de ajuste não demonstrou ser significativo à adequabilidade do modelo. A precisão, parâmetro que mede a relação sinal-ruído, apresentou valor superior a 4 sendo desejável. Por fim, considerando a precisão obtida de 9,3027, que indica um sinal adequado, e todos os

parâmetros supracitados, o modelo se torna elegível para análise da variável estudada e construção do *Design Space* (DS).

Após avaliação da adequabilidade do modelo, foi realizada análise das variáveis independentes significativas à variável EE% CUR. Para auxiliar na análise, foram construídos dois gráficos considerando como variáveis fixas “A: COL:MM” e “B: LS:OR”, com alteração de -1 (**Figura 11a**) e +1 (**Figura 11b**) da variável “C: TW20:FL”.

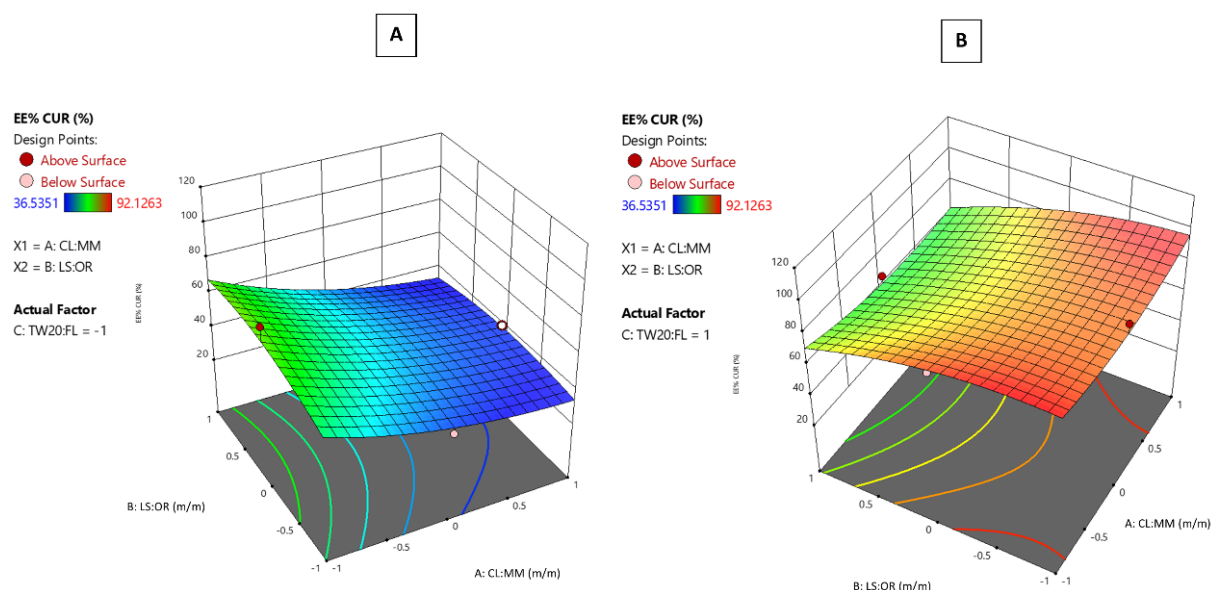


Figura 11. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável EE% CUR, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.

Com auxílio dos gráficos de superfície e avaliação de adequabilidade do modelo, observa-se que “A: COL:MM” e “C: TW20:FL” exerceram impacto significativo, onde o aumento da concentração de colesterol reduziu a eficiência de incorporação de curcumina, enquanto o aumento de Tween 20 promoveu aumento deste parâmetro.

Sugere-se que a redução da EE% CUR com o aumento da concentração de colesterol decorre do grande número de eventos cristalinos promovidos por este (SUHALIM et al., 2012), o que reduz a capacidade da nanopartícula de armazenar maiores quantidades de fármaco. O aumento da eficiência de encapsulação

proporcional a quantidade de tensoativo é amplamente descrita na literatura, cuja explicação também se resguarda na cristalinidade, onde o tensoativo também suprime o número de eventos cristalinos (HAN et al., 2008). Resultado similar foi observado por Madane & Mahajan 2016 (MADANE; MAHAJAN, 2016), no qual o aumento de Tween 80 proporcionou maior EE% de curcumina nas CLNs desenvolvidas.

Por fim, foi realizada a análise da variável EE% FL, a qual está relacionada ao CQA de eficiência de encapsulação de fluconazol. O sumário estatístico do modelo aplicado à variável encontra-se descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9. Sumário estatístico após análise com BB da variável “EE% FL”.

Fonte	F-valor	p-valor
Modelo	10,39	0,0024
A-COL:MM	4,71	0,0508
C-TW20:FL	16,08	0,0017
Falta de ajuste	2,51	0,3185
R ²	0,6340	
R ² ajustado	0,5730	
R ² previsto	0,3702	
Precisão Adeq	9,7702	

Onde, “COL:MM” – proporção entre colesterol e miristrato de miristila; “TW20:FL” proporção entre Tween 20 e fase lipídica total.

O valor F do modelo de 10,39 implica que o modelo é significativo e há apenas 0,24% de chance do resultado ser impactado pelo ruído. Valores de *p* inferiores a 0,0500 indicam que os termos do modelo são significativos e, neste caso, apenas “C: TW20:FL” foi significativo para o modelo. A falta de ajuste não demonstrou ser significativo à adequabilidade do modelo. A precisão, parâmetro que mede a relação

sinal-ruído, apresentou valor superior a 4 sendo desejável. Por fim, considerando a precisão obtida de 9,7702, que indica um sinal adequado, e todos os parâmetros supracitados, o modelo se torna elegível para análise da variável estudada e construção do *Design Space* (DS).

Após avaliação da adequabilidade do modelo, foi realizada análise das variáveis independentes significativas à variável EE% FL. Para auxiliar na análise, foram construídos dois gráficos considerando como variáveis fixas “A: CL:MM” e “B: LS:OR”, com alteração de -1 (**Figura 11a**) e +1 (**Figura 11b**) da variável “C: TW20:FL”.

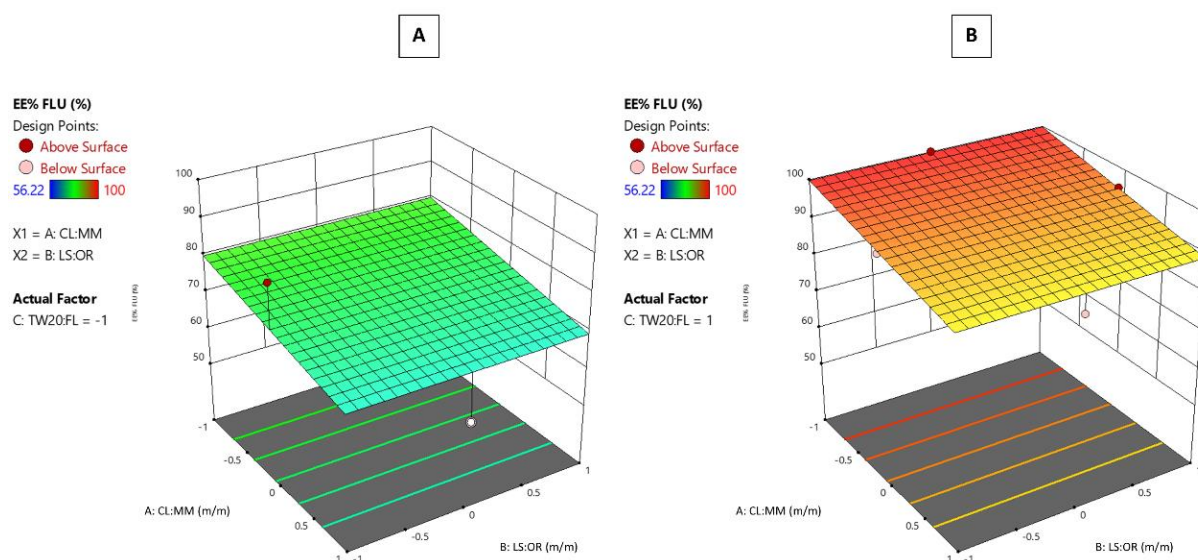


Figura 12. Gráficos de superfície obtido com a análise da variável EE% FL, com alteração de -1 (a) e +1 (b) da variável “C: TW20:FL”.

Com auxílio dos gráficos de superfície e avaliação de adequabilidade do modelo, observa-se que “C: TW20:FL” exerceu impacto significativo, onde o aumento da concentração de Tween 20 favoreceu obtenção de valores superiores de EE% FL (>70%) independentemente das outras variáveis estudadas. Demonstrando que, nesta quantidade, o fármaco apresentou altas taxas de incorporação e sugerindo alta miscibilidade do FL na matriz lipídica.

3.5. Obtenção do *design-space* e seleção do CLN

Com base no estudo das variáveis descrito no item anterior, foi determinado o *design space* (DS). O DS é um espaço de variações permitidas no qual não há risco aos CQAs e consequentemente à qualidade do produto. A construção do DS conta com a combinação multidimensional e interação de variáveis de entrada e parâmetros de processo que demonstraram fornecer garantia de qualidade (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2009). O DS é uma ferramenta utilizada para determinar até onde são permitidas variações sem impactar na qualidade do produto. Desta forma, o DS obtido para o presente estudo encontra-se representado **Figura 13**.

Factor Coding: Actual
Original Scale

Overlay Plot

DH

PdI

EE% CUR

EE% FLU

● Design Points

X1 = A: CL:MM

X2 = B: LS:OR

Actual Factor

C: TW20:FL = 1

B: LS:OR (m/m)

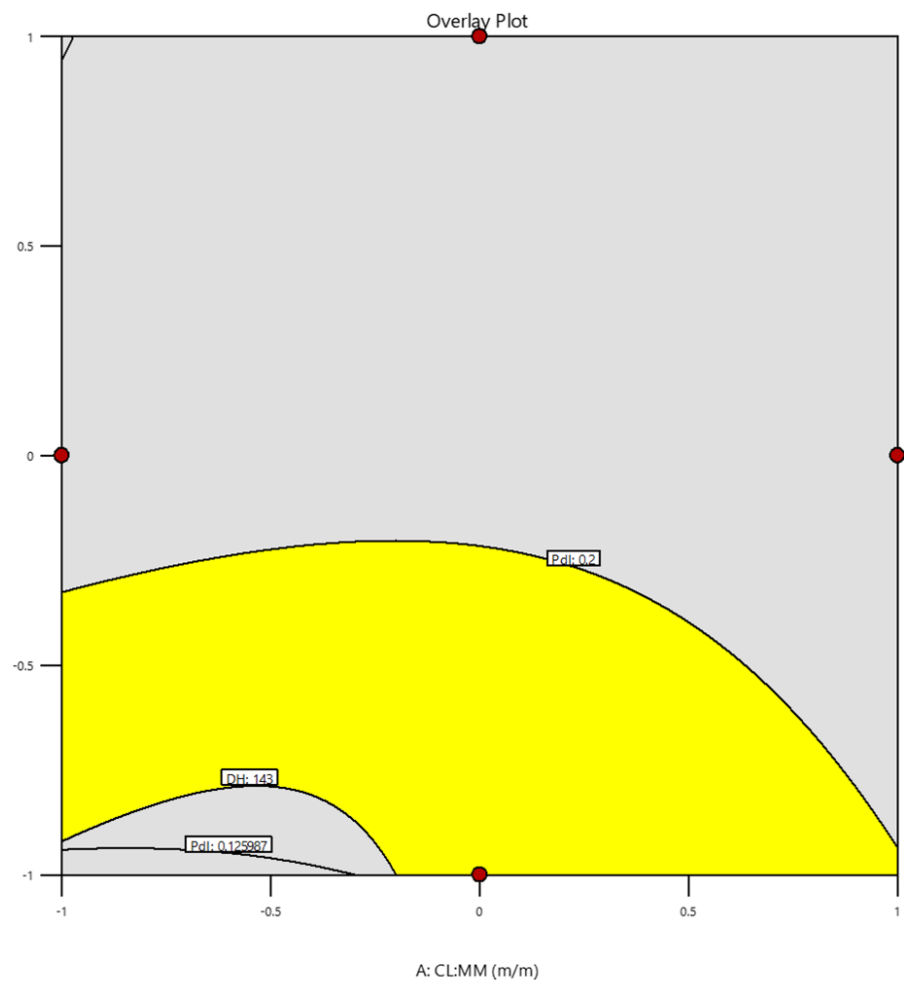


Figura 13. DS obtido com avaliação dos CQAs com auxílio do modelo BB.

Para auxiliar na construção e compreensão do DS, a variável “C: TW20:FL” foi fixada em seu maior nível (+1), visto que a mesma nesse nível promoveu manutenção das variáveis estudadas dentro da faixa pré-definida dos CQAs. O DS corresponde a faixa amarela representada pela **Figura 13**, indicando a faixa de variação permitida com base nos CQAs.

3.6. Desenvolvimento de CLN-controle e resumo de caracterização

Tendo em vista o DS obtido, uma formulação contendo as proporções de 60:40 (m/m) de COL:MM, 70:30 (m/m) de lipídeos sólidos e óleo de rícino, e 2:1 (m/m) de TW20 em relação aos lipídeos totais, foi selecionada para os testes posteriores.

Com base nas proporções selecionadas, foram desenvolvidos CLNs com fluconazol (CLNF) e curcumina (CLNC) separadamente, bem como um nanossistema sem fármaco (CLNBLANK). A **Tabela 10** sumariza os resultados de DH e PDI obtidos pela técnica de DLS, eficiência de encapsulação (EE%) e *drug-loading* (DL%), bem como o tamanho, concentração de partículas por mililitro e valor Span obtidos pela técnica de NTA.

Como pode ser observado na **Tabela 10**, as nanopartículas desenvolvidas apresentaram DH e tamanho menores que 200 nm, monodispersas tendo em vista os baixos valores de PDI e Índice Span, e alta concentração de partículas por mililitro. Observa-se também que as CLN apresentaram alta capacidade de carga de CUR e FL (>11%), separadamente e em conjunto, indicando a eficiência do sistema desenvolvido de promover o carregamento simultâneo dos fármacos em estudo. A alta eficiência de incorporação observada no estudo pode estar relacionada a composição complexa e redução de eventos cristalinos, assim como amplamente descrito na literatura para CLNs (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015), visto que EE% e DL% depende da composição lipídica e do estado cristalino da estrutura (BUNJES, 2011).

Tabela 10. Resultados obtidos após caracterização coloidal das CLN, bem como a eficiência de encapsulação e *drug-loading*.

Resultados	Amostras			
	CLNBLANK	CLNC	CLNF	CLNFC
DH (nm)	129,9 ± 0,550	161,7 ± 2,542	128,7 ± 0,513	142,56 ± 1,401
PDI	0,099 ± 0,040	0,161 ± 0,014	0,106 ± 0,005	0,131 ± 0,004
EE%	-	83,252 ± 0,021	91,572 ± 0,902	CUR: 92,126 ± 0,156 FL: 93,892 ± 0,026
DL%	-	11,100 ± 0,003	12,124 ± 0,120	CUR:12,283 ± 0,021 FL:12,518 ± 0,003
Tamanho (nm)	106,1 ± 0,8	137,0 ± 2,8	110,9 ± 0,8	145,8 ± 5,2
Partículas/mL	7,84 × 10 ⁸	3,31 × 10 ⁸	7,89 × 10 ⁸	2,72 × 10 ⁸
Valor Span	0,656	0,549	0,682	0,508

Onde: Diâmetro hidrodinâmico (DH), Índice de polidispersão (PDI), Eficiência de encapsulação (EE%) e *Drug-loading* (DL%).

3.7. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Os resultados obtidos a partir da análise do colesterol, curcumina, fluconazol, bem como dos nanossistemas desenvolvidos podem ser observados na **Tabela 11** e das curvas de DSC na **Figura 6**.

Tabela 11. Resultados obtidos com análise de DSC do colesterol, dos fármacos e das CLNs.

Analito	Ponto de Fusão (°C)	ΔH (Jg ⁻¹)	I.R. (%)
Colesterol	147,76	68,31	-
Curcumina	183,91	136,6	-
Fluconazol	137,47	115,7	-
CLN _{BLANK}	103,77	1804	10,56
CLNC	105,34	1356	7,94
CLNF	83,50	1081	6,33
CLNFC	93,23	1455	8,52

Onde: CLN sem fármaco (CLN_{BLANK}), CLN com fluconazol (CLNF), CLN com curcumina (CLNC), CLN com fluconazol e curcumina (CLNFC).

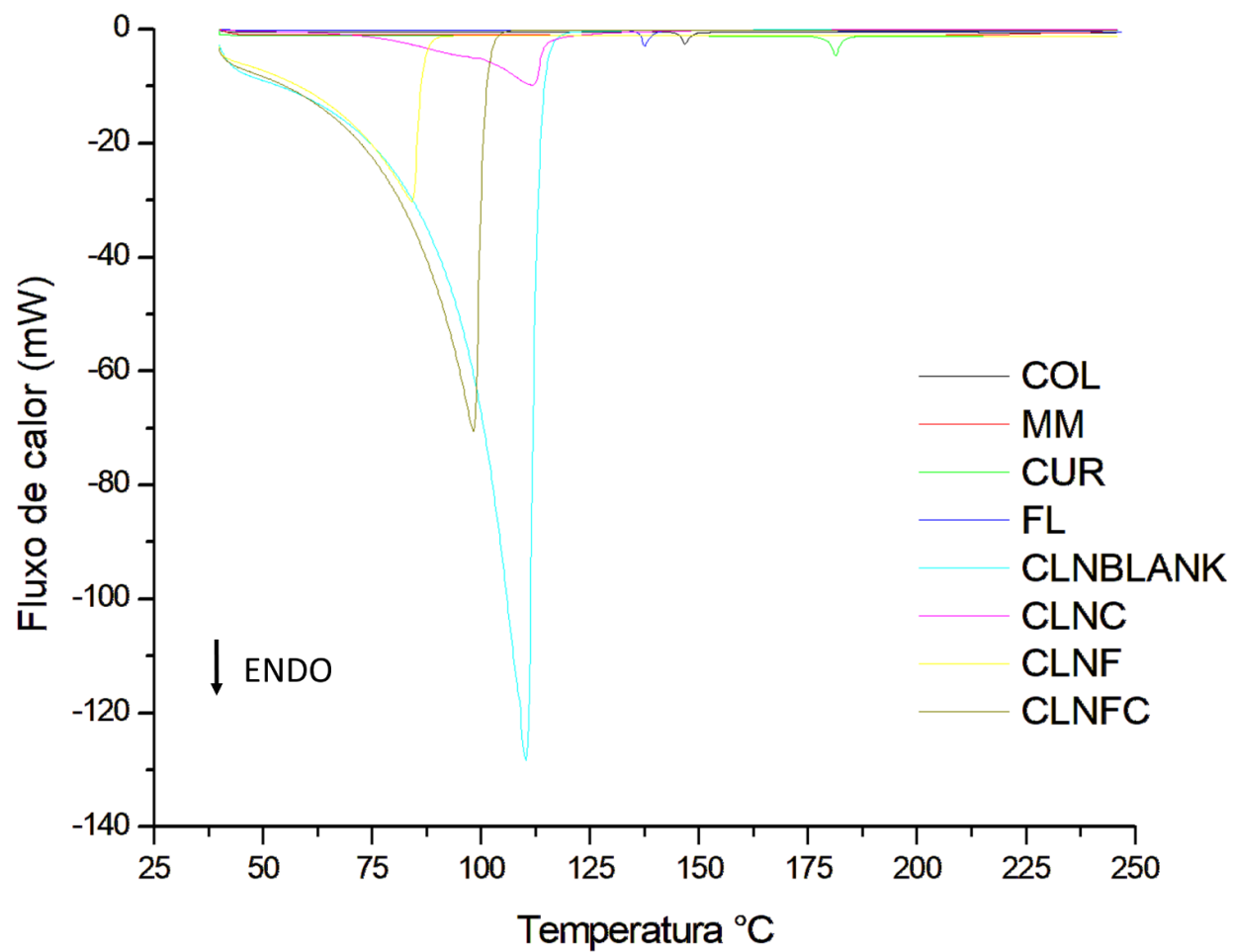


Figura 14. Termogramas obtidos após análise de DSC das amostras: colesterol (COL), miristrato de miristila (MM), curcumina (CUR), fluconazol (FL), CLNBLANK, CLNC, CLNF, e CLNFC.

Ao comparar os resultados apresentados pela análise de colesterol (*bulk*) com as CLNs, observa-se que as nanoestruturas apresentam ponto de fusão menor, o que indica supressão dos efeitos cristalinos do colesterol e formação de estruturas mais amorfas. Este resultado corrobora com os IR calculados com base no comportamento térmico, os quais demonstraram cristalinidade inferior a 11%, perfil esperado e amplamente descrito na literatura para este tipo de sistema (ARAUJO et al., 2020b, 2020c; BELOQUI et al., 2016).

Segundo Siekmann e Westesen, 1994 essa redução de ponto de fusão pode ser explicado por alguns fatores. O material em *bulk*, no caso o COL, está em sua conformação de menor estado de energia (β) e presença de tensoativos altera a conformação cristalina. Essa variação de temperatura também pode estar relacionada ao tamanho nanométrico, visto que nesse cenário, devido à alta área superficial onde moléculas do LS estão mais expostas e em estado de energia maior do que no *bulk* (SIEKMANN; WESTESEN, 1994; WESTESEN; SIEKMANN; KOCH, 1993).

Nas curvas obtidas pela análise das nanopartículas com os fármacos, observa-se ausência dos pontos de fusão característicos dos IFAs. Este comportamento indica que a CUR e o FL estão molecularmente dispersos nas nanoestruturas (ARAUJO et al., 2020b; CHEN et al., 2006; CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006). Observa-se ainda que o FL promoveu redução significativa do ponto de fusão e da cristalinidade do nanossistema em comparação a CLNBLANK, o que por sua vez possa ter contribuído para o aumento da EE% de CUR pela CLNFC (92.126%) comparado a CLNC (83.252%).

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia de transmissão (MET) foi empregada no presente trabalho com o intuito de avaliar o tamanho e morfologia das nanoestruturas desenvolvidas. As imagens obtidas pela técnica estão presentes na **Figura 15**.

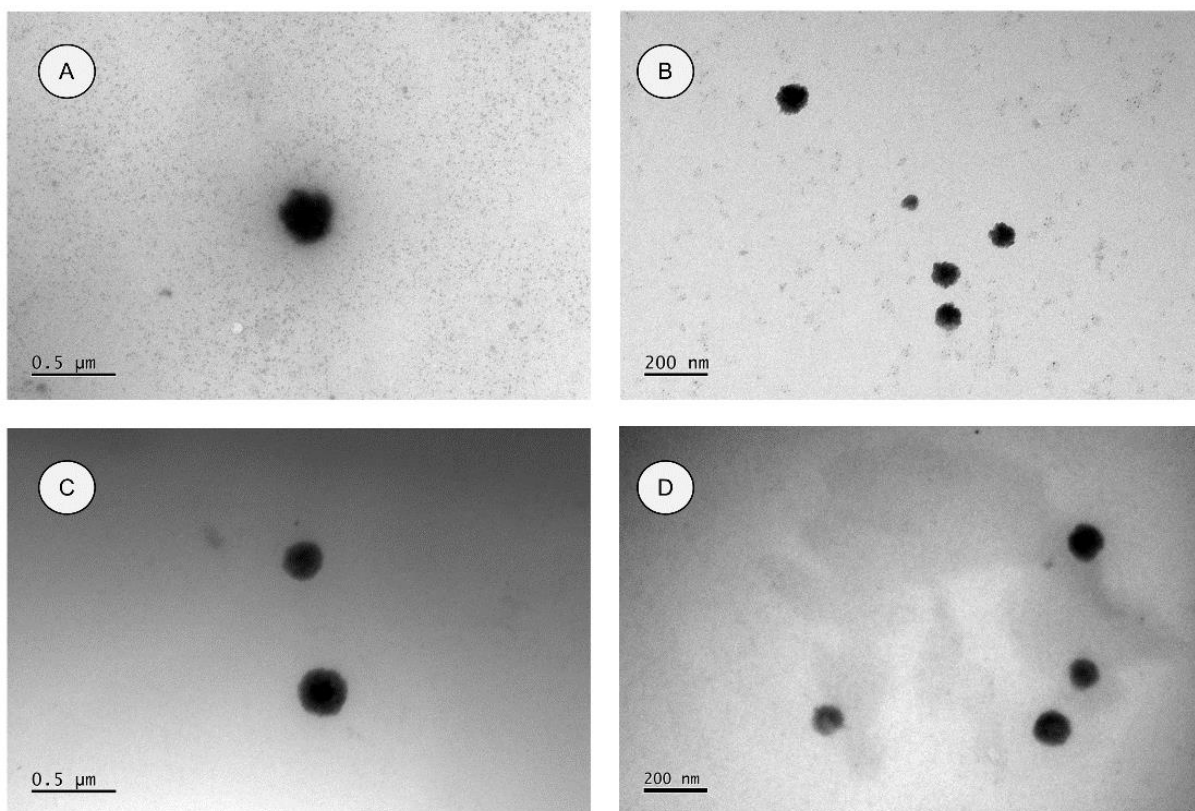


Figura 15. Micrografias obtidas por MET das amostras CLNBLANK (A), CLNF (B), CLNC (C), e CLNFC (D).

Como pode ser observado na **Figura 15**, nota-se que as CLN desenvolvidas apresentaram morfologia esférica, e ausência de formas cúbicas ou de bastões correspondentes à conformação polimórfica β , sugerindo que as estruturas formadas estão em conformação α e consequentemente mais amorfas (BUNJES, 2011).

Em relação as medidas, CLNBLANK apresentou tamanho médio de 81 nm, CLNF de 64 nm, CLNC de 140 nm, e CLNFC de 86 nm. Os tamanhos obtidos pela técnica de MET apresentaram proporções menores comparado aos resultados obtidos pela técnica de DLS. Tal comportamento já era esperado e amplamente descrito na

literatura, visto que o preparo de amostra para a MET torna necessária a secagem da amostra, enquanto a técnica de DLS avalia a nanoestrutura em suspensão e considera a camada de solvatação em seus resultados (ARAUJO et al., 2020b; HAN et al., 2008).

Desta forma, os resultados de MET corroboram com as caracterizações anteriores, as quais apontavam a formação de nanoestruturas, monodispersas e com característica amorfa.

3.9. Liberação de curcumina e fluconazol in vitro

Conforme previamente apontado, a liberação dos IFAs foi classificada como CQA para qual o parâmetro almejado seria a liberação prolongada, tendo em vista as características do produto em desenvolvimento a fim de explorar os benefícios atrelados ao uso de CLNs como sistema de entrega de fármacos. Desta forma, a liberação foi avaliada em um período de 24h, os resultados podem ser observados na **Figura 16.**

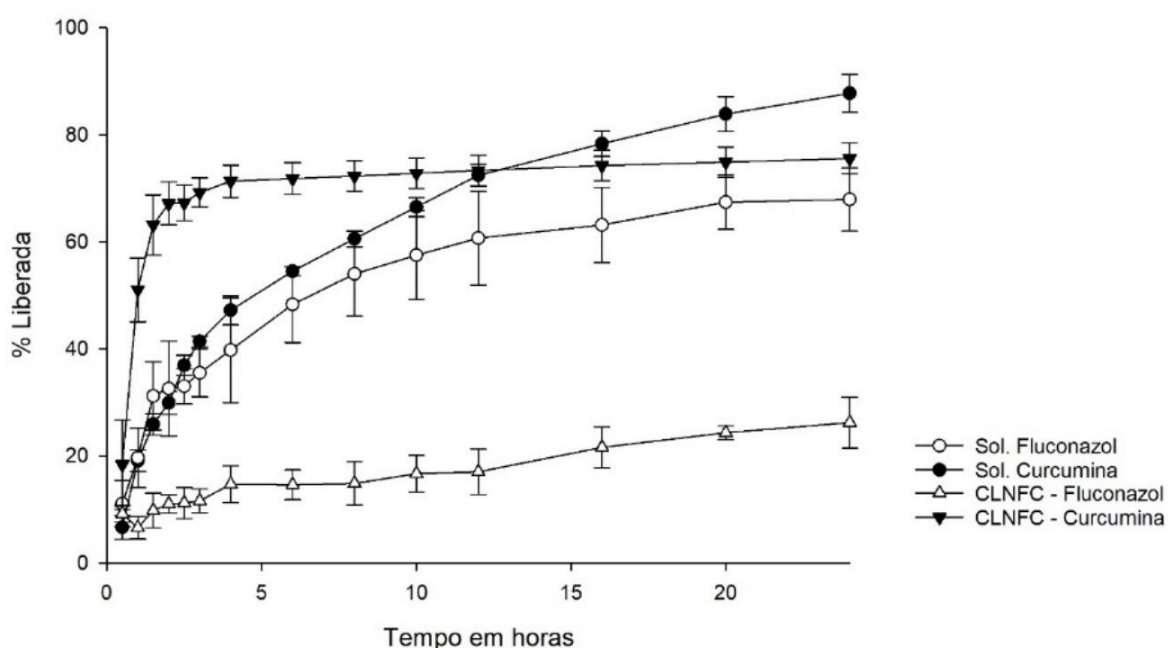


Figura 16. Perfil de liberação comparativo dos fármacos em solução e em CLN.

Foi realizada a análise da liberação dos IFAs em suspensão (Sol. Fluconazol e Sol. Curcumina) e dos IFAs dispersos na nanoestrutura (CLNFC) **Figura 17**. Como pode ser observado, os IFAs em suspensão demonstraram maior porcentagem de liberação final em comparação ao perfil de liberação promovido por CLNFC.

Por outro lado, analisando o perfil como um todo, observa-se um controle na liberação dos IFAs em suspensão. Sugere-se que este comportamento tenha ocorrido em virtude da baixa solubilidade da CUR em suspensão. A CUR tem um comportamento de agregação em meios nos quais a mesma possui baixa solubilidade (BHATIA et al., 2016), o que impossibilita a difusão dos IFAs através da membrana. Esse comportamento é evidenciado ao estabelecer um comparativo entre os perfis de Sol. Curcumina e CUR em CLNFC, no qual é possível observar maior liberação de CUR pela CLNFC nos primeiros momentos. Sugere-se que esse comparativo exemplifica as vantagens da utilização da nanoestrutura, no qual os IFAs estão molecularmente dispersos na estrutura o que favorece a sua difusão.

Com o objetivo de avaliar a cinética de liberação dos IFAs do CLNFC desenvolvido, modelos matemáticos foram investigados (ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Weibull e Peppas-Sahlin). O modelo mais bem ajustado foi selecionado de acordo com o coeficiente de regressão (R^2). Os resultados podem ser observados nas **Tabela 12** e **Tabela 13** para CUR e FL respectivamente.

Tabela 12. Modelos matemáticos aplicados à liberação de curcumina.

Modelo	Valor de R^2	k (mg/mL.h ⁻¹)	b	n	M
Ordem Zero	0,550	4,919	-	-	-
Primeira Ordem	0,720	0,132	-	-	-
Higuchi	0,724	21,970	-	-	-
Hixson-Crowell	0,681	0,036	-	-	-
Weibull	0,921	-	0,348	-	-
Korsmeyer-Peppas	0,857	40,806	-	0,259	-
Peppas-Sahlin	0,935	$k_1 = 52,676$ $k_2 = - 8,782$	-	-	0,450

Tabela 13. Modelos matemáticos aplicados à liberação de fluconazol.

Modelo	Valor de R^2	k (mg/mL.h ⁻¹)	b	n	M
Ordem Zero	0,881	1,368	-	-	-
Primeira Ordem	0,890	0,015	-	-	-
Higuchi	0,929	5,622	-	-	-
Hixson-Crowell	0,887	0,005	-	-	-
Weibull	0,931	-	0,307	-	-
Korsmeyer-Peppas	0,937	8,537	-	0,316	-
Peppas-Sahlin	0,951	$k_1 = 7,789$ $k_2 = - 0,450$	-	-	0,450

Conforme avaliado, o modelo de Peppas-Sahlin é o que melhor descreve o perfil de liberação obtido com ambos os IFAs. O modelo de Peppas-Sahlin descreve a cinética de liberação influenciada por dois efeitos, difusão Fickiana ou Caso 1 (ocorre pela difusão molecular usual do fármaco devido a um gradiente de concentração entre

os sistemas) e transporte caso II (ocorre devido a transição de estado da estrutura, incluindo o desemaranhamento e erosão) (RATHBONE; HADGRAFT; BRUSCHI, 2015; SINGHVI; SINGH, 2011). A constante k_1 indica a contribuição por difusão e k_2 está associado à erosão. Caso a razão de k_1/k_2 for > 1 a liberação é determinada por difusão, caso a razão for < 1 a liberação impactada principalmente por erosão (MEHRAN; MASOUM; MEMARZADEH, 2020; REZAEI et al., 2016; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018).

Desta forma, considerando que a razão das constantes calculadas foi > 1 para ambos os IFAs, sugere-se que a liberação foi principalmente controlada por difusão, um comportamento amplamente observado na literatura para este tipo de nanopartícula. Um resultado similar obtido pelo estudo de Zhao e colaboradores, ao avaliarem o perfil de liberação de CUR e doxorrubicina de nanopartículas lipídicas (ZHAO et al., 2014). Mendes e colaboradores observaram o mesmo comportamento de liberação de miconazol em CLN (MENDES et al., 2013).

4. Resumo de resultados – CLN: Desenvolvimento e caracterização

Tendo em vista os resultados obtidos no **CAPÍTULO 2** nota-se que foi possível obter um desenvolvimento de CLN com processo robusto, com atributos críticos de qualidade preservados, conforme descrito na **Tabela 14**, e determinação de uma área ótima de desenvolvimento (DS) a fim de assegurar a qualidade do produto mesmo sob pequenas variações.

Tabela 14. Atributos Críticos de Qualidade versus CLN obtida no final do estudo de desenvolvimento.

Atributos Crítico de qualidade	Alvo	Obtido
Tamanho de partícula	Tamanho de partícula em torno de 100 a 200 nm	142,56 ± 1,401
Distribuição do tamanho de partícula	PDI < 0,2	0,131 ± 0,004
Taxa de liberação	Prolongada	Prolongada CUR: 92,126 ± 0,156
Eficiência de encapsulação	90% a 110%	FL: 93,892 ± 0,026

Desta forma, considerando todos os resultados obtidos com a abordagem QbD adotada, uma amostra de CLNFC foi considerada para dar continuidade aos demais estudos no trabalho.

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento e caracterização dos hidrogéis termorresponsivos

1. INTRODUÇÃO

O presente capítulo destina-se ao desenvolvimento e caracterização dos hidrogéis termorresponsivos contendo as nanoestruturas obtidas e avaliadas no **Capítulo 2**.

A definição de géis possui atualmente uma complexidade na qual envolve suas características moleculares e macroscópicas. De acordo com Hermans (HERMANS, 1949), géis são sistemas dispersos, coerentes e compostos por pelo menos dois componentes que demonstram propriedades mecânicas de estado sólido. Por sua vez, hidrogel pode ser definido como sistema constituído por dois ou mais componentes, com rede polimérica tridimensional dispersa em um líquido, formando interstícios (ARAUJO et al., 2021).

Os hidrogéis termorresponsivos demonstram ser uma alternativa interessante para tratamentos tópicos, incluindo aplicações intravaginais, tendo em vista a sua fácil aplicação, bem como a capacidade de aumentar a viscosidade sob estímulo de temperatura, que por sua vez, impossibilita seu escoamento do sistema.

Contudo, as propriedades físicas de um hidrogel são variáveis de acordo com a composição e a proporção de seus constituintes e ainda, a composição do hidrogel destinado à aplicação intravaginal deve possuir compatibilidade com o ambiente alvo (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013). Desta forma, o presente capítulo contempla o desenvolvimento e caracterização de hidrogéis termorresponsivos com intuito de otimizar a aplicação intravaginal das CLN previamente desenvolvidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenvolvimento dos hidrogéis

Os hidrogéis termorresponsivos foram desenvolvidos com base no estudo de Gratiere e colaboradores (GRATIERI et al., 2010), com modificações. Duas

proporções de Pluronic® F-127 (PL) foram avaliadas, 16% e 20% m/m, com porcentagem fixa de quitosana (1% m/m) e ácido acético (1% m/v), q.s.p 100% m/m com CLN. As nanossuspensões preparadas (CLNs) foram utilizadas como fase aquosa para o preparo do hidrogel. Inicialmente, foi adicionada a quantidade requerida de ácido acético e quitosana na nanossuspensão, em seguida realizada a agitação magnética vigorosa por 3 horas. Após a dispersão da quitosana, a suspensão obtida foi mantida em banho de gelo para adição gradual do PL sob agitação magnética até completa dispersão. As amostras foram armazenadas à $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por um período de 24h antes de ser realizada qualquer análise física.

2.2. Teste de inversão de tubo

A princípio, a transição sol-gel dos hidrogéis desenvolvidos foi realizado através do teste de inversão de tubo. As soluções previamente preparadas foram colocadas em frascos à temperatura ambiente. e 37°C (condição fisiológica) e a fluidez/viscosidade dos hidrogéis foi avaliada visualmente através da inversão do frasco (MORELLO et al., 2021).

2.3. Perfil de análise de textura (TPA)

Para a análise de TPA, foram pesados 7g de cada amostra em tubos de plásticos, posteriormente foi realizada centrifugação (3600 rpm por 20 minutos) para retirada de ar e nivelamento de superfície, e em seguida armazenados a uma temperatura de $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos para simular a condição fisiológica. O estudo foi realizado com auxílio do equipamento TA-TX plus e análise pelo software Texture Exponent Lite para obtenção dos parâmetros de dureza, adesão e coesão. Para este teste, as amostras ($n = 5$) foram submetidas a dois ciclos de compressão com auxílio de uma sonda analítica (10 mm), penetrando a amostra à uma profundidade de 5 mm, com velocidade de 0,5 mm/s. Para avaliação dos resultados, foi realizada o teste estatístico

one-way ANOVA e pós-teste Tukey, considerando o nível de significância de 5%, e utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

2.4. Avaliação da força mucoadesiva por disco de mucina

A força mucoadesiva foi obtida por meio da quantificação da força necessária para a remoção do disco de mucina após o contato com a amostra. A análise foi realizada utilizando o equipamento TA-TX plus e análise pelo software Texture Exponent Lite, para obtenção dos parâmetros de força (N) e trabalho (N.s) de mucoadesão.

Os discos de mucina foram preparados por meio da compressão de Mucina tipo II de estômago suíno (Sigma-Aldrich), com peso médio de 250mg. Após a sua formação, os discos foram aderidos na sonda analítica utilizando fita adesiva e umedecidos com 10µL de tampão fosfato (pH 4,5) por 60s, considerando o pH vaginal (LINHARES et al., 2011). As amostras foram previamente armazenadas (n = 5) a uma temperatura de 37±1°C por 20 minutos, a fim de simular a temperatura fisiológica. O contato do disco com a superfície da amostra (10 mm) foi aplicado pela sonda com força de 0,5 N por 60s, e posteriormente elevada a uma velocidade constante de 1,0 mm/s. Para avaliação dos resultados, foi realizado o teste estatístico one-way ANOVA e pós-teste Tukey, considerando o nível de significância de 5%, e utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A obtenção das imagens de MEV dos hidrogéis desenvolvidos foi realizada com base no método descrito por Ruel-Gariépy et al.,(2000), com modificações. Amostras de 1 mL foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL, aquecidas a 37°C em banho-maria (marca QUIMIS) por 15 min. Posteriormente foi congelado em nitrogênio líquido por 10 minutos e levado ao liofilizador (de marca LIOTOP modelo L101) por 48 horas.

Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro por 60 segundos, utilizando o metalizador marca LEICA modelo EM SCD 500. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM-7001F.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.Desenvolvimento dos hidrogéis e avaliação do perfil de análise de textura (TPA)

No primeiro momento foram desenvolvidos dois hidrogéis contendo CLNFC como fase aquosa, um com 16% m/m de PL e o outro com 20% m/m. A fim de avaliar a responsividade das amostras geradas à estímulo térmico, e como teste de triagem, as amostras foram depositadas em tubo plástico e mantidas em banho-maria com temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, em seguida foi feita a inversão do tubo.

O teste previamente mencionado permitiu avaliar a transição sol-gel analisando visualmente a fluidez/viscosidade dos hidrogéis através da inversão do tubo, tanto à temperatura ambiente como à 37°C .

As amostras contendo 16% m/m de PL demonstraram alta fluidez visual no teste de inversão de tubo, o que destoa do estudo Gratieri e colaboradores no qual hidrogéis desenvolvidos com essa concentração de PL apresentaram ganho de viscosidade significativo após estímulo térmico (GRATIERI et al., 2010). Contudo, sugere-se que este comportamento diferenciado ocorra pela alta concentração de nanopartículas lipídicas encontradas na nanossuspensão utilizada como fase aquosa.

Por outro lado, a amostra contendo 20% m/m de PL apresentou ganho de viscosidade significativo e baixa fluidez após estímulo térmico, o aumento da viscosidade proporcional ao aumento da concentração de polímero é amplamente

descrito na literatura (MORELLO et al., 2021). Desta forma, a amostra contendo 20% m/m de PL foi selecionada para realização dos demais testes.

3.2. Perfil de análise de textura (TPA)

Após seleção do hidrogel, as propriedades mecânicas das amostras foram avaliadas em temperatura ambiente e após estímulo térmico de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As propriedades estudadas foram a dureza (força necessária para promover deformação na amostra), adesão (trabalho necessário para romper a força atrativa entre a sonda e a amostra), e coesão (indica como as moléculas do material em análise estão organizadas entre si).

Em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) os hidrogéis desenvolvidos apresentaram alta fluidez o que por sua vez impossibilitou a quantificação das propriedades em estudo. Desta forma, as análises foram conduzidas somente após estímulo térmico de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após o estímulo térmico, as amostras demonstraram valores de dureza e adesão distintos entre si ($p < 0,05$), sendo os maiores valores observados na amostra H-CLNC, e menores na amostra H-CLNF, **Figura 17A**. A dureza é um parâmetro que indica a resistência da amostra à força de compressão, bem como a rigidez da mesma. Diferentes estudos indicam o aumento da dureza de hidrogéis na presença de NLS, corroborando com os valores obtidos no presente estudo (AMASYA; INAL; SENGEL-TURK, 2020; NUR et al., 2020). Adicionalmente, é observado que H-CLNC apresentou maior rigidez após o estímulo térmico em relação às demais amostras. Sugere-se que tal característica decorre do maior tamanho de nanopartícula ($161.7 \pm 2.5 \text{ nm}$) em comparação às outras produzidas, o que pode resultar na expansão da rede polimérica com formação de sistemas mais rígidos devido à maior ocupação dos espaços vazios entre as cadeias de polímero.

A coesão é um parâmetro relacionado às propriedades estruturais da amostra em resposta à tensão empregada. Os valores obtidos no presente estudo (0,89 – 0,94), **Figura 17C**, se assemelham aos encontrados no estudo de Amasya e colaboradores (AMASYA; INAL; SENDEL-TURK, 2020), em que realizou-se o desenvolvimento de hidrogéis de carbopol para incorporação de NLS. No estudo de Oktay e colaboradores (NUR et al., 2020) foram observados valores altos de coesão como os observados para as amostras desenvolvidas no presente trabalho, indicando a manutenção da forma do gel durante a aplicação de tensão, o que permite sua integridade e residência no local de aplicação.

A adesão é um parâmetro que indica o trabalho requerido para superar a força atrativa entre a superfície da amostra e a sonda, estando relacionada a mucoadesão. Os valores obtidos de adesão (**Figura 17B**) foram maiores que os observados pelos hidrogéis de Amasya e colaboradores (AMASYA; INAL; SENDEL-TURK, 2020) e Oktay e colaboradores (NUR et al., 2020), nos quais foram desenvolvidos géis de HPMC e Carbopol. Por outro lado, os resultados corroboram com os resultados de Gratieri e colaboradores (GRATIERI et al., 2010), no qual foi utilizada porcentagem semelhante de quitosana. Desta forma, sugere-se que este resultado decorre da presença de quitosana, a qual confere propriedades adesivas ao hidrogel desenvolvido.

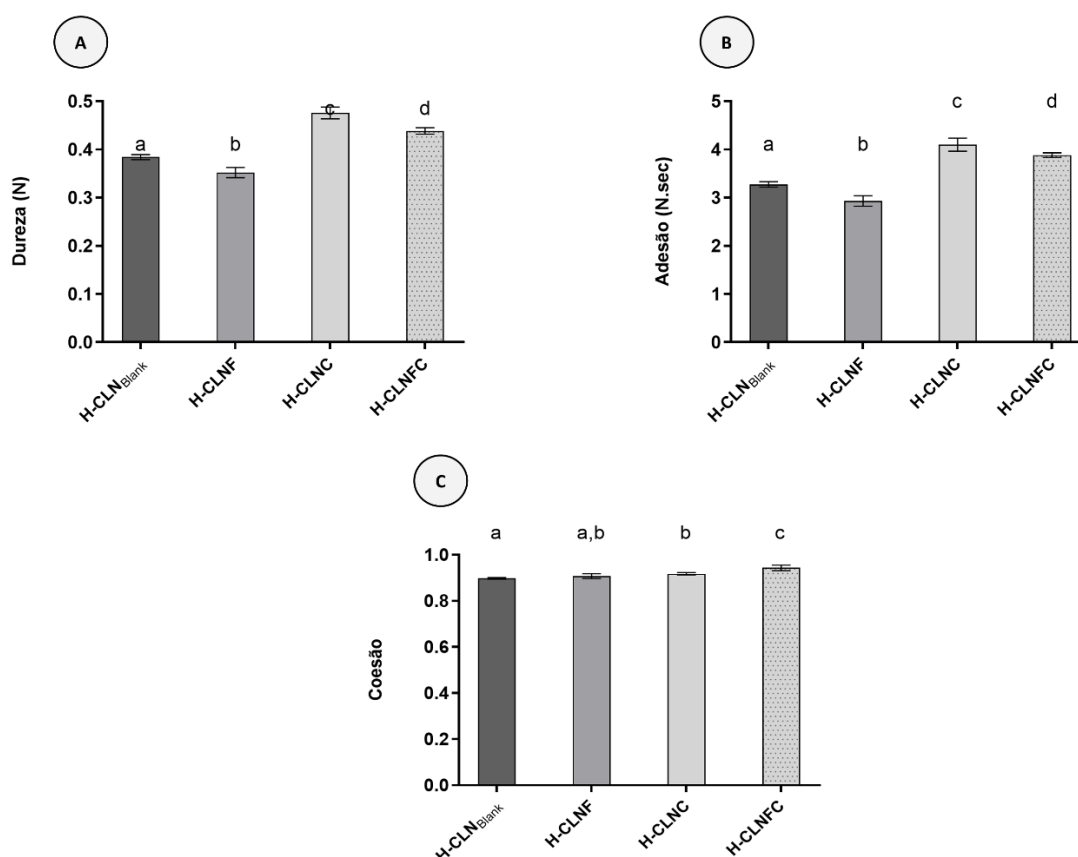


Figura 17. Propriedades mecânicas, Dureza (A), Adesão (B) e Coesão (C), dos hidrogéis formados (H-CLNBLANK, H-CLNC, H-CLNF, e H-CLNFC).

3.3. Avaliação da força mucoadesiva com disco de mucina

Hidrogéis mucoadesivos demonstram ser uma alternativa promissora para o tratamento local de doenças infecciosas vaginais, prolongando o tempo de residência do fármaco no local de ação (ARAUJO et al., 2020a; CORREA et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2020). A quitosana é um biopolímero vastamente empregado para conferir propriedades mucoadesivas a hidrogéis. Esta propriedade decorre da força de atração entre quitosana e mucina resultante de ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e forças coulômbicas provenientes da carga positiva da quitosana e negativa da mucina (ARAUJO et al., 2021). Considerando estes aspectos, a quitosana foi utilizada para compor os hidrogéis a fim de otimizar a mucoadesão.

A força mucoadesiva e o trabalho de mucoadesão foram avaliados utilizando discos de mucina. A força mucoadesiva indica a força necessária para destacar o disco de mucina da amostra após o contato, enquanto o trabalho de adesão considera a força de desprendimento versus o perfil de deslocamento (POPESKI-DIMOVSKI, 2015; ROSSI et al., 2014).

Como pode ser observado na **Figura 18**, a força mucoadesiva apresenta similaridade entre todas as amostras, corroborando com o trabalho de Gratieri e colaboradores (GRATIERI et al., 2010) no qual foi desenvolvido hidrogéis com 1% m/m de quitosana, o que indica o alto potencial mucoadesivo do sistema desenvolvido. Quanto ao trabalho de adesão, é observada diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre CLNBLANK e CLNFC. O trabalho de mucoadesão é dado pela transferência de energia que ocorre após a aplicação de uma força seguido por deslocamento. Desta forma, para amostra CLNFC a sonda despendeu-se com maior quantidade de energia para que o deslocamento ocorresse. Essa maior energia pode estar relacionada com a maior coesividade, tornando necessária um emprego maior de força para o rompimento de tais interações.

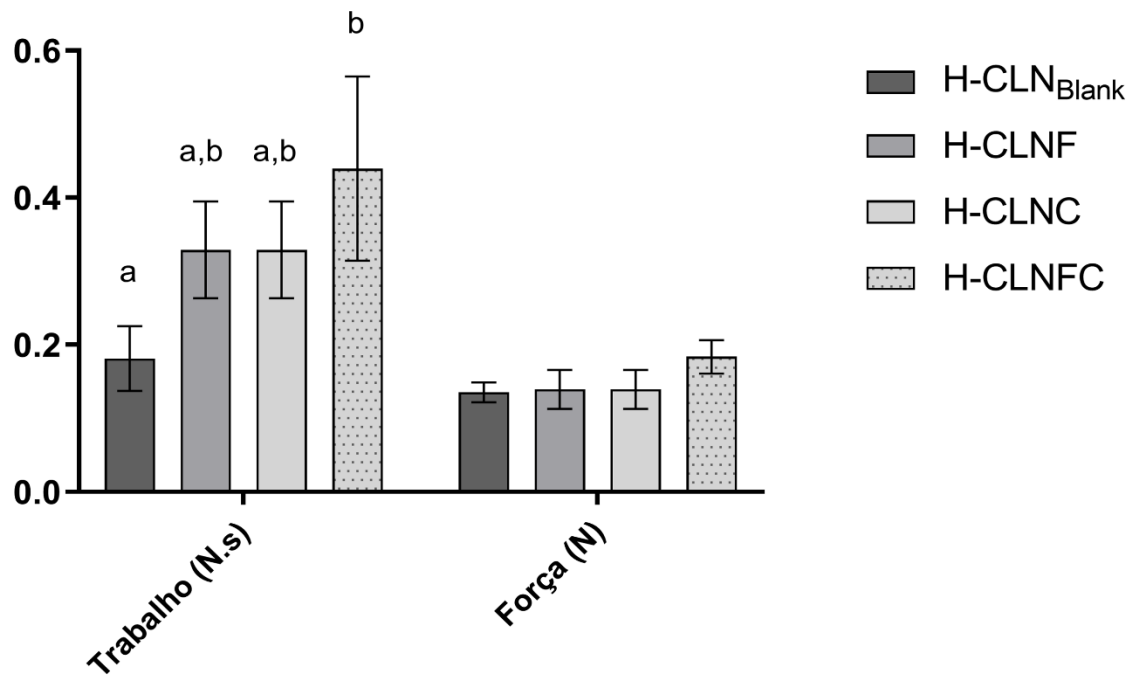


Figura 18. Força de mucoadesão e trabalho de mucoadesão avaliados com disco de mucina dos hidrogéis formados (H-CLN_{Blank}, H-CLNC, H-CLNF, e H-CLNFC).

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada com o intuito de avaliar possíveis variações estruturais entre os hidrogéis desenvolvidos. As imagens obtidas pela técnica estão contidas na **Figura 19**.

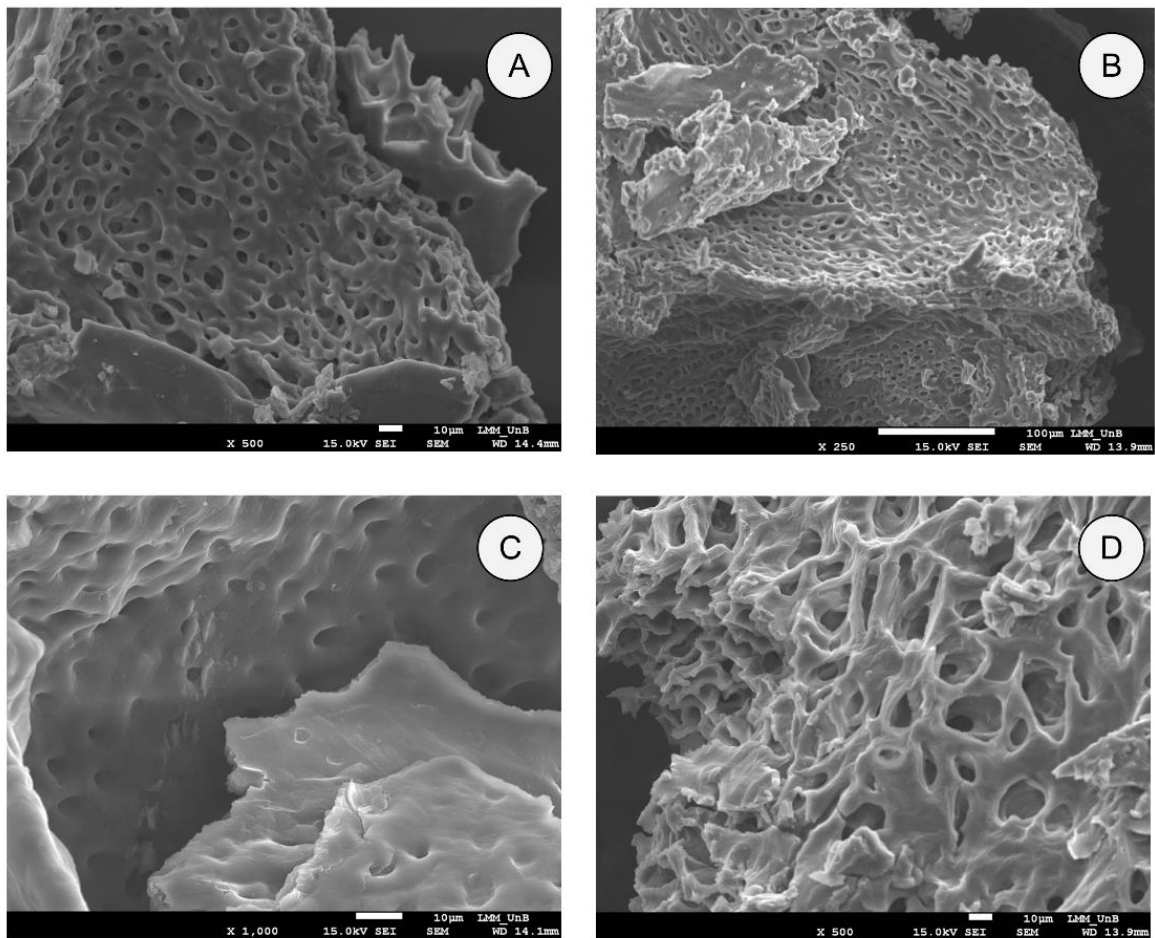


Figura 19. Micrografias obtidas por MEV das amostras H-CLNBLANK (a), H-CLNF (b), H-CLNC (c), e H-CLNFC (d).

Como observado na **Figura 19**, notam-se estruturas porosas assim como o esperado para a amostra em análise, tendo em vista a manutenção das malhas poliméricas após a secagem. Uma avaliação comparativa utilizando o software ImageJ permitiu observar que as amostras H-CLNBLANK, H-CLNF, e H-CLNFC apresentaram poros de média de $2,164 \pm 0,708 \mu\text{m}$, enquanto a amostra H-CLNC apresentou poros médios de $0,008 \pm 0,001 \mu\text{m}$. A presença de malhas poliméricas mais justapostas na mostra H-CLNC corroboram com os resultados obtidos pela análise de TPA, onde a mesma amostra demonstrou maiores valores de dureza (resistência da amostra à força de compressão).

4. Resumo de resultados – Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis

Baseado nos resultados obtidos e a discussão presente no **CAPÍTULO 3**, que consistiu no desenvolvimento e caracterização física dos hidrogéis contendo CLN, foi possível observar diferentes pontos:

- A avaliação da responsividade térmica por teste de inversão de tubo proporcionou observar viscosidade superior da amostra contendo maior concentração de PL (20% m/m) à 37°C;
- As propriedades mecânicas dos hidrogéis desenvolvidos (H-CLNBLANK, H-CLNC, H-CLNF e H-CLNFC) foram investigadas com a técnica de TPA e parâmetros como dureza, adesão e coesão foram estudados, para o quais foram obtidos valores distintos de acordo com o CLN utilizado na composição;
- Considerando as propriedades bioadesivas da quitosana, a avaliação mucoadesiva foi feita utilizando disco de mucina. Os resultados de força corroboraram com os descritos na literatura para hidrogéis similares, enquanto os valores de trabalho variaram em função da coesividade apresentada pela amostra;
- Avaliações por MEV foram feitas a fim de avaliar a microestrutura dos hidrogéis desenvolvidos. Como resultados, foi possível observar tamanho de poros semelhantes com exceção da amostra H-CLNC a qual demonstrou malha polimérica mais justaposta, corroborando com as análises físicas previamente realizadas.

Considerando os resultados apresentados ao decorrer do **CAPÍTULO 3**, a amostra H-CLNFC demonstrou-se ser promissora para as demais avaliações do trabalho.

CAPÍTULO 4

Avaliações in vitro e in vivo

1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma patologia cujos sinais e sintomas são relacionados à infecção e ao processo inflamatório decorrente da presença de *Candida* spp., e as espécies mais comuns associadas a CVV são *Candida albicans* e *Candida glabrata* (DONDEERS; SOBEL, 2017). A patogênese e o progresso da CVV são mediados por fatores de virulência os quais incluem formação de biofilme, adesão, formação de hifas, troca fenotípica e excreção de proteases (UPPULURI; EDWARDS, 2017).

Biofilmes são definidos como estruturas complexas de microrganismos e matriz extracelular formadas após a adesão a uma superfície de contato. Essas estruturas são consideradas como fatores de virulência e são capazes de conferir resistência à terapia antifúngica, tendo em vista sua complexidade de formação e mecanismo de resistência. Desta forma, se faz necessária compreensão dos biofilmes bem como o desenvolvimento de novas terapias contra esse importante fator de virulência (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000) .

A formação de biofilmes consiste em quatro passos: adesão, iniciação, maturação e dispersão, assim como o esquematizado na **Figura 20**.

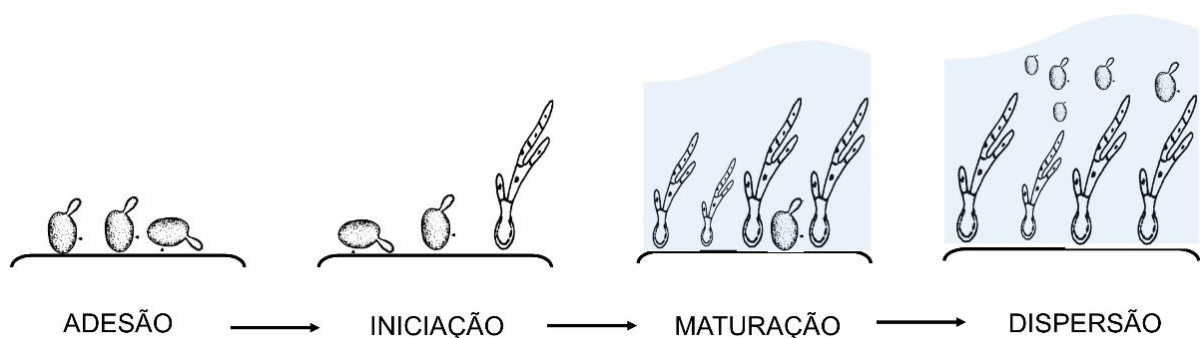


Figura 20. Fases de formação de biofilme.

A fase de adesão consiste na adesão de cepas a uma superfície por interação não específica, as células aderidas se reproduzem e formam micro comunidades com

condições nutricionais adequadas. Na fase de iniciação, as células aderidas formam micro colônias e tubos germinativos se formam para dar início a formação de hifas e formação de massas fúngicas. Na fase de maturação encontra-se uma estrutura organizada e altamente resistente composta por leveduras, hifas e pseudomicélio. Tendo em vista que biofilmes não podem crescer indefinidamente, enzimas que podem degradar matriz extracelular são produzidas aumentando a mobilidade das células, mudando de biofilme para células planctônicas favorecendo a adesão em outros locais (IKUMA; DECHO; LAU, 2015; KALAN et al., 2017; NETT, 2018; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019b).

Desta forma, o presente capítulo é destinado em avaliar o potencial dos sistemas desenvolvidos nos **CAPÍTULOS 2 e 3** contra cepas de *Candida* spp., bem como biofilmes, a toxicidade e a avaliação do potencial anti-inflamatório.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo das cepas estudadas

As cepas *C.albicans* ATCC 18804 e *C.glabrata* ATCC 2001 foram mantidas em -80°C em meio RPMI suplementado com 20% glicerol. Para a ativação, após descongelamento, uma alíquota da cepa original foi inoculada em ágar *sabouraud* seguido de incubação à 37°C por 48h. Após incubação, a placa foi mantida em geladeira (4-8°C) e, para cada ensaio, uma colônia foi reativada em ágar *sabouraud* e incubada à 37°C por 48h.

2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pela diluição em microplacas de 96 poços de acordo com a norma M27-A3 do CLSI (2008) e Duarte et al. (2005), com modificações. Em cada poço, 100 µL de RPMI-1640 (tamponado com MOP's) e 100 µL das soluções

dos fármacos em teste (CUR, FL e anfotericina B), para ser realizada a diluição seriada. Para este teste foi ainda utilizado o controle positivo anfotericina B, controle de meio de cultivo e controle negativo, contendo apenas o solvente. Após incubação a 37 °C por 48h, as placas foram lidas à absorbância (595 nm), em espectrofotômetro de microplacas para a determinação de CIM, sendo a menor concentração capaz de inibir $\geq 90\%$ da multiplicação microbiana.

2.3. Estudo de combinação (Checkerboard)

A atividade *in vitro* das amostras em combinação (CUR e FL), foi avaliada através do ensaio *checkerboard* de acordo com o método descrito no CLSI, 2008 e LaFayette et al, 2010, utilizando as cepas *C.albicans* e *C.glabrata*. Em uma microplaca de 96 poços com fundo redondo foram adicionados 50 μ L do meio de cultura RPMI 1640 em todos os poços das colunas 2 a 10 (linhas A-H). Então, foram adicionados 100 μ L da amostra A (curcumina) na coluna 1 inteira e, realizada a diluição seriada (50 μ L) da coluna 1 a 9. Em uma segunda microplaca, foram adicionados 50 μ L de RPMI 1640 em todos os poços das linhas B a H e, 100 μ L da amostra B (fluconazol) foram adicionados na linha A (coluna 1 a 10), a qual foi diluída seriadamente da linha A a G. As concentrações da amostra B foram transferidas para os respectivos poços da microplaca contendo a amostra A. Dessa maneira, a linha H (colunas 1-9) e coluna 10 (linhas A-G) representam as amostras A e B sozinhas, respectivamente. A suspensão de leveduras (100 μ L) foi adicionada em todos os poços das colunas de 1 a 11 (concentração final de 1×10^3 cels/mL) e, então, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. As colunas 11 e 12 representam os controles de crescimento e meio. Os valores de CIM foram avaliados pela análise visual e confirmada por espectrofotometria (490 nm) em um leitor de microplacas (Epoc 2, Bio-Rad®, CA).

Os resultados foram analisados de acordo com o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), como definido pela equação:

$$\text{ICIF} = \text{CIM}_A \text{ combinado} / \text{CIM}_A \text{ sozinho} + \text{CIM}_B \text{ combinado} / \text{CIM}_B \text{ sozinho} \quad (6)$$

2.4. Inibição da formação de biofilmes

O potencial das amostras desenvolvidas de inibir a formação de biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata* foi avaliado. Desta forma, 50 µL de meio RPMI 1640 foram adicionados em cada poço de uma microplaca de 96 poços, as amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) foram adicionadas em volume similar e posteriormente feita diluição seriada. Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão de levedura previamente padronizada (2×10^6 células/mL), e em seguida as microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, o meio de cultivo foi retirado e cada poço foi lavado com PBS (100 µL) por duas vezes para remoção de células não aderentes. A análise da atividade metabólica após o tratamento foi mensurada utilizando 100 µL da solução de XTT contendo 0,01% de menadiona, após a deposição da solução em cada poço a microplaca foi incubada por 2 horas à 37°C. Em seguida, 90 µL do sobrenadante da microplaca incubada foram transferidos para outra e nesta foi realizada a leitura espectrofotométrica (490 nm) em um leitor de microplacas (Benchmark, Bio-Rad®, CA).

2.5. Atividade em biofilmes pré-formados

O potencial das amostras contra biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata* previamente formados foi avaliado. No presente trabalho, foi realizada análise de biofilmes formados após 24, 48 e 72 horas.

Para a realização do teste, 100 µL da suspensão das amostras de leveduras previamente padronizada contendo cepas (1×10^6 células/mL) foram adicionados

em cada poço de uma microplaca de 96 poços, em seguida foi incubada por 24 horas à 37°C. Após esse período, cada poço das microplacas foi cuidadosamente lavado com 100 µL de PBS para remoção das células não aderentes.

Para os biofilmes com 48 horas de formação, os poços foram novamente preenchidos com meio RPMI e incubados por mais 24 horas, o processo se repetiu para os biofilmes com 72 horas. Em outra microplaca, as amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) foram diluídas em meio RPMI, e 100 µL desta solução foi transferido para a microplaca com os biofilmes previamente formados. Após 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi retirado e cada poço foi lavado com PBS (100 µL) por duas vezes para remoção de células não aderentes.

A análise da atividade metabólica após o tratamento foi mensurada utilizando 100µL da solução de XTT contendo 0,01% de menadiona, após a deposição da solução em cada poço a microplaca foi incubada por 2 horas à 37°C. Em seguida, 90 µL do sobrenadante da microplaca incubada foi transferido para outra e nesta foi realizada a leitura espectrofotométrica (490 nm) em um leitor de microplacas (Benchmark, Bio-Rad®, CA).

2.6. Análise da atividade em biofilmes pré-formados com microscopia confocal

Biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata* após 24 horas de formação foram avaliados utilizando microscopia confocal. Inicialmente, 1 mL da suspensão previamente padronizada contendo as cepas (1×10^6 células/mL) foi adicionado em cada poço de uma microplaca de 12 poços, em seguida a microplaca foi incubada por 24 horas à 37°C. Após esse período, cada poço das microplacas foi cuidadosamente lavado com 1 mL de PBS para remoção das células não aderentes. Em outra microplaca, as

amostras foram diluídas em meio RPMI, e 1 mL desta solução foi transferido para a microplaca com os biofilmes previamente formados. Após 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi retirado e cada poço foi lavado com PBS (1 mL) por duas vezes para remoção de células não aderentes.

Depois do preparo, foi realizada a avaliação de cepas vivas e mortas nas estruturas tridimensionais do biofilme após o tratamento. O ensaio *Live and Dead* foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (LIVE/DEAD™ BacLight™, Thermo Scientific). Após 24 horas da formação dos biofilmes, foi realizada marcação com Syto9 e Iodeto de Propídio (PI) por 30 min. Após este tempo, as sondas foram removidas e as amostras foram retiradas para análise CLSM (LSM 800 Confocal Microscope, Carl Zeiss). O modo de aquisição foi de 10% de potência do laser de 488 nm, faixa de detecção espectral de microrganismos vivos marcados por Syto9 de 488 a 530 nm (verde) e faixa de detecção espectral de organismos mortos marcados com PI de 575 a 630 nm (vermelho). As imagens foram adquiridas utilizando a ferramenta Z stack e reconstruídas utilizando o Software Zen Blue 2.3 (Carl Zeiss).

2.7. Ensaio in vivo alternativo com *Galleria mellonella*

2.7.1. Condições de infecção da *G.mellonella*

As larvas de *G. mellonella* foram cultivadas em ambiente em *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) a 27 °C até atingir peso entre 200 mg e 400 mg. O inóculo de *C. albicans* ATCC 18804 foi padronizado em solução salina estéril (0,85%) seguindo a escala de McFarland 1 (5×10^4 células/larva). Por fim, 10 µL do inóculo padronizado foram administrados à última *proleg* esquerda de cada larva com o auxílio de uma Seringa Hamilton Microliter™, com incubação a 37 °C (MARENA et al., 2022).

2.7.2. Quantificação da eficácia terapêutica anti-*C.albicans* na hemolinfa.

Os grupos experimentais avaliados encontram-se descritos na **Tabela 15**. Cada grupo consistiu de 20 larvas ($n = 20$). O tratamento e a infecção foram semelhantes aos itens anteriores. Após a incubação e análise físico-motora, duas larvas de cada grupo experimental foram selecionadas para retirada da hemolinfa. Este procedimento foi repetido por 5 dias após a administração das amostras em análise. Após a seleção das larvas, foi realizada assepsia com álcool 70% no local de coleta, e as larvas foram mantidas em repouso até secarem. Uma agulha estéril Vacuplast ($13 \times 0,33$ mm) foi usada para perfurar a região dorsal da larva. Em seguida, 20 μ L de hemolinfa foram coletados e transferidos para solução salina estéril (diluição 1:10). Posteriormente, 50 μ L dessa solução com hemolinfa foram transferidos para Agar *Sabouraud* Dextrose + cloranfenicol e incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, o número de UFC das amostras coletadas de cada larva foi quantificado e os dados obtidos neste ensaio foram utilizados para definir a atividade terapêutica das amostras, comparadas ao grupo positivo de infecção.

Tabela 15. Grupos experimentais avaliados pelo modelo em *G.mellonella*

Grupo experimental	Especificação	Tratamento
Grupo 1	Controle positivo	10 μ L de solução salina estéril
Grupo 2	Controle solvente	10 μ L de solução de metanol a 1,75%
Grupo 3	Tratamento CLNBLANK	10 μ L CLNBLANK em solução salina
Grupo 4	Tratamento Sol. FL	10 μ L de solução de FL a 12,15 mg/kg
Grupo 5	Tratamento Sol. CUR + FL	10 μ L de solução de CUR+FL a 7,07 mg/kg
Grupo 6	Tratamento CLNFC	10 μ L de solução de CLNFC a 7,07 mg/kg

Durante o experimento a morte foi avaliada considerando: cor, melanização e perda total da mobilidade após estímulo físico.

2.8. Cultivo de células RAW 264.7 e CRL-2616

As células de linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm², TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos, as células foram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM foi descartado e as células lavadas com uma PBS. Em seguida, as células foram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C. Após esse período, colocou-se meio DMEM para neutralizar a ação da tripsina, e a suspensão de células obtida foi centrifugada por 3 minutos a 300 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet de células foi ressuspensionado em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células foi usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

A linhagem celular vaginal ATCC CRL-2616 foi desenvolvida originalmente de tecido da mucosa vaginal normal retirado de paciente na pré-menopausa. As células

foram mantidas e propagadas usando meio soro de queratinócitos - Keratinocyte Serum-Free Medium (KSFM) (Invitrogen, Mississauga, Canadá). Cada mL de meio KSFM foi suplementado com 50 µg de extrato de hipófise bovina; 0,1 ng de fator de crescimento epidérmico e 100 U de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina a 37°C com 5,0% de CO₂. As condições de passagem e contagem das células foram semelhantes às das células RAW 264.7, exceto pelo meio de propagação utilizado (KSFM).

2.9. Ensaio de viabilidade celular

Os grupos experimentais foram divididos em: CLNC, CLNFC, CLNBLANK, curcumina e o controle negativo (sem a formulação), para ambas as linhagens celulares. Os tratamentos foram realizados em triplicata. As células foram transferidas para uma microplaca de cultura de 96 poços (3000 células/poço) e tratadas com variadas concentrações das amostras, partindo-se de uma concentração de 1 mg/mL e foram incubadas com os tratamentos por 24 horas.

Em seguida, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados.

Após 3 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm.

Foram executadas análises da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclass a 95% e cálculos de IC₅₀ foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos

utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

2.10. Estudo em cultura de macrófagos RAW 264.7 e propriedades anti-inflamatórias

A solução aquosa com CLNC, CLNFC, CLNBLANK e curcumina (1 g/L) foram armazenadas em tubos Falcon de 15 mL e acondicionadas na geladeira (8°C). Esta suspensão foi produzida conforme a necessidade do uso nos ensaios de ELISA. A partir da suspensão estoque foram então realizadas diluições seriadas para obtenção da concentração selecionada para o tratamento das células (25 µg/mL, escolhido conforme ensaio de viabilidade celular).

Assim, o experimento para atividade anti-inflamatória (dosagem de citocinas) iniciou com a semeadura das células em placas de 96 poços (TPP) contendo 3×10^3 células/poço cultivadas em DMEM. Adicionou-se os 25 µg/mL da solução aquosa com as amostras (1 g/L) em placas diferentes, e o controle negativo ficou caracterizado como as células sem tratamento, além do grupo LPS. Após 2h de contato das formulações com as células, as amostras foram estimuladas com endotoxina bactéria (LPS) de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharide B from *Escherichia coli* O111:B4- Sigma, MO, USA), na concentração de 2 µg/mL. As amostras foram incubadas por 24, 48 ou 72h.

Após os períodos de tratamento das células com as suspensões descartou-se o meio e foi congelado a -20°C. A concentração das citocinas liberadas no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA. As citocinas avaliadas foram TNF-alfa, IL-6, IL-10, IL-2 conforme as instruções do fabricante (ThermoFisher). As doses mínimas detectáveis foram determinadas experimentalmente como 4,8 pg/mL para TNF-α, 1,1 pg/mL for IL-6, 2,0 pg/mL ´para IL-10, e 1,0 pg/mL para IL-2. As medições

de todas as citocinas resultaram em coeficientes médios intra-ensaio de variação abaixo de 5%.

Todos os experimentos foram feitos em quadruplicata em 3 dias experimentais. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, observadas as pressuposições de normalidade. O nível de significância adotado foi 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Determinação inicial da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM)*

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram avaliadas para *C.albicans* ATCC 18804 e *C.glabrata* ATCC 2001. Os valores obtidos com os ensaios encontram-se na **Tabela 17**.

Como pode ser observado, os valores de CIM₉₀ atribuídos à suspensão de FL tanto para *C.albicans* (GARCIA-GOMES et al., 2012; KELIDARI et al., 2017) como para *C.glabrata* (KELIDARI et al., 2017) indicam que as cepas utilizadas no estudo produziram respostas condizentes com o descrito na literatura. Enquanto para a suspensão de CUR, observa-se diferentes valores de CIM₉₀ na literatura para as espécies em estudo (ANDRADE et al., 2019; GARCIA-GOMES et al., 2012; MARTINS et al., 2009; RODERO et al., 2018; SHARMA et al., 2010), o que pode estar relacionado ao teor em que o composto se encontra, visto que a maioria dos estudos utiliza CUR a 65% (m/m).

No estudo de Sharma e colaboradores (SHARMA et al., 2010) os autores investigaram os possíveis mecanismos de ação da CUR em cepas de *C.albicans* e não-*albicans*, e por meio deste foram observados dois mecanismos: i) efeito antifúngico promovido pela via de sinalização de ROS levando à apoptose precoce e

ii) inibição do desenvolvimento de hifas pela regulação dos níveis de TUP1 (captação de timidina 1).

Outro mecanismo também discutido é a interação da CUR com ergosterol. Andrade e colaboradores (ANDRADE et al., 2019), sugerem que esta interação favorece alteração na permeabilidade da membrana levando a ruptura da célula, mas enfatizam que este não é o único mecanismo associado. Khan et al. (2012) demonstraram em seu estudo que a CUR foi capaz de inibir o efluxo de H^+ levando à acidificação intracelular e morte de diferentes tipos de *Candida* spp..

3.2. Ensaio combinatório

Com base nos valores de CIM previamente obtidos o ensaio combinatório (*checkerboard*) foi realizado, e o ICIF foi interpretado como sinérgico ($ICIF \leq 0,5$), sinergia parcial ($ICIF 0,5 - 0,75$), aditivo ($ICIF 0,76 - 1,0$), indiferente ($ICIF 1,0 - 4,0$), e antagonismo ($ICIF > 4,0$) (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013). Os resultados obtidos podem ser observados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Resultados do ensaio combinatório entre curcumina e fluconazol utilizando as cepas de *C. albicans* 18804 e *C. glabrata* 2001.

Amostra	<i>C. albicans</i> 18804				<i>C. glabrata</i> 2001			
	CIM S*	CIM C*	ICIF	Classificação	CIM S*	CIM C*	ICIF	Classificação
Curcumina	23,43	6,25	0,587	Sinergismo parcial	7,6	6,25	0,982	Aditivo
Fluconazol	2,43	0,78			9,75	1,56		

*valores expressos em $\mu g/mL$. CIM S – Concentração inibitória mínima do composto sozinho; CIM C – Concentração inibitória mínima do composto combinado; ICIF – Índice da concentração inibitória fracionada.

Tendo em vista os valores de ICIF expressos na **Tabela 13**, observa-se que a combinação entre CUR e FL apresentou efeito parcialmente sinérgico para *C. albicans*

(ICIF 0,5 - 0,75) e aditivo para *C.glabrata* (ICIF 0,76 - 1,0). O sinergismo é caracterizado pela interação de compostos que promove a otimização mútua de atividade de maneira mais significativa que a simples soma de atividade destes compostos, enquanto o efeito aditivo ocorre quando a atividade resultante é equivalente a soma dos efeitos dos compostos separadamente.

Sharma e colaboradores (SHARMA et al., 2010) por meio de seu estudo previamente mencionado, indicaram que um dos possíveis mecanismos de ação da CUR seria a formação de estresse oxidativo na levedura levando à apoptose. No mesmo trabalho os autores apontam que azóis promovem aumento de ROS em espécies suscetíveis. Desta forma, como base no exposto, sugere-se que os resultados observados decorrem deste mecanismo compartilhado por ambas moléculas. Adicionalmente, Garcia-Gomes et al., (2012) avaliaram o potencial sinérgico desta combinação em isolados clínicos de *C.albicans* resistentes a fluconazol, com ênfase na resistência promovida por bombas de efluxo. Os autores observaram que a CUR é capaz de modular a bomba de efluxo (MDR1), promovendo a otimização da terapia com FL contra as espécies resistentes.

3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM) das amostras desenvolvidas

Após avaliação dos dados anteriores (Item 3.2.), os CLN foram desenvolvidos. Posteriormente, foi realizada a avaliação da CIM e CFM das amostras desenvolvidas, cujo resultado encontra-se descrito na **Tabela 17**.

Para *C.albicans* os nanossistemas foram capazes de otimizar a atividade de fluconazol (de 2,43 para 0,78 µg/mL), e de curcumina (de 23,43 para 3,9 µg/mL). Esse resultado pode estar relacionado ao maior *uptake* celular beneficiado pelas nanopartículas, as quais favorecem este fenômeno tendo em vista a sua alta área

superficial. O mesmo pôde ser observado com *C.glabrata*, com exceção da CLNF. Sugere-se que tal resultado tenha ocorrido visto que a *C.glabrata* apresenta menor sensibilidade ao fármaco, e o tempo de contato entre o microrganismo e o sistema não tenha sido suficiente para a CLN liberar o fármaco à uma concentração eficaz.

Ao analisar os resultados de CLNFC, observa-se que para ambas as cepas a nanoestrutura apresentou atividade superior aos fármacos em solução e nas CLN separadamente, o que reitera os resultados de sinergismo parcial e adição obtidos pelo teste de combinação, aliados à vantagem de um sistema nanoestruturado. A manutenção da eficácia, bem como a otimização pela veiculação de fármacos utilizando nanoestruturas foram observados na revisão bibliográfica publicada previamente pelo nosso grupo (ARAUJO et al., 2020a). Quanto aos resultados de CFM, observa-se que houve manutenção dos valores de CFU atribuídos à CLNFC o que corrobora com a hipótese de aumento de internalização celular promovido pelas nanoestruturas.

Tendo em vista que a dispersão das nanoestruturas em um hidrogel pode fornecer propriedades antimicrobianas distintas, foi realizada a avaliação da CIM e CFM dos nanossistemas dispersos em hidrogéis (**Tabela 17**).

Para *C.albicans*, somente o hidrogel com a fluconazol (H-Flu) e a combinação de fluconazol e curcumina (H-CurFlu) foram capazes de reduzir o crescimento das cepas em 90%. Por outro lado, para *C.glabrata*, somente o hidrogel com curcumina (H-Cur) e a combinação H-CurFL foram capazes de promover CIM₉₀. Corroborando com os resultados de CIM apresentados pelos fármacos em solução e evidenciando baixa responsividade de *C.glabrata* ao FL. Cabe ressaltar que a combinação de fluconazol e curcumina (H-CurFlu) promoveu redução de CIM em comparação aos fármacos isolados dispersos nos hidrogéis.

Quando avaliadas as nanoestruturas dispersas em hidrogéis, somente a nanoestrutura contendo ambos fármacos apresentou CIM, e os valores apresentaram-se maiores em comparação aos fármacos diretamente dispersos no hidrogel. Sugere-se que este comportamento ocorra em decorrência do hidrogel ser uma matriz viscosa, nesse caso contendo 20% m/m de PL, e consequentemente aumenta tempo de liberação dos fármacos e reduz o contato do CLN com o microrganismo. Ao observar a CFM, nota-se que somente a combinação de ambos os fármacos promoveu comportamento fungicida, o que corrobora com a hipótese previamente mencionada. Quanto aos testes realizados com *C.glabrata* nota-se também que a dispersão dos CLN em hidrogéis promoveu aumento da CIM e CFM.

A maioria dos estudos encontrados na literatura que utilizam CLN e NLS dispersos em hidrogéis, avaliaram o potencial antifúngico de seus sistemas utilizando modelos *in vivo*, ou estabelece uma comparação direta com um produto comercial (ARAUJO et al., 2020a; ESPOSITO et al., 2013; KENECHUKWU; ATTAMA; IBEZIM, 2017). Desta forma, nota-se a necessidade de maiores avaliações quanto ao potencial de H-CLNFC por outros modelos *in vitro*.

Tabela 17. Valores de CIM e CFM obtidos.

Amostra	CIM ₉₀ (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
	<i>C.albicans</i> 18804	<i>C.glabrata</i> 2001	<i>C.albicans</i> 18804	<i>C.glabrata</i> 2001
SOL curcumina	23,43	7,6	62,5	62,5
Fluconazol	2,43	9,6	+	64
CLNBlank	+	+	+	+
CLNC	3,9	1,95	+	+
CLNF	0,78	+	1,56	+
CLNFC	Cur: 3,9 Flu:0,39	Cur: 1,95 Flu:0,195	Cur: 3,9 Flu:0,39	Cur: 1,95 Flu:0,195
H-Cur	+	12,18	+	+
H-Flu	4,88	+	+	+
H-CurFlu	Cur: 12,18 Flu:1,22	Cur: 6,9 Flu:1,21	Cur: 24,37 Flu:2,43	Cur: 6,9 Flu:1,21
H-CLNBLANK	+	+	+	+
H-CLNC	+	+	+	+
H-CLNF	+	+	+	+
H-CLNFC	Cur: 48,75 Flu:4,88	Cur: 24,37 Flu:2,43	+	Cur: 24,37 Flu:2,43

“+” indica crescimento total nas concentrações testadas; CIM – Concentração inibitória mínima; CFM – Concentração fungicida mínima

3.4. Atividade em biofilme

Os biofilmes são caracterizados como comunidades de microorganismos organizados que promovem resistência aos agentes antimicrobianos (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019b). A formação de biofilme inicia quando células planctônicas encontram uma superfície e aderem a esta. Desta forma, foi avaliada a adesão de *C.albicans* (**Figura 21A**) e *C.glabrata* (**Figura 22A**) na presença das amostras nanoestruturadas. Cabe ressaltar, que em decorrência dos resultados apresentados pelas amostras H-CLN no estudo de CIM, bem como a alta viscosidade da amostra, a avaliação do biofilme não foi realizada com H-CLN.

Na maior concentração testada (25 µg/mL de FL e 250 µg/mL de CUR), todos os grupos testados demonstraram redução significativa da adesão das cepas, enquanto o fluconazol na segunda maior concentração (12,5 µg/mL) já não foi capaz de reduzir a adesão. Em *C.albicans* foi observada que as CLNF e CLNC promoveram redução da adesão das cepas na placa até na concentração de 0,78 µg/mL de FL e 7,8 µg/mL de CUR, com destaque para a CLNC. Sugere-se que esta atividade seja relacionada pelo impedimento estérico da CLN, bem como a atividade antifúngica previamente observada.

Adicionalmente, na revisão de Shariati et al., (2022) dados mostram que a CUR tem uma atividade anti-adesiva sobre *C. albicans* e interfere na expressão de genes associados à adesão e ao biofilme, e ainda é capaz de inibir a formação de hifas (SHARMA et al., 2010). Quanto a *C.glabrata* (**Figura 22A**), destaca-se o potencial combinatório da CUR e do FL nanoestruturados (CLNFC) até a concentração de 1,56 µg/mL de FL e 15,6 µg/mL de CUR, reforçando a hipótese que a redução da adesão tenha ocorrido pelo impedimento estérico combinado com a atividade anti-cândida da associação.

Após o ensaio anterior, foi realizada a avaliação da quantidade de células viáveis por meio do plaqueamento. Tanto para *C.albicans* (**Figura 21B**) como para *C.glabrata* (**Figura 22B**), as maiores concentrações testadas das amostras demonstraram redução das células viáveis, contudo nas duas menores foi observado destaque da combinação entre FL e CUR na nanoestrutura (CLNFC), corroborando com os resultados observados de CIM e CFM previamente realizados.

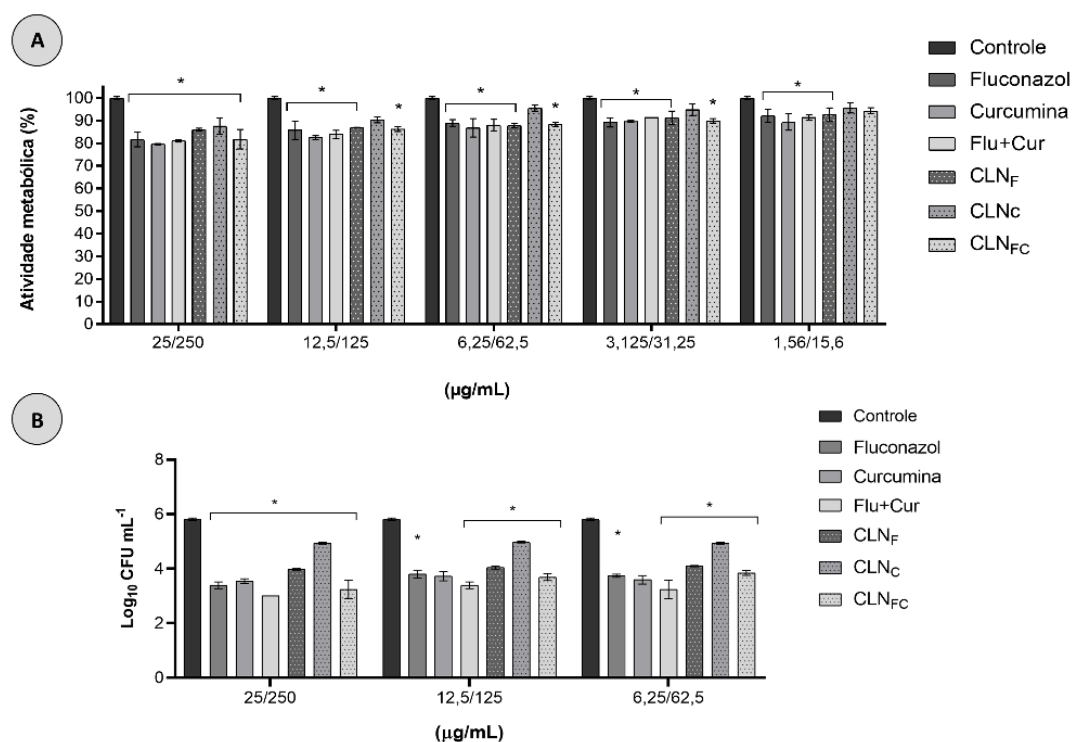


Figura 21. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre a adesão do biofilme (A) e a viabilidade (B) do mesmo de *C.albicans* 18804.

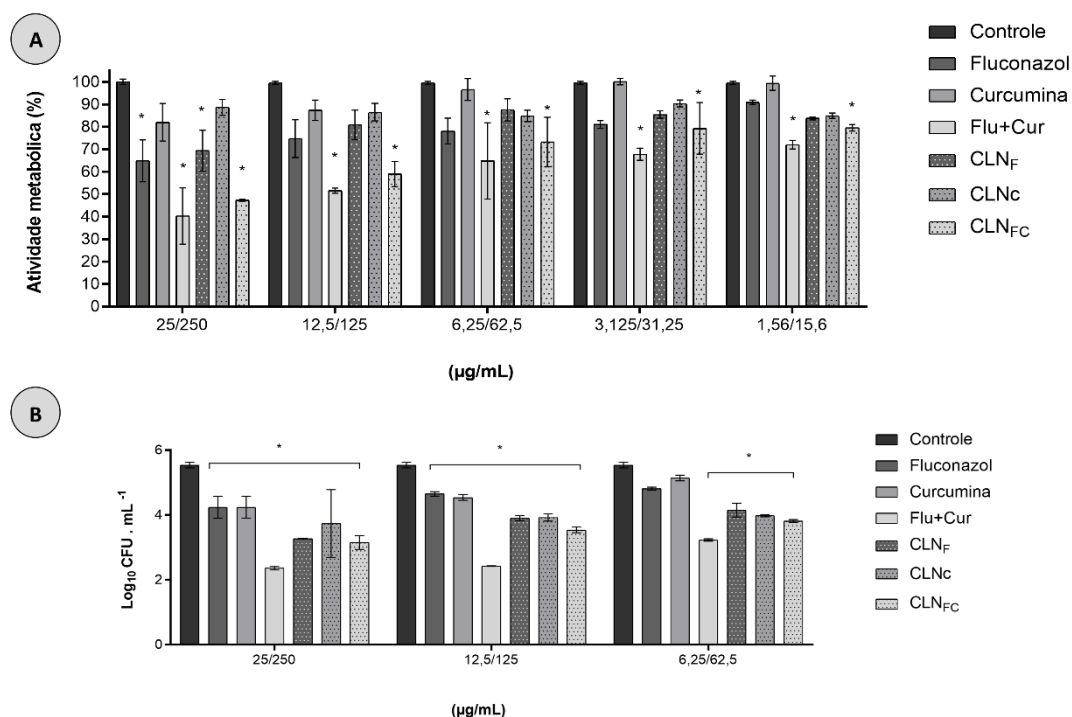


Figura 22. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLN_F, CLN_C e CLN_{FC}) sobre a adesão do biofilme (A) e a viabilidade (B) do mesmo de *C. glabrata* 2001.

Após a adesão, as cepas levam um período de 24–72 h para formar um biofilme maduro com composição complexa e que por sua vez resulta na resistência à terapia já vigente (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2019b). Desta forma, no presente estudo foi realizada a avaliação da atividade dos fármacos isolados e nanoestruturados, separados e em associação, em biofilmes formados após 24h, 48h e 72h.

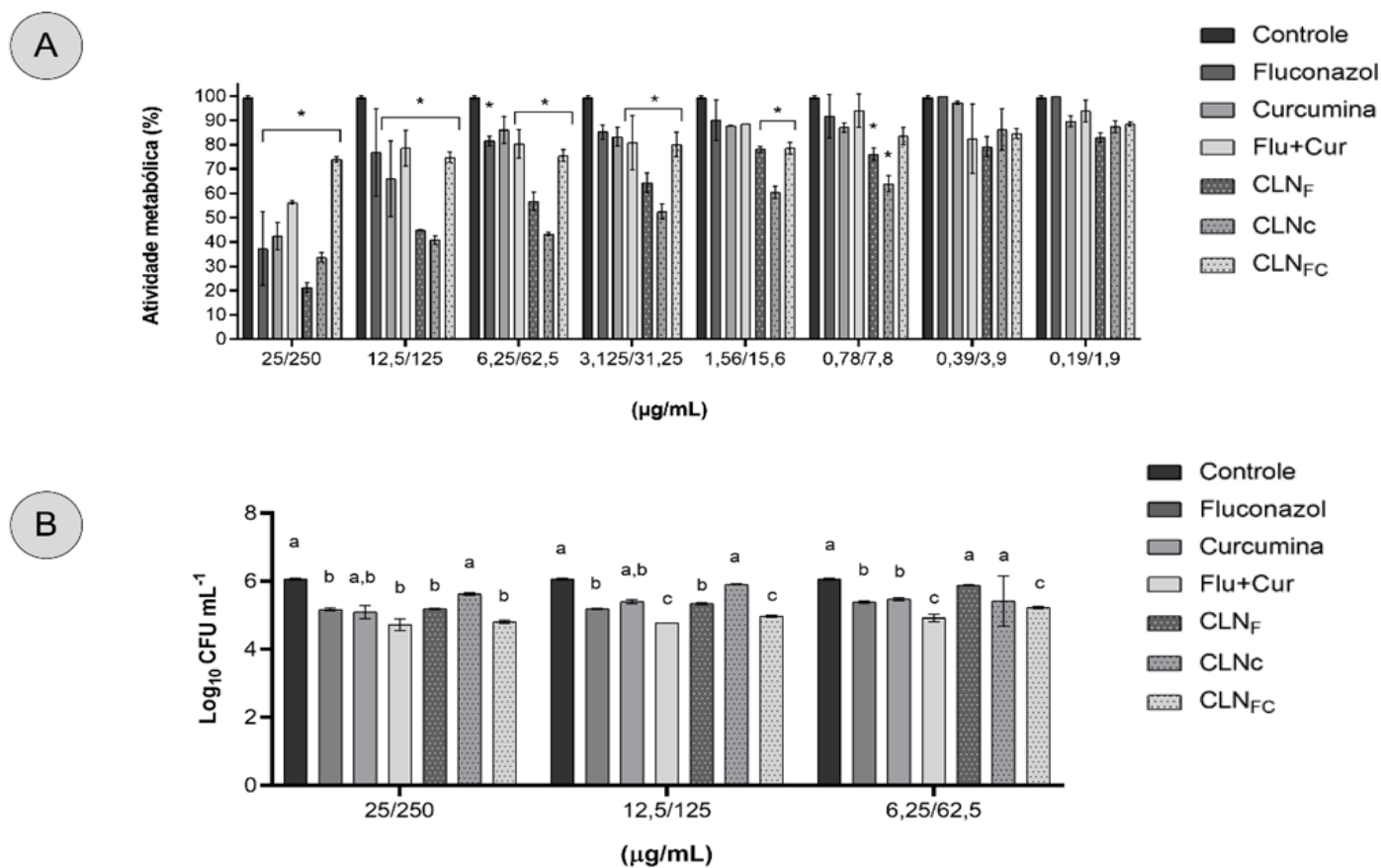


Figura 23. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre biofilme pré-formado após 24h (A), e o plaqueamento (B), de *C.albicans* 18804.

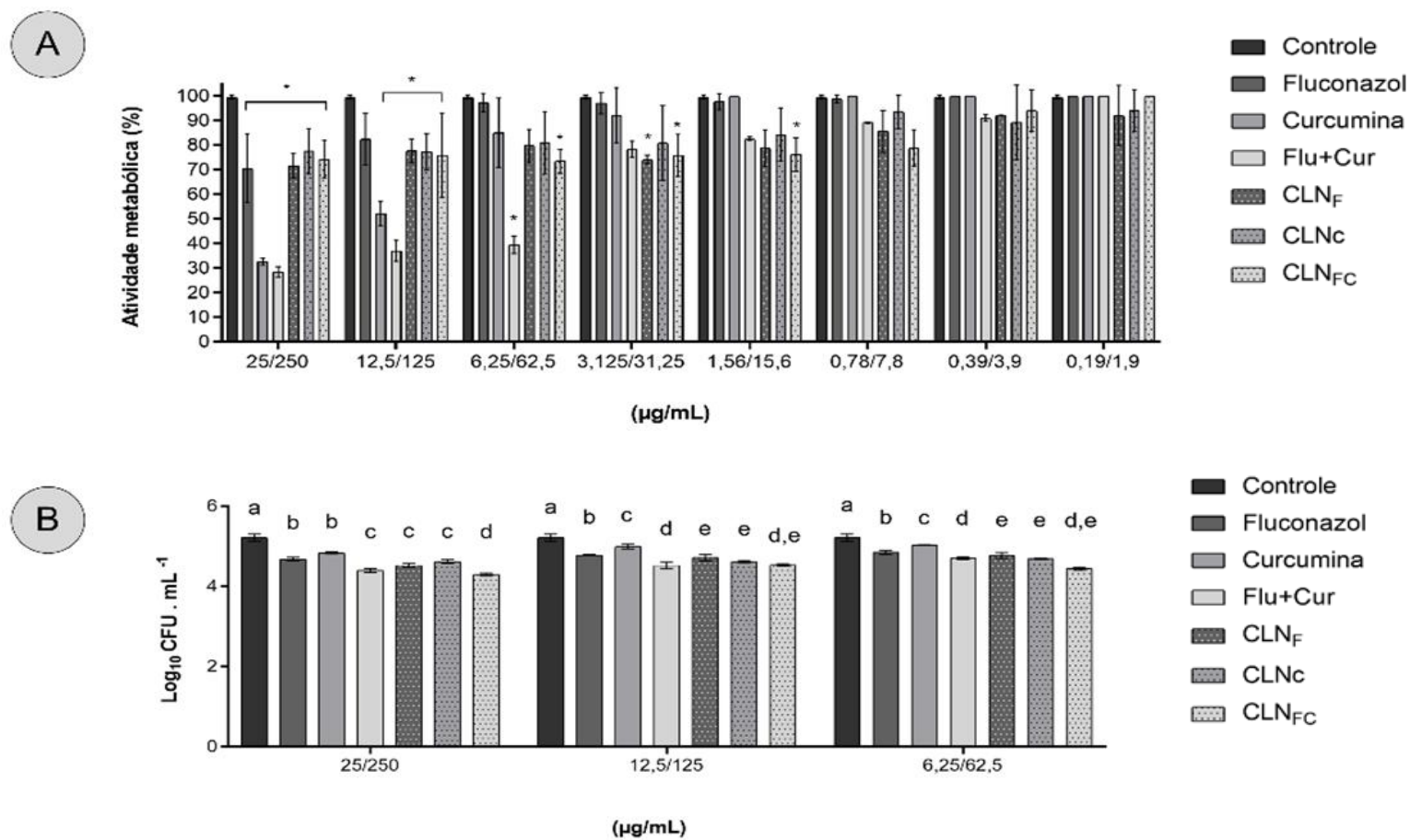


Figura 24. Efeito das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) sobre biofilme pré-formado após 24h (A), e a ação fungicida (B), de *C.glabrata* 2001.

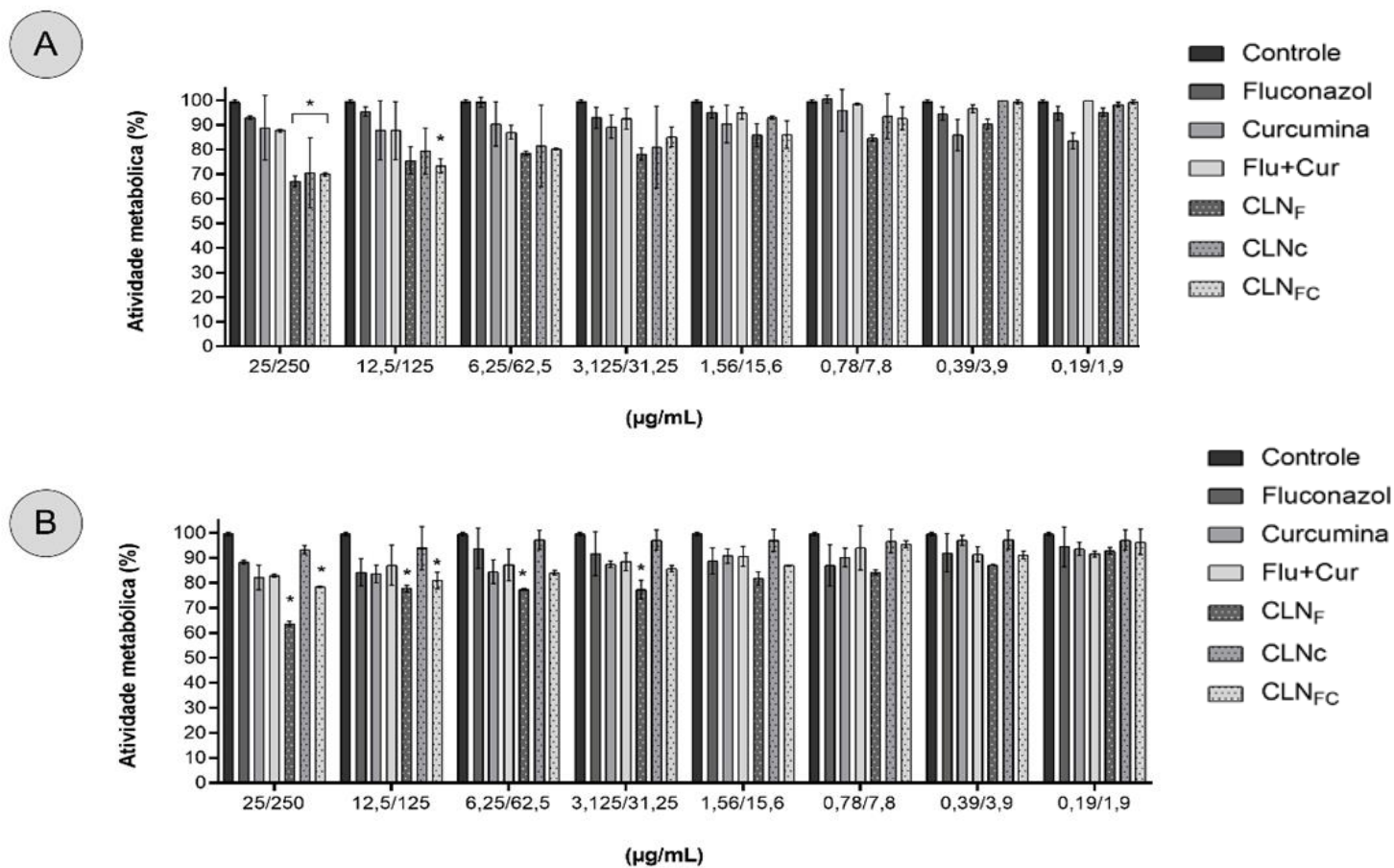


Figura 25. Atividade das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) contra biofilmes de *C.albicans* 18804 após 48h (A) e 72h (B) de desenvolvimento.

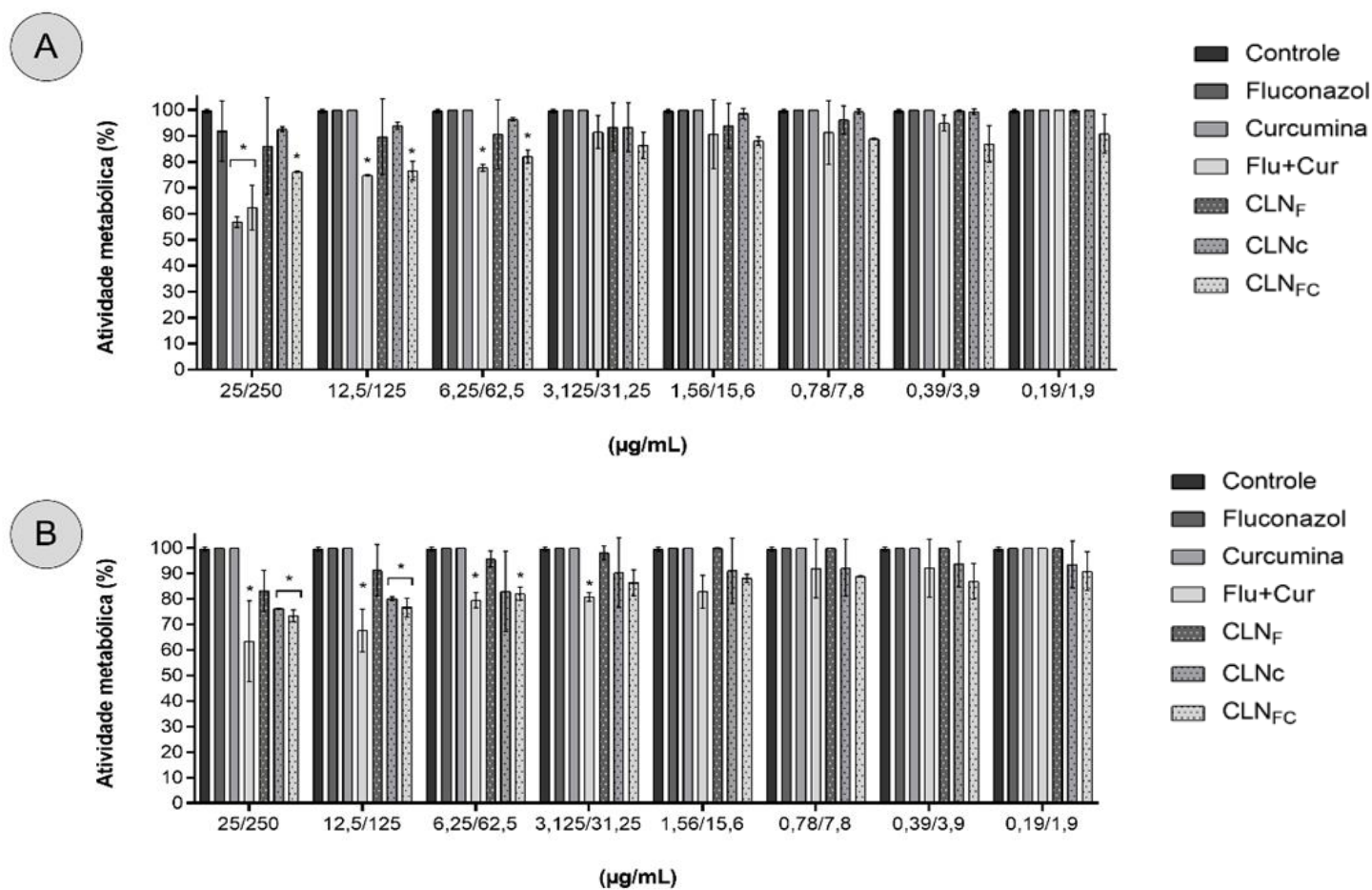


Figura 26. Atividade das amostras (suspensão de CUR, suspensão de FL, suspensão CUR+FL, CLNF, CLNC e CLNFC) contra biofilmes de *C.glabrata* 2001 após 48h (A) e 72h (B) de desenvolvimento.

Para biofilmes com 24h de formação foi observado que na maior concentração testada (25 µg/mL de FL e 250 µg/mL de CUR), todos os grupos avaliados demonstraram redução significativa no metabolismo das cepas de *C.albicans* (**Figura 23**). A redução metabólica foi significativa para os fármacos livres, separadamente e em conjunto, em todas as concentrações testadas. Observou-se ainda que as CLNs apresentaram eficiência igualmente similar, com exceção da CLNC. Ressalta-se ainda que os resultados apresentados corroboram com os obtidos pelos ensaios de CIM e CFM. O plaqueamento após o tratamento indicou que as nanoestruturas até na concentração de 6,25/62,6 µg demonstraram capacidade de preservar a atividade da CUR na redução de células viáveis, e otimizar a atividade do FL.

Enquanto para *C.glabrata*, observa-se que nas maiores concentrações testadas somente as amostras contendo curcumina não apresentaram impacto significativo no metabolismo da cepa. Por outro lado, as amostras contendo a combinação, tanto isolada como em CLN, demonstraram redução significativa até mesmo nas menores concentrações avaliadas, indicando a eficiência do tratamento proposto. O plaqueamento do biofilme após o tratamento demonstrou comportamento similar ao avaliado pela atividade metabólica, dando destaque à eficiência na nanoestrutura contendo ambos os fármacos.

Para biofilmes maduros de *C.albicans* formados após 48h (**Figura 25A**) foi observado que somente as nanoestruturas na maior concentração testada foram capazes de promover redução significativa da viabilidade, e somente a CLNFC foi eficaz na concentração de 12,5 µg/mL de FL e 125 µg/mL de CUR, indicando o potencial da associação nanoestruturada. Enquanto, em biofilme maduro após 72h (**Figura 25B**) somente CLNF e CLNFC demonstraram redução significativa da viabilidade, com destaque para a CLNFC a qual demonstrou-se eficaz até a

concentração de 3,125 µg/mL. Sugere-se que este resultado decorre do menor DH apresentado por esta nanoestrutura, proporcionando maior permeação pelo biofilme ($110,9 \pm 0,8$ nm) (PEULEN; WILKINSON, 2011). Enquanto para *C.glabrata*, destaca-se o potencial da associação do FL com a CUR, o qual demonstrou maior a eficácia dos tratamentos testados em biofilme formado após, 24h, 48h e 72h.

O efeito de inibição dos biofilmes podem estar relacionados a capacidade da CUR sozinha ou em combinação com FL de suprimir a formação de biofilme e a transição morfológica de levedura para hifa em *C. albicans*. Além disso, a CUR combinada com FL tem a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana e reduzir a produção de ATPase intracelular (DONG et al., 2021; SHARIATI et al., 2022).

3.5. Análise da atividade contra biofilmes pré-formados por microscopia confocal

A microscopia confocal foi empregada no presente estudo com o objetivo de avaliar, por meio de outra técnica, o potencial do tratamento proposto contra biofilmes pré-formados após 24 horas. Neste estudo foi empregado o ensaio *Live and Dead*, onde são indicadas células vivas e mortas por meio da integridade de membrana e permeação de sondas fluorescentes. A diferenciação de células mortas é indicada pela capacidade do iodeto de permear pela membrana de células danificadas, em vermelho (DA SILVA et al., 2021). Ainda, por meio desta técnica, foi avaliada a espessura do biofilme após o tratamento (**Figura 29**). Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 27 e Figura 28** para *C.albicans* e *C.glabrata*, respectivamente.

Para os testes realizados, foram avaliados os controles de crescimento, solução utilizada para solubilizar os fármacos (1% v/v etanol), nanoestrutura sem ativos

("blank"), e controle de morte ("dead") para qual foi utilizado solução de anfotericina B (25 µg/mL).

Na **Figura 27** nota-se os resultados obtidos com *C.albicans*. Ao compararmos os grupos CUR e FL com o controle crescimento "CT", não foi observado aumento significativo de eventos amarelos/vermelhos que indicam a morte do microrganismo. O mesmo é observado quando a espessura do biofilme é analisada, **Figura 29**. Contudo, após o tratamento com a solução de fluconazol e curcumina (CUR+FL), observa-se aumento do número de eventos amarelos/vermelhos. Estabelecendo um comparativo direto dos IFAs em suspensão (CUR e FL) *versus* os IFAs nanoestruturados (CLNC e CLNF) nota-se um aumento significativo de eventos amarelos/vermelhos promovidos pela nanoveiculação. Quanto a combinação nanoestruturada de ambos os IFAs (CLNFC) nota-se o maior número de eventos amarelos/vermelhos, com menor número de microrganismos e com redução significativa de espessura do biofilme de *C.albicas*, **Figura 29**. Esse resultado corrobora com o previamente observado nos estudos de CIM demonstrados no **item 3.3**.

Na **Figura 28** são observados os resultados obtidos com *C.glabrata*. De uma maneira similar o observado com *C.albicans*, a combinação de CUR e FL demonstrou maior número de eventos amarelos/vermelhos, indicando morte do microrganismo, e com maior redução de espessura do biofilme. O nanocarreamento dos IFAs promoveu otimização significativa em comparação aos IFAs em suspensão. Enquanto a combinação nanoestruturada favoreceu ao maior número de eventos amarelos/vermelhos, com menor número de microrganismos e redução de espessura do biofilme.

A otimização de atividade de IFAs nanoveiculados em biofilmes é amplamente descrito na literatura e se resguarda principalmente na alta superfície de contato devido ao tamanho submicrométrico desses sistemas, bem como na sua capacidade de aumentar solubilidade de IFAs (QAYYUM; KHAN, 2016).

Ainda, de acordo com Ikuma e colaboradores (IKUMA; DECHO; LAU, 2015) as interações entre nanopartículas e biofilmes pode ser compreendido em três etapas: 1) Trajetória das nanopartículas até as proximidades do biofilme; 2) adesão à superfície do biofilme; e 3) penetração através do biofilme. A cada etapa há uma interação complexa entre característica de composição e físico-químicas do nanossistema, microambiente do biofilme e parâmetros ambientais nos quais se é estudada essa interação. O que torna a interação entre o nanossistema um material rico e promissor para estudo, em virtude da singularidade de cada caso.

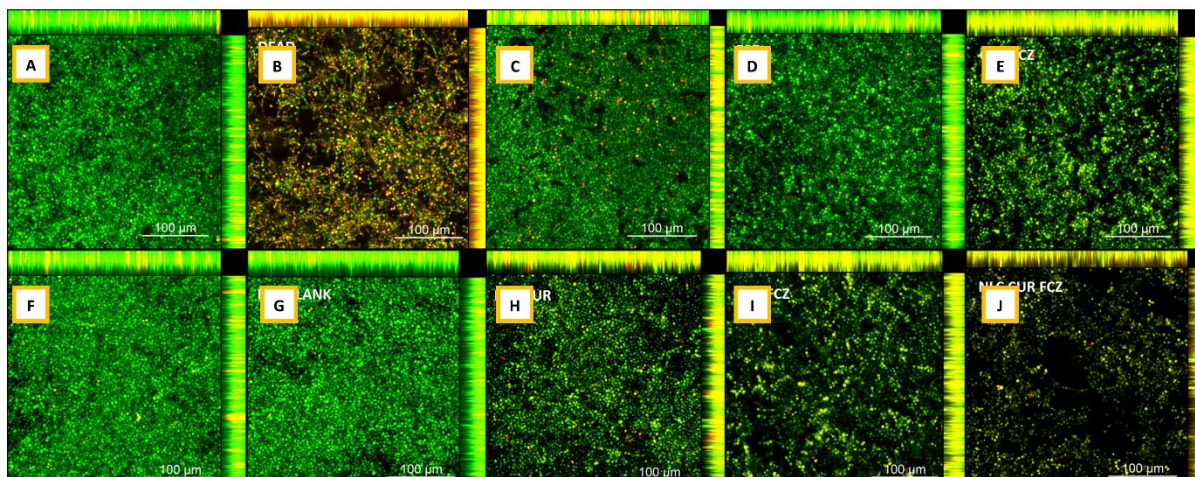


Figura 27. Integridade da membrana e biomassa de *C.albicans* ATCC 18804 por microscopia confocal com coloração *Live and Dead*. Verde: Microrganismo vivo marcado positivamente com Syto9. Amarelo/Vermelho: Microrganismo morto marcado positivamente com iodeto de propídio. Onde, a) Controle crescimento, b)

Controle morte; c) CUR; d) FL; e) CUR e FL; f) Controle solução; g) CLNBLANK; h) CLNC; i) CLNF; e j) CLNFC.

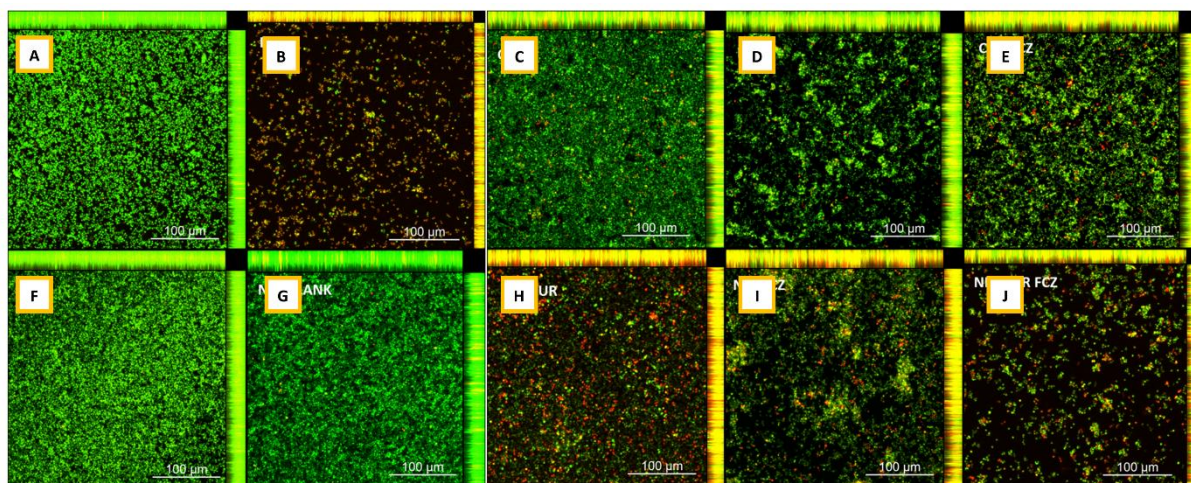


Figura 28. Integridade da membrana e biomassa de *C.glabrata* ATCC 2001 por microscopia confocal com coloração *Live and Dead*. Verde: Microrganismo vivo marcado positivamente com Syto9. Amarelo/Vermelho: Microrganismo morto marcado positivamente com iodeto de propídio. Onde, a) Controle crescimento, b) Controle morte; c) CUR; d) FL; e) CUR e FL; f) Controle solução; g) CLNBLANK; h) CLNC; i) CLNF; e j) CLNFC.

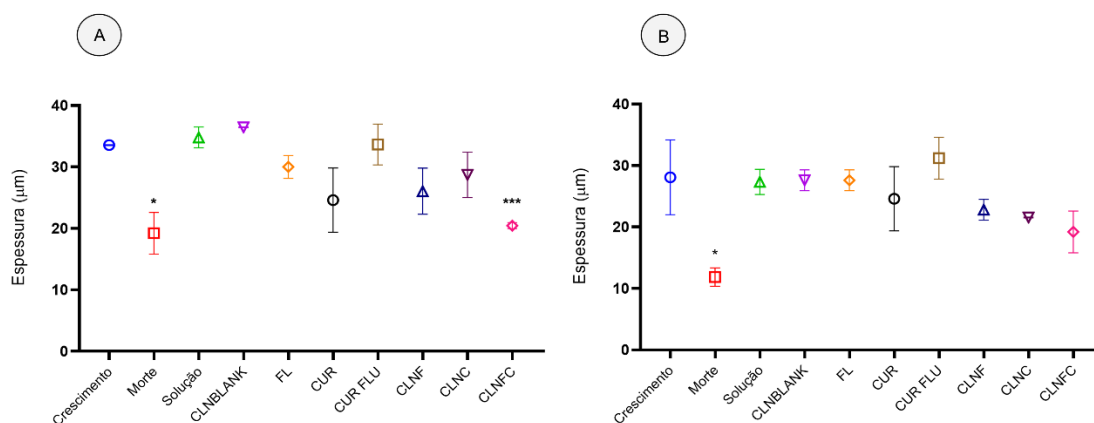


Figura 29. Gráficos com espessuras dos biofilmes de (A) *C.albicans* ATCC 18804 e (B) *C.glabrata* ATCC 2001, obtidos pela técnica de confocal, em contato com as amostras avaliadas.

3.6. Ensaio *in vivo* em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

Os resultados relacionados ao estudo do potencial terapêutico de CLNFC podem ser observados na **Figura 30**. Como demonstrado, os grupos-controle S (solvente), e CLNBLANK não demonstraram atividade significativa ao ser comparado com o grupo controle crescimento (CL). Esses resultados demonstram que o solvente, na concentração e condição testadas, utilizado na suspensão dos fármacos livres e nanocarreador branco (CLNBLANK) não demonstram atividade antifúngica, corroborando com os resultados *in vitro* previamente discutidos e excluindo potencial interferência nos resultados dos tratamentos propostos.

Na condição testada, concentração de 12,15 mg/kg, o grupo FL não demonstrou redução significativa de UFC até último dia do teste, em comparação ao grupo controle crescimento. Por outro lado, os grupos FL+CUR e CLNFC demonstraram redução significativa de UFC logo após o primeiro dia de estudo a uma concentração de 7,07 mg/kg. Concentração menor do que a testada pelo grupo FL, indicando a otimização da atividade antifúngica pela associação de FL e CUR, corroborando com os resultados *in vitro* previamente avaliados.

No último dia do estudo, foi possível observar que a atividade antifúngica da combinação de FL e CUR foi mais expressiva quando dispersos na nanoestrutura (CLNFC). Isso indica que nanoestrutura foi capaz de otimizar o potencial da combinação proposta, o que corrobora com os resultados *in vitro* obtidos no presente trabalho, bem como com a otimização da atividade de IFAs por nanocarreamento, o que é amplamente descrito na literatura (ARAUJO et al., 2020a; OCHEKPE; OLORUNFEMI; NGWULUKA, 2009).

No estudo de Li et al., (2013) foi empregado um modelo de infecção de *Galleria mellonella* utilizando *C.albicans* em condições similares ao adotado pelo presente

trabalho. Neste trabalho foi avaliado o efeito antifúngico de alguns antifúngicos comerciais, incluindo fluconazol 16 mg/kg. De-Dong Li observou resultados entre 4 e 5 Log₁₀ UFC/larva nos grupos tratados com FLU, similar ao observado nos grupos tratados anfotericina B (6,4 mg/kg) após 12 dias de estudo. Desta forma, ao compararmos com os resultados obtidos no presente trabalho, nota-se uma atividade superior de CLNFC visto que a mesma aplicada a 7,07 mg/kg em um período de 5 dias apresentou 0,45 Log₁₀ UFC/larva.

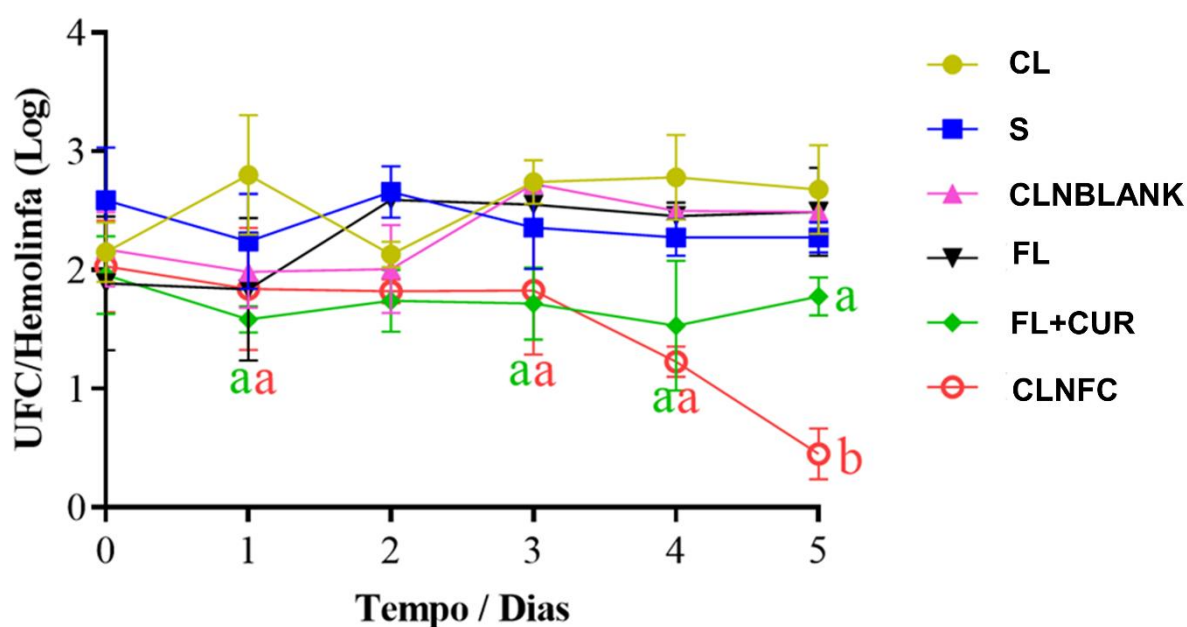


Figura 30. Tratamento *in vivo* em modelo alternativo de infecção de *G.mellonella* por *C.albicans*.

3.7. Viabilidade celular

Os resultados obtidos com o ensaio de viabilidade celular utilizando as linhagens RAW 264.7 (macrófagos murinos) e CRL-2616 (células epiteliais de mucosa vaginal humana) podem ser observados na **Tabela 18**.

Tabela 18. Viabilidade celular nas linhagens RAW 264.7 e CRL-2616. IC50= concentração do composto necessária para 50% de viabilidade.

Linhagem	Estatística	CUR	CLNC	CLNFC	Controle negativo
RAW 264.7	IC50 (µg/ml)	5232	5329	5498	6352
	Intervalo de confiança	3250-7235	3335-7988	3145-7455	4255-8933
CRL-2616	IC50 (µg/ml)	5832	5545	5799	6122
	Intervalo de confiança	2149-7198	4385-8323	3455-7144	4285-8736

Para análise do presente estudo, os critérios de citotoxicidade foram baseados nos parâmetros estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI). Segundo NCI, para uma amostra ser considerada inócua ao ser humano, em ensaios preliminares, a amostra deve apresentar IC50 > 1000 µg/mL (BAZAID et al., 2012).

Desta forma, seguindo os critérios do NCI e tendo em vista que as amostras testadas apresentaram IC50 > 1000 µg/mL, as formulações desenvolvidas bem como a solução de CUR podem ser consideradas inócuas. Os resultados observados corroboram com o encontrado na literatura, os quais indicam a baixa toxicidade de curcumina e de CLN(LIMA et al., 1982), em virtude de sua composição (SOUTO et al., 2020; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

3.8. Atividade anti-inflamatória

Tendo em vista que a sintomatologia associada a CVV está relacionada a processos inflamatórios e o potencial anti-inflamatório da CUR amplamente descrito na literatura, o presente trabalho buscou avaliar o potencial anti-inflamatório da CUR em CLN e na CLNFC (LIMA et al., 1982; MENON; SUDHEER, 2007).

A **Figura 31** mostra a avaliação dos níveis da citocina TNF-α em células tratadas com CLNC, CLNFC, CLNBLANK, curcumina em suspensão (1 g/L), controle negativo – células cultivadas no meio sem o tratamento, e controle positivo com células em

contato com LPS. A avaliação da citocina TNF- α foi realizada nos tempos 24, 48 e 72h. Conforme pode ser observado na **Figura 31**, foi possível verificar o sensível redução dos níveis da citocina produzida nos grupos tratados com solução das diferentes formulações, quando comparados ao grupo LPS. TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, um importante agonista da resposta inflamatória e presente na ativação da resposta inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; STRIETER; KUNKEL; BONE, 1993).

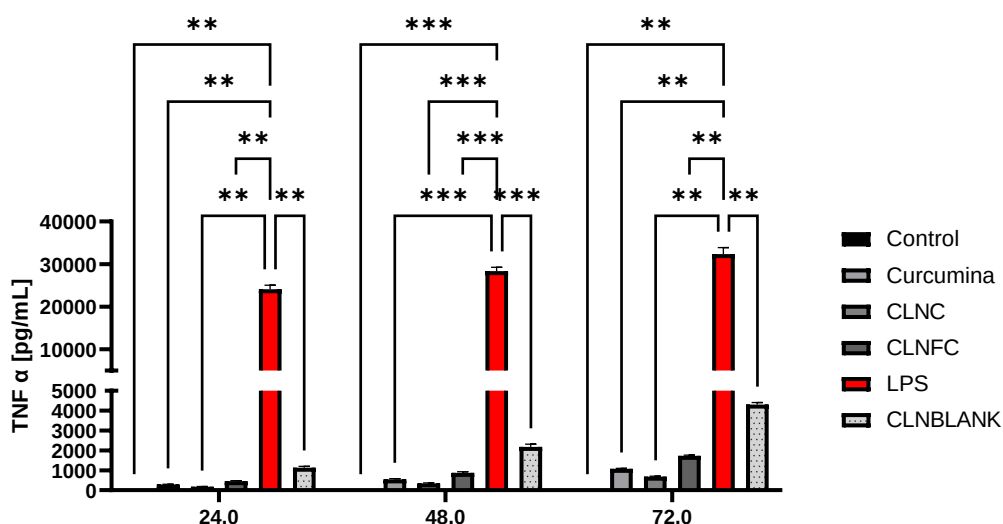


Figura 31. Níveis de produção da citocina TNF- α em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ($P < 0,001$, ANOVA).

A **Figura 32** mostra a avaliação dos níveis da interleucina IL-6. A avaliação de IL-6 foi realizada nos tempos 24, 48 e 72h. IL-6 é outra citocina que é liberada na durante a resposta inflamatória, sendo capaz de induzir secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, bem como fator de crescimento e diferenciação de linfócitos B (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Como pode ser observado na **Figura 32**, as amostras contendo CUR foram capazes de reduzir significativamente a produção de IL-6 em comparação ao grupo LPS.

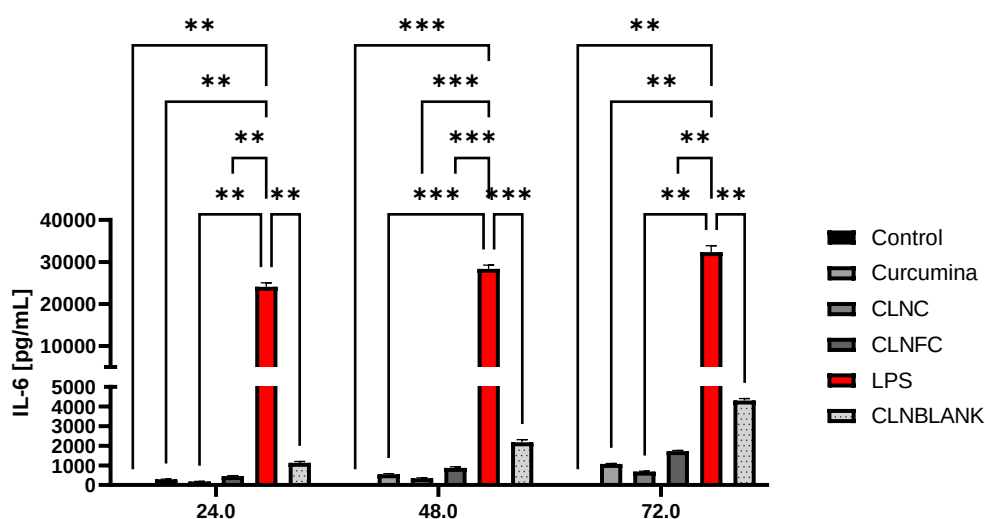


Figura 32. Níveis de produção da citocina IL-6 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações (P<0,001, ANOVA).

A **Figura 33** mostra a avaliação dos níveis da interleucina IL-2. A avaliação de IL-2 foi realizada nos tempos 24, 48 e 72h. A citocina IL-2 é produzida por células T e promove proliferação de linfócitos, macrófagos e células NK. IL-2 também é importante na diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 e Th2. Desta forma, IL-2 possui um papel importante tanto na indução como na resolução de respostas inflamatórias (HOYER et al., 2008). Assim como observado para TNF- α e IL-6, as amostras contendo CUR foram capazes de reduzir significativamente a produção de IL-2 em comparação ao grupo LPS.

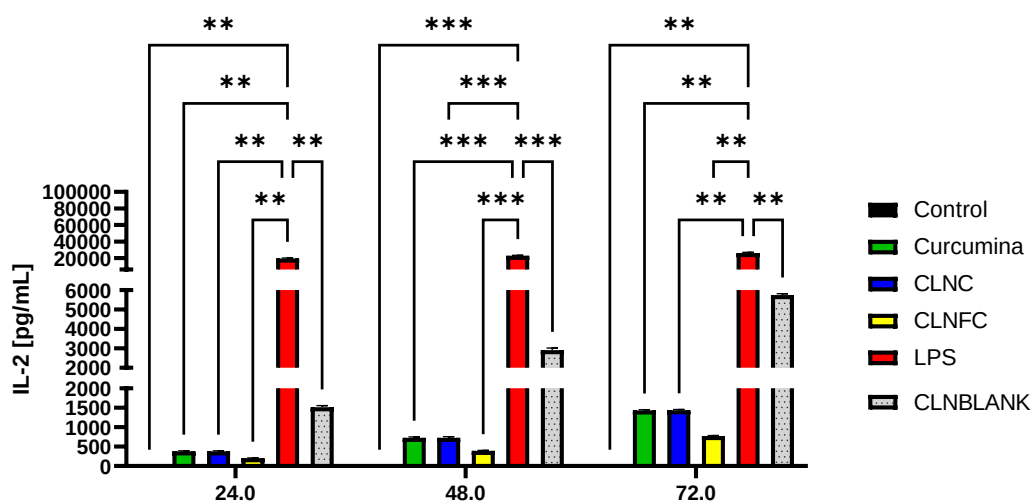


Figura 33. Níveis de produção da citocina IL-2 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ($P < 0,001$, ANOVA).

Por fim a **Figura 34** mostra a avaliação dos níveis da interleucina IL-10. A avaliação de IL-10 foi realizada nos tempos 24, 48 e 72h. Ao contrário das interleucinas previamente avaliadas, a IL-10 é conhecida como citocina anti-inflamatória capaz de suprimir o microambiente pró-inflamatório (CHATTERJEE et al., 2014). Como pode ser observado na **Figura 34**, inversamente proporcional ao observado pelas interleucinas previamente avaliadas, as amostras contendo CUR promoveram aumento significativo na secreção de IL-10.

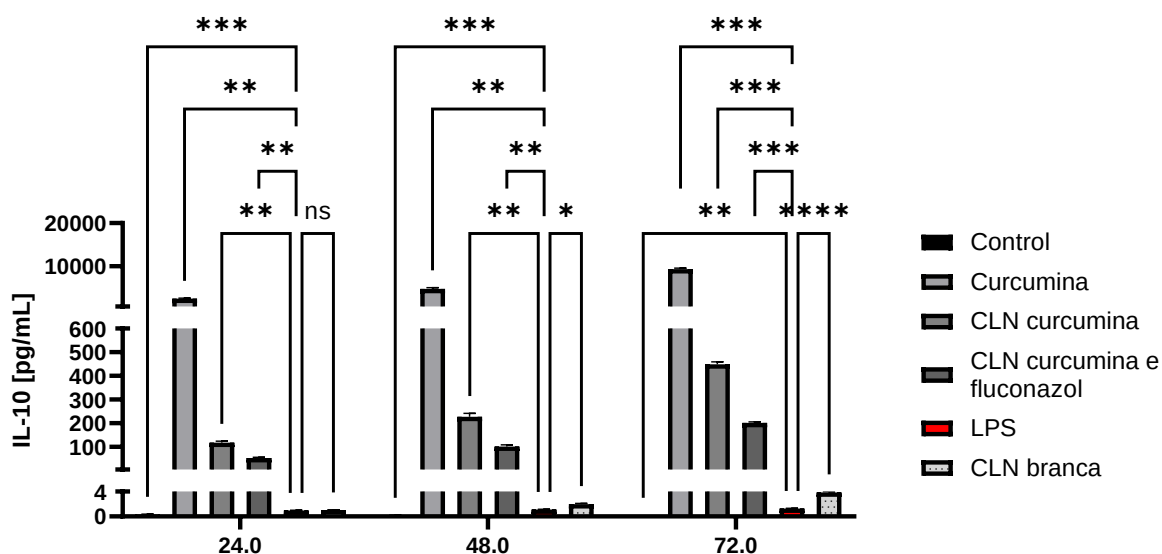


Figura 34. Níveis de produção da citocina IL-10 em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ($P < 0,001$, ANOVA).

Desta forma, considerando que as amostras contendo CUR promoveram supressão nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-2 com aumento na secreção de IL-10, sugere-se que CUR em suspensão e dispersa em CLN (CLNC e CLNFC) exibe um potencial anti-inflamatório significativo capaz de reduzir os sintomas de CVV associados a processos inflamatórios. Os resultados obtidos corroboram com os resultados observados na literatura, onde demonstram que a CUR é capaz de inibir o processo inflamatório em diferentes níveis, incluindo inibição de LPS e supressão dos níveis de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (LIMA et al., 1982; PANAHI et al., 2018).

4. Resumo de resultados – Avaliações *in vitro* e *in vivo*

O **CAPÍTULO 4** do presente estudo buscou compreender o potencial do tratamento proposto (CUR +FL) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi realizada a avaliação da CIM dos IFAs isolados bem como o impacto da sua combinação pelo estudo de *Checkerboard* em duas cepas *C.albicans* 18804 e *C.glabrata* 2001, e por

meio deste estudo foi possível observar CIM dentro do esperado para as amostras isoladas, sinergismo parcial para a combinação em *C.albicans* e potencial aditivo para *C.glabrata*.

Com base nesse resultado, as CLN e os hidrogéis foram desenvolvidos, e o impacto no potencial antifúngico foi avaliado por meio do CIM e CFM. Como resultado, as CLN apresentaram atividade superior em comparação aos IFAs em suspensão, enquanto os H-CLN demonstraram leve supressão desse potencial, sugere-se que esse perfil possa estar relacionado ao fato do hidrogel oferecer uma barreira física à liberação dos IFAs e ao contato das nanoestruturas com o microrganismo.

A fim de compreender o impacto da combinação nanoestruturada em biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata*, diferentes métodos foram utilizados para este fim. Como por exemplo, avaliação *in vitro* de filmes em formação e já formados, e estudo de microscopia confocal em biofilmes já formados. Os resultados obtidos demonstraram que CLNFC apresentou atividade significativa sobre essas estruturas.

Adicionalmente, o potencial citotóxico do sistema desenvolvido foi avaliado em linhagem de macrófago murino e de células epiteliais de mucosa vaginal, o que por sua vez indicaram que as amostras testadas são consideradas não citotóxicas de acordo com os critérios do NCI. A fim de avaliar o efeito da curcumina em CLN na resposta inflamatória responsável pela sintomatologia da CVV, o presente estudo avaliou o doseamento de interleucinas e citocinas, que por sua vez demonstrou redução significativa de espécies pro-inflamatórias e aumento de IL-10 com potencial anti-inflamatório. Sugerindo o potencial das amostras em agir contra os sintomas da CVV.

CAPÍTULO 5

Considerações finais

1. Considerações finais

O desenvolvimento do carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo curcumina (CUR) e fluconazol (FLU) foi realizado pela abordagem de QbD, a fim de obter um desenvolvimento racional baseado na qualidade. Desta forma, diferentes ferramentas foram aplicadas para contribuir com esse racional, como análise de risco prévia e determinação de *design space* pelo desenho experimental Box-Behnken (3³). Com base em critérios pré-estabelecidos, foi possível selecionar um CLN para dar seguimento ao estudo. Por meio de diferentes técnicas de caracterização, e considerando a seleção de uma CLN, foi possível obter uma nanossuspensão homogênea de diâmetro hidrodinâmico médio de 142,5 nm, com alta eficiência de encapsulação, liberação prolongada, índice de cristalinidade reduzido e forma esférica.

Visando a aplicação intravaginal e a alta escoabilidade de CLN, hidrogéis termorresponsivos foram desenvolvidos tendo como fase aquosa as CLN em estudo. Diferentes concentrações de polímero foram avaliadas tendo como critério o aumento de viscosidade sob estímulo térmico. Após obtenção de um hidrogel com responsividade térmica desejada, as características físicas do sistema foram avaliadas. Com o estudo foi possível observar características físicas diferentes de acordo com a CLN utilizada na fase aquosa.

A fim de avaliar o potencial antifúngico da combinação nanoestruturada de CUR e FLU, diferentes estudos *in vitro* foram conduzidos em células planctônicas e em biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata*. Com as avaliações foi possível observar sinergismo parcial para a combinação CUR+FL em *C.albicans* e potencial aditivo para *C.glabrata*. A avaliação de CLN em células planctônicas indicaram otimização do efeito combinatório com IFAs dispersos na nanoestrutura. Por outro lado, quando dispersos no hidrogel (H-CLN), foi observado supressão do potencial antifúngico, sugerindo que o hidrogel oferece uma barreira para liberação dos IFAs e para o

contato do CLN com o microrganismo. Estudos *in vitro* com biofilmes de *C.albicans* e *C.glabrata* demonstraram impacto significativo da combinação CUR+FL no desenvolvimento e em biofilmes já maduros, com otimização promovida pela dispersão em CLN. A avaliação do potencial antifúngico de CLNFC *in vivo* em modelo de *Galleria melonella*, corroborou com os resultados obtidos nos modelos *in vitro*.

A atividade antifúngica de CUR pode ser atribuída a diferentes mecanismos descritos na literatura. Sugere-se que a CUR possui efeito apoptótico promovido pela via de sinalização de ROS, e promove alteração de permeabilidade de membrana por interação com ergosterol, inibição do efluxo de H⁺ levando à acidificação intracelular e inibição dos níveis de TUP1 impedindo o desenvolvimento de hifas, o que impacta na formação de biofilmes. Tendo em vista o potencial da combinação CUR e FL sugere-se, com base em estudos presentes na literatura, que esse potencial possa estar relacionado ao mecanismo compartilhado por ambas moléculas na promoção do aumento de ROS intracelular, inibição de bomba de efluxo e redução da permeabilidade de membrana promovida pela CUR, favorecendo a ação de FLU. A otimização com a nanoveiculação de CUR e FL pode estar relacionado à alta área de superfície encontrada nas nanoestruturas, favorecendo o *uptake* celular.

O potencial citotóxico do CLNFC foi avaliado utilizando linhagem de macrófago murino e de células epiteliais de mucosa vaginal, como resultado foi possível observar que a amostra é considerada como inócua seguindo os critérios do NCI. Ainda, visando estudar o impacto no processo inflamatório causador dos sintomas relacionados a CVV, o doseamento de interleucinas e citocinas foi avaliado após o tratamento com CLNFC, e o mesmo indicou redução significativa de espécies pro-inflamatórias e aumento de interleucina com atividade anti-inflamatória sugerindo o potencial anti-inflamatório do CLNFC. Com base nos dados apresentados, o sistema

desenvolvido tem potencial no tratamento de CVV, visto as atividades antifúngica e anti-inflamatória demonstradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAZUDDIN et al. Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. **Fitoterapia**, v. 97, p. 1–14, 2014.
- AKA-ANY-GRAH, A. et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 296–303, 2010.
- ALEXANDER, N. J. et al. Why consider vaginal drug administration ? **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 1, p. 1–12, 2004.
- AMASYA, G.; INAL, O.; SENDEL-TURK, C. T. SLN enriched hydrogels for dermal application : Full factorial design study to estimate the relationship between composition and mechanical properties. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 228, p. 104889, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104889>.
- AMOURI, I. et al. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 499–505, 2011.
- ANDERSON, J. et al. Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 458–467, 1989.
- ANDERSON, M. R.; KLINK, K.; COHRSEN, A. CLINICIAN ' S CORNER Evaluation of Vaginal Complaints CLINICAL SCENARIOS. **Jama**, v. 291, n. 11, p. 1368–79, 2004.
- ANDRADE, J. T. et al. Efficacy of curcumin in the treatment of experimental vulvovaginal candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 4, p. 192–199, 2019.
- ANDRIOU, J. L. et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetricia**, v. 31, n. 6, p. 300–400, 2009.
- ARAUJO, V. H. S. et al. Nanosystems against candidiasis: a review of studies

performed over the last two decades. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 508-547, 2020a. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1803208>.

ARAUJO, V. H. S. et al. The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 602, n. May, p. 125070, 2020b.

ARAUJO, V. H. S. et al. Exploiting solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for drug delivery against cutaneous fungal infections. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 79-90, 2020c. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843399>.

ARAUJO, V. H. S. et al. Chitosan-based systems aimed at local application for vaginal infections. **Carbohydrate polymers**, v. 261, p. 117919, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117919>.

ASCIOGLU, S. et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 7–14, 2002.

BAHRAMI, M. A.; FARHADIAN, N. Experimental study and mathematical modeling for encapsulation of fentanyl citrate drug in nanostructured lipid carrier. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1263-1271, 2020.

BARBOSA, R. M. et al. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. **Journal of Physics: Conference Series. Anais**. v. 429, 012035, 2013.

DOI 10.1088/1742-6596/429/1/012035.2013.

BAZAID, S. A. et al. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of Conocarpus erectus L. **European J Med Plants**, v. 2, n. 2, p. 93–112, 2012.

BEHBAHANI, E. S. et al. Curcumin loaded nanostructured lipid carriers : in vitro digestion and Abbreviations : **Polyhedron**, 2019.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

BEZERRA, M. P.; RODRIGUES, L. N. C. Quality By Design (Qbd) Como Ferramenta Para Otimização Dos Processos Farmacêuticos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 5–12, 2017.

BHAT, A. et al. Benefits of curcumin in brain disorders. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 666–689, 2019.

BHATIA, N. K. et al. Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. **RSC Advances**, v. 6, p. 103275–103288, 2016.

BHESANIYA, K.; NANDHA, K.; BALUJA, S. Thermodynamics of fluconazole solubility in various solvents at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, n. 3, p. 649–652, 2014.

BLOKHINA, S. et al. Experimental investigation of fluconazole: Equilibrium solubility and sublimation. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 151, p. 106243, 2020.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.

CARLSON, R. Design of Experiments, Principles and Applications. **Journal of Chemometrics**, v. 15, n. 5, p. 495–496, jun. 2001.

CAROLINA ALVES, R. et al. A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the Determination of Curcumin in Biological and Pharmaceutical Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 138–149, 2019.

- CARVALHO, G. C. et al. Prevalence of Vulvovaginal Candidiasis in Brazil: A systematic review. **Medical Mycology**, v. 59, n. 10, 2021.
- CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: A review of mechanisms. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 69–77, 2004.
- CHATTERJEE, P. et al. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 253, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>.
- CHEN, H. et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Control. Release**, v. 110, n. 2, p. 296–306, 2006.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, 2006.
- CORREA, G. et al. Highlights in poloxamer-based drug delivery systems as strategy at local application for vaginal infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 602, p. 120635, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120635>.
- CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 124–132, 2011.
- DA SILVA, F. S. et al. Anti-biofilm activity and in vitro biocompatibility of copper surface prepared by cold gas spray. **Surface and Coatings Technology**, v. 411, p. 126981, February, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.126981>.
- DARWESH, B.; ALDAWSARI, H. M.; BADR-ELDIN, S. M. Optimized chitosan/anion polyelectrolyte complex based inserts for vaginal delivery of fluconazole: In vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 2018.

DE ARAUJO PEREIRA, Regina R.; BRUSCHI, Marco L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n. 6, p. 643–652. 2012. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.623355>.

DE CARVALHO, N. S. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecções que causam corrimento vaginal. **Epidemiologia e Serviços de Saude**, v. 30, n. Special issue 1, 2021.

DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J. et al. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. **Current Fungal Infection Reports**, v. 15, n. 1, p. 32–40, 2021.

DE RYCKER, M. et al. Setting Our Sights on Infectious Diseases. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 3–13, 2020.

DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e339–e347, 2018.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 1–18, 2014.

DONDERS, G. G. G.; SOBEL, J. D. Candida vulvovaginitis : A store with a butterfly and a show window. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 70-72, 2017. <https://doi.org/10.1111/myc.12572>.

DONG, H. H. et al. Synergistic antifungal effects of curcumin derivatives as fungal biofilm inhibitors with fluconazole. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 97, n. 5, p. 1079–1088, 2021.

DOS SANTOS, A. M. et al. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 590, p.

119867, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119867>.

DOS SANTOS RAMOS, M. A. et al. Intravaginal delivery of syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland fraction based on a nanoemulsion system applied to vulvovaginal candidiasis treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1072–1089, 2019.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: a Review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 80–102, 2012.

EL-HAMMADI, M. M.; ARIAS, J. L. Nanomedicine for vaginal drug delivery. In: **Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines**. Academic Press, 2021. Chapter 11, p. 235–257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820466-5.00015-6>.

ELLIOTT, P. et al. Quality by design for biopharmaceuticals: a historical review and guide for implementation. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 105–122, 2013.

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

ESPOSITO, E. et al. Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. **Materials Science and Engineering C: Materials for biological applications**, v. 33, n. 1, p. 411–418, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.007>.

FELIX, T. C.; DE BRITO RÖDER, D. V. D.; DOS SANTOS PEDROSO, R. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 2, p. 133–141, 2019.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 71, Suppl 1, p. S21–S27, dez. 2000.

FREDLUND, H. et al. Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive

Age – Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible ?

PLoS One, v. 8, n. 4, p. e60670. doi: 10.1371/journal.pone.0060670.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN(TM)) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125-132, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00074-5).

GALLATE, E. et al. Sumit Mukherjee 1,2. p. 1–21, [s.d.]. Encontrei como nome autor. verifique...

GARCÊS, A. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use : A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, n. September 2017, p. 159–167, 2018.

GARCIA-GOMES, A. S. et al. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 26–32, 2012.

GERA, M. et al. Nanoformulations of curcumin : an emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680–66698, 2017.

GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2010.

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, n. 2, p. 186–193, 2010.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces**

A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, 2008.

HERMANS, P. H. **Colloid Science**. New York: éd. HR Kruyt, 1949.p. 483-494.

HOYER, K. K. et al. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 19–28, 2008.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 301–313, 2005.

IKUMA, K.; DECHO, A. W.; LAU, B. L. T. When nanoparticles meet biofilms - Interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May, p. 1–6, 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH Q9: Quality Risk Management. **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Quality Risk Management Q9**, n. November, p. 23, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH Q8 (R2): Pharmaceutical Development. **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, v. 8, n. August, p. 28, 2009.

JAVAN, N. et al. Synergistic Antiproliferative Effects of Co- nanoencapsulated Curcumin and Chrysin on MDA- MB-231 Breast Cancer Cells Through Upregulating miR-132 and miR-502c Synergistic Antiproliferative Effects of Co-nanoencapsulated Curcumin and miR-502c. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 7, p. 1201-1213, 2019.

JAZULI, I. et al. Optimization of Nanostructured Lipid Carriers of Lurasidone Hydrochloride Using Box-Behnken Design for Brain Targeting: In Vitro and In Vivo Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3082-3090, 2019.

KALAN, L. R. et al. International Journal of Antimicrobial Agents Targeting biofilms of multidrug-resistant bacteria with silver oxynitrate. **International Journal of**

Antimicrobial Agents, v. 49, n. 6, p. 719–726, 2017.

KELIDARI, H. R. et al. Improved yeast delivery of fluconazole with a nanostructured lipid carrier system. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 83–88, 2017.

KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A.; IBEZIM, E. C. Novel solidified reverse micellar solution-based mucoadhesive nano lipid gels encapsulating miconazole nitrate-loaded nanoparticles for improved treatment of oropharyngeal candidiasis. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 6, p. 592–609, 2017.

KHAN, N. et al. Fitoterapia Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 434–440, 2012.

KOOPMANS, R. J.; AGGELI, A. Nanobiotechnology - quo vadis? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 327–334, 2010.

KOVÁCS, A. et al. Development of nanostructured lipid carriers containing salicylic acid for dermal use based on the Quality by Design method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 246–257, 2017.

KUDARHA, R. et al. Box-Behnken study design for optimization of bicalutamide-loaded nanostructured lipid carrier: Stability assessment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 5, p. 608–618. 2015.

LEE, W.; LEE, D. G. An Antifungal Mechanism of Curcumin Lies in Membrane-Targeted Action Within *Candida albicans*. **IUBMB Life**, v. 66, n. 11, p. 780–785, 2014
<https://doi.org/10.1002/iub.1326>.

LEROUX, J.; RUEL-GARIE, E. In situ-forming hydrogels — review of temperature-sensitive systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 409–426, 2004.

LESTARI, M. L. A. D.; INDRAYANTO, G. Curcumin. In: BRITTAIN, Harry G. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Academic Press,

2014. Chapter Three, v. 39, p. 113–204. ISBN: 978-0128001738.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00003-9>.

LI, D. D. et al. Using galleria mellonella-candida albicans infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 2013.

LI, X. et al. Synergistic effects of liposomes encapsulating atorvastatin calcium and curcumin and targeting dysfunctional endothelial cells in reducing atherosclerosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 649–665, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S189819p.649-665>, 2019.

LIMA ET AL. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 1, p. p.173-203, 1982.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, 2004.

LINHARES, I. M. et al. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 2, p. 120.e1-120.e5, 2011.

MADANE, R. G.; MAHAJAN, H. S. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1326–1334, 2016.

MARCHAIM, D. et al. Fluconazole-Resistant Candida. v. 120, n. 6, p. 1407–1414, 2012.

MARENA, G. D. et al. Galleria mellonella for systemic assessment of anti-Candida

auris using amphotericin B loaded in nanoemulsion. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 151023, 2022.

MARTINS, C. V. B. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 337–339, 2009.

MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Microencapsulation of Mentha spicata essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops and Products**, v. 154, n. June, p. 112694, 2020.

MENDES, A. I. et al. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 755–763, 2013.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 595, p. 105-125, 2007. doi: 10.1007/978-0-387-46401-5_3.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.

MOHAMMED, S. et al. Thermosensitive hydrogel as an in situ gelling antimicrobial ocular dressing. **Materials Science & Engineering C**, v. 78, p. 203–209, 2017.

MORELLO, G. et al. A thermo-sensitive chitosan/pectin hydrogel for long-term tumor spheroid culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 274, n. August, p. 118633, 2021.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NETT, J. E. Special issue: Candida and candidiasis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p.

4–6, 2018.

NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 11, p. 2032–2046, 2013.

NUR, A. et al. Preparation and in vitro / in vivo evaluation of flurbiprofen nanosuspension- based gel for dermal application. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 155, n. August, p. 105548, 2020.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49–79, 2000.

OCHEKPE, N. A.; OLORUNFEMI, P. O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and drug delivery part 2: Nanostructures for drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 275–287, 2009.

OKUNGBOWA, F. I.; ISIKHUEMHEN, O. S.; DEDE, A. P. O. The distribution frequency of Candida species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. **Rev Iberoam Micol**, v. 20, p. 60–63, 2003.

ORGOVÁN, G.; KELEMEN, H.; NOSZÁL, B. Protonation and β -cyclodextrin complex formation equilibria of fluconazole. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 84, n. 3–4, p. 189–196, 2016.

PANAHI, Y. et al. Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: A review of cellular and metabolic mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 141–152, 2018.

PARDESHI, C. et al. Solid lipid based nanocarriers: An overview. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 4, p. 433–472, 2012.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751–760, 2007a.

PEER, D. et al. 84 Nat nanotech 2007 R Langer Nanocarriers as an emerging platform

for cancer therapy.pdf. p. 751–760, 2007b.

PEULEN, T. O.; WILKINSON, K. J. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 3367–3373, 2011.

POPESKI-DIMOVSKI, R. Work of adhesion between mucin macromolecule and calcium-alginate gels on molecular level. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 146–149, 2015.

QAYYUM, S.; KHAN, A. U. Nanoparticles: Vs. biofilms: A battle against another paradigm of antibiotic resistance. **MedChemComm**, v. 7, n. 8, p. 1479–1498, 2016.

RAKHOLIYA, K. D.; KANERIA, M. J.; CHANDA, S. V. Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties. In: RAI, Mahendra Kumar; KON, Kateryna Volodymyrivna. (Editor). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. Academic Press, 2013. Chapter 11, p. 165-179. ISBN: 978-0123985392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00011-2>.

RAMOS, M. A. DOS S. 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*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7455–7465, 2015.

RATHBONE, HADGRAFT, R. AND L.; BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. In: BRUSCHI, M. L. (Ed.). **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Academic Press, 2015. Chapter 5, p. 63–82. ISBN: 9780081000922, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>.

REZAEI, A. et al. A study on the release kinetics and mechanisms of vanillin incorporated in almond gum/polyvinyl alcohol composite nanofibers in different

aqueous food simulants and simulated saliva. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 6, p. 442–447, 2016.

RODERO, C. F. et al. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 4491–4504, 2018.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Bio fi lms and vulvovaginal candidiasis. v. 174, n. May 2018, p. 110–125, 2019a.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, n. May 2018, p. 110–125, 2019b.

ROSSI, S. et al. Comparison of poloxamer-and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 3, p. 352–360, 2014.

RUEL-GARIÉPY, E. et al. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1–2, p. 89–98, 2000.

SAEDI, A. et al. Preparation and Characterization of Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery System: Influence of Liquid Lipid Types on Loading and Cytotoxicity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 216, n. September, p. 65–72, 2018.

SANGAMITHRA, V. et al. Candida infections of the genitourinary tract. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 6, n. 10, p. 1111–1115, 2013.

SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Review Analytical Techniques for Quantification of Amorphous / Crystalline Phases in Pharmaceutical Solids. v. 95, n. 8, p. 1641–1665, 2006.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Cancer Nanotechnology**, v. 4, n. 1–3, p. 13–20, 2014.

- SHARIATI, A. et al. Natural Compounds: A Hopeful Promise as an Antibiofilm Agent Against Candida Species. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. July, p. 1–20, 2022.
- SHARMA, M. et al. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in Candida albicans. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 6, p. 391–404, 2010.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SHIOZAWA, P. et al. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa**, v. 52, n. 2, p. 48–50, 2007.
- SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 3, n. 3, p. 159–175, 1994.
- SINGHVI, G.; SINGH, M. REVIEW: IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 2, n. 1, p. 77-84, Jan.-Mar 2011.
- SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15–21, 2016.
- SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1837–1842, 2008.
- SOUTO, E. B. et al. SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 17, n. 3, p. 357–377, 2020.
- SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: A review. **International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction**, v. 24, n. 4, p. 537–543, 2013.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; BONE, R. C. Role of tumor necrosis factor alpha in disease states and inflammation. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 10, Suppl. p. S447-S463, Oct. 1993. doi: 10.1097/00003246-199310001-00006.

SUHALIM, J. L. et al. Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 8, p. 1988-1995, 2012. doi: 10.1016/j.bpj.2012.03.016.

TAMURA, N. K. et al. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91–3, 2007.

TOFANI, R. P.; SUMIRTAPURA, Y. C.; DARIJANTO, S. T. Formulation, characterisation, and in vitro skin diffusion of nanostructured lipid carriers for deoxyarbutin compared to a nanoemulsion and conventional cream. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 4, p. 634–645, 2016.

TSAO, S. M.; YIN, M. C. Enhanced inhibitory effect from interaction of curcumin with amphotericin B or fluconazole against *Candida* species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 8, n. 3, p. 208–212, 2000.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. September, 2017, p. 199–209, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012>.

UPPULURI, P.; KHAN, AFSHIN; EDWARDS, John E, Current Trends in Candidiasis. In: PRASAD, Rajendra, (Editor). **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology**. 2nd. ed. Springer, 2017. Chapter 2, p. 5–23. Online ISBN; 978-3-319-50409-4.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4_2.

VASCONCELOS, C. N. E. T. O. D. E. et al. Estudo Comparativo Entre Terapia Oral E Local No Tratamento De Corrimentos Vaginais: Candidíase , Tricomoniase E Vaginose Bacteriana Comparative Study Between Oral and Topic Terapy of Vaginal Discharge Caused By Candidiasis , Tricomoniasis and Bacterian. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 15, n. 1, p. 123–128, 2016.

WAGHULE, T. et al. Voriconazole loaded nanostructured lipid carriers based topical delivery system: QbD based designing, characterization, in-vitro and ex-vivo evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, n. February, p. 303–315, 2019.

WANG, C.; LI, J.; YAO, F. Application of Chitosan-Based Biomaterials in Tissue Engineering. In: YAO, K.; LI, J.; YAO, F.; YN, Y. (Editor). **Chitosan-Based Hydrogels**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. Chapter 9, p. 407-468. ISBN: 978-0429104480.

WANG, Q. et al. Updates on thermosensitive hydrogel for nasal , ocular and cutaneous delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, n. January, p. 86–101, 2019.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 2014.

WESTESEN, K.; SIEKMANN, B.; KOCH, M. H. J. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 93, n. 1-3, p. 189-199, 1993. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90177-H](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90177-H).

WILLIAMS, R. O.; MAHAGUNA, V.; SRIWONGJANYA, M. Characterization of an

inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, n. 3, p. 355–360, 1998.

YANG, M. et al. A Modular Coassembly Approach to All-In-One Multifunctional Nanoplatfrom for Synergistic Codelivery of Doxorubicin and Curcumin. **Nanomaterials**, v. 8, n. 3, p. 167, 2018. <https://doi.org/10.3390/nano8030167>.

ZHAO, X. et al. Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 257–270, 2014.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ANEXO 1

RESEARCH ARTICLE

Validation of an innovative analytical method for simultaneous quantification of curcumin and fluconazole using high-performance liquid chromatography from nanostructured lipid carriers

Victor Hugo Sousa Araujo¹  | Lígia de Souza Fernandes² | Leidiana Rocha dos Reis¹ | Gabriela Corrêa Carvalho¹ | Maria Virginia Scarpa² | Marlus Chorilli¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Brazil

² Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Brazil

Correspondence

Marlus Chorilli, Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.
Email: marlus.chorilli@unesp.br

Funding information

FAPESP; Sao Paulo Research Foundation, Grant/Award Numbers: #2019/26821-7, #2019/10261-2; CAPES; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001

Abstract

Vulvovaginal candidiasis is a public health problem with a high incidence among female patients. Currently, there is an increase in the identification of *Candida* spp. resistant to current therapy, making it necessary to search for new therapeutic alternatives. The synergistic potential of curcumin with fluconazole is described in the literature. However, due to its high lipophilicity, it is necessary to use drug-delivery systems to adequately explore its potential, among which is the nanostructured lipid carrier. However, to date, there is no validated method of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of fluconazole and curcumin in the literature. Thus, the present work developed a high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of fluconazole and curcumin co-encapsulated in nanostructured lipid carrier which was validated according to the International Conference on Harmonization (Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Q2 (R1) and the Food and Drug Administration - Guidance for Bioanalytical Method. The method was applied to determine the encapsulation efficiency and drug-loading of curcumin and fluconazole in nanostructured lipid carriers. The developed method proved to be selective, precise, accurate, and robust for the simultaneous determination of both drugs, enabling the quantification of encapsulation efficiency and drug-loading of curcumin and fluconazole in nanostructured lipid carriers.

KEYWORDS

curcumin, fluconazole, nanostructured lipid carriers, simultaneous detection

Article Related Abbreviations: CUR, curcumin; FDA, Food and Drug Administration; FL, fluconazole; ICH, International Conference on Harmonization; NLC, nanostructured lipid carrier; OLSM, ordinary least squares method; RS, resolution; VVC, vulvovaginal candidiasis

1 | INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a disease which signs and symptoms are caused by inflammatory processes resulting from the presence of *Candida* spp. [1–5]. After

bacterial vaginosis, VVC is the most common cause of vaginitis and it is estimated that around 70–75% of women will have this disease at some point in their lives [6–8]. The treatment of VVC includes topical and oral administration of antimycotic agents, and oral administration of azole agents is the most prescribed [9–12]. However, this group of drugs has a range of adverse effects and the number of strains resistant to these alternatives is growing.

Fluconazole (FL) is a triazole drug and its mechanism of action involves the inhibition of 14 α -sterol demethylase, interfering with ergosterol synthesis and altering cell permeability [13]. FL has lower toxicity than amphotericin B, and favorable pharmacokinetics, which has contributed to its wide therapeutic use [13]. However, there is an increase in clinical isolates of *C.albicans* resistant to this drug, in addition to an increase in the incidence of VVC caused by non-*albicans* species, which are naturally resistant to the azole class [13,14]. Thus, it is necessary to search for new effective therapeutic strategies, reducing adverse effects.

Diferuloilmethado or curcumin (CUR) is found in the phytochemical profile of *Curcuma longa*, popularly known as turmeric [15,16]. This molecule has been attracting the attention of the scientific community due to its wide bioactivity, for which it was possible to observe broad-spectrum antimicrobial activity, including antibacterial, antiviral, antifungal activities; in addition to anti-oxidant and anti-inflammatory activity [17].

Garcia-Gomes et al. [18] noted the synergistic potential between CUR and FL against FL-resistant clinical isolates of *C.albicans*. However, both biomolecules are lipophilic, which makes it necessary to use drug delivery systems to adequately explore their potential. As previously described by our group, nanoparticles are drug delivery systems that demonstrate to be a promising alternative for the treatment of candidiasis [19].

Among the NPs, there are the nanostructured lipid carriers (NLC), which are considered the second generation of solid lipid nanoparticles. NLCs present in its composition liquid lipid (oil) in addition to solid lipid at room temperature – structurally responsible for the organization of the particle [20–24]. The partial replacement of solid lipid by oil promotes an increase in the structural disorganization of the non-polar core of the nanoparticle, promoting greater storage capacity for non-polar drugs and preventing its expulsion.

HPLC is a separation technique that has high efficiency and versatility, and when coupled to a detector it is used for quantitative determinations [25]. Furthermore, HPLC is a very sensitive technique and is extensively used in analytical determinations, and is widely used for the quantification of drugs delivered by nanostructures [26,27]. This method must be precise, accurate, and robust. Thus, vali-

dation is used to demonstrate that the analytical technique provides reliable results through a systematic evaluation of the method [25]. Several methods are found in the literature for the quantification of CUR [28–30] and FL [31–34] by HPLC. However, to date, there is no simple, fast and sensitive analytical method for the simultaneous quantification of FL and CUR in the literature, neither in solution nor in nanostructures.

Thus, this study aims to develop and validate a method for simultaneous quantification of FL and CUR in NLC by HPLC, to assess the potential of this nanocarrier to perform the co-delivery of both drugs. The method was validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) (Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) – Q2 (R1) and the Food and Drug Administration (FDA) - Guidance for bioanalytical method [35,36].

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemical and reagents

Cholesterol, Tween 20, and Castor Oil (Merck, Germany). The myristyl myristate (Crodamol) was kindly donated by Croda (Brazil). Curcumin (INLAB, Brazil) and FL (APIChem, China). HPLC grade ACN and HPLC Grade acetic acid (JTBaker, Brazil).

2.2 | Preparation of reference standard solution

The CUR stock solution was prepared using ~10 mg of the biomolecule in a 25 mL flask, completing a volume with ACN and obtaining a concentration of 400 μ g/mL. While for the preparation of the FL stock solution, ~10 mg of the drug was used and deposited in a 10 mL flask, obtaining a concentration of 1000 μ g/mL. Calibration curves were prepared at concentrations of 20, 18, 16, 14, 12, 10, and 8 μ g/mL of CUR, and 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 μ g/mL of FL, from the addition of the necessary volume of the stock solution of both drugs in a 10 mL flask in ACN. All solutions were filtered through a 0.45 μ m Polytetrafluoroethylene filter (Milipore) before injection. Tests were performed in independent triplicates.

2.3 | HPLC system and chromatographic conditions

A Waters™ e2695 liquid chromatography with a PDA/UV-visible detector was used. The mobile phase was

determined based on the studies by Fonseca-Santos et al. [30], Abdel-Moety et al. [32], and Khorshidi et al. [37], with modifications. The detector was set to 261 nm and the peak areas were automatically integrated using Empower software. The selection of the wavelength for detection (261 nm) of FL was made based on that described in the Brazilian Pharmacopoeia monograph [38] and based on previous studies, as well as on the ability of CUR to be detected at this wavelength [32,39]. The Zorbax Eclipse Plus C-18 column (4.6 × 250 mm, 5 µm particle size) Agilent Technologies was used for chromatographic separation with a mobile phase consisting of ACN and deionized water acidified with 2% acetic acid (60:40 v/v), in isocratic mode, a flow rate of 1.4 mL/min, and injection volume of 20 µL. The analysis was performed at room temperature (25 ± 1°C). The mobile phase components were previously filtered on 0.45 µm filters and subsequently degassed for 30 min.

2.4 | Validation of HPLC method

The method was validated according to the ICH (Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Q2 (R1) and the FDA - Guidance for Bioanalytical Method to determine the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy, LOD, LOQ, and robustness [35,36].

2.4.1 | System suitability test

The system suitability test was performed using the midpoint of the curves (14 µg/mL of FL and 35 µg/mL of CUR) by quintuplicate injections. The parameters evaluated were a capacity factor, relative retention, resolution, tail factor, and column efficiency, according to the 1994 FDA chromatographic method validation guide [36].

2.4.2 | Linearity

Linearity was evaluated by developing three analytical curves, determined by analyzing seven concentration levels on different days, in independent triplicate. The working ranges used in the present study were prepared at concentrations of 20, 18, 16, 14, 12, 10, and 8 µg/mL of CUR, and 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 µg/mL of FL. Linearity was evaluated by visual analysis of the response as a function of analyte concentration, evaluation of data homoscedasticity (Cochran test), regression statistics (correlation coefficients and determination), straight

equation obtained by the ordinary least squares method, and evaluation of the significance of the angular and linear coefficients. The statistical study was used through the analysis of homoscedasticity and one-way ANOVA with $\alpha = 95\%$.

2.4.3 | Precision

The intra-day repeatability precision was determined by the agreement of the results obtained with six independent analyses of the solutions of 14 µg/mL of CUR and 35 µg/mL of FL (midpoint of the curves). To assess the inter-day precision, this procedure was performed again and the agreement of the results obtained on two different days was evaluated. The RSD was calculated based on the series of measurements performed.

2.4.4 | Accuracy

Accuracy was assessed by recovering the analytes in the samples by adding known concentrations of CUR (20, 14, and 8 µg/mL) and FL (50, 35, and 20 µg/mL) to the empty NLC solution contemplating the linear range. The samples were prepared in independent triplicates and the recovery percentage was determined as the amount of drug recovered concerning the added amount expressed as a relative percentage, as expressed in Equation (1), followed by determination of the RSD.

$$PR = (MEC/TC) \times 100 \quad (1)$$

Where, MEC represents the mean of the experimental concentration, and TC represents the theoretical concentration.

2.4.5 | LOD and LOQ

LOD and LOQ were determined using the mean values of three independent analytical curves based on the standard deviation of the response and the slope of the curve obtained by the linear regression model, according to the following Equations (2) and (3).

$$LOD = 3.3 (\sigma/S) \quad (2)$$

$$LOQ = 10 (\sigma/S) \quad (3)$$

where σ represents the standard deviation of the y-intercept obtained with linear regression and S indicates the slope of the regression line.

TABLE 1 Variables used in the robustness study

Variables	Levels
Wavelength	261 nm (A)
	260 nm (a)
Acidifier concentration	2.0% (B)
	1.9% (b)
Proportion of mobile phase (acidified water:ACN)	40:60 (C)45:55 (c)
Different batches of the chromatographic column	Zorbax Eclipse Plus C-18, Agilent Technologies (D)
	Zorbax Eclipse XDB C-18, Agilent Technologies (d)
Dissolution method	Manual (E)
	Ultrassom, 5 min (e)
Oven temperature	25°C (F)
	26°C (f)
Mobile phase flow	1.4 mL/min (G)
	1.3 mL/min (g)

Uppercase letters represent nominal analysis conditions and lowercase letters represent deliberate changes employed in the study.

TABLE 2 Combination of various levels for the preparation of each sample

Variables	Samples							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	A	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g

2.4.6 | Robustness

To verify whether the method withstands small analytical variations, the method proposed by Youden and Steiner [40] was used. Eight samples were analyzed, varying different parameters (Tables 1 and 2). Percentages of recovery for each of the samples were calculated. The variables used in this study, as well as the studied combinations, are described in Tables 1 and 2, respectively.

2.4.7 | Selectivity

The selectivity was determined by the chromatograms obtained after analysis of the free-drugs NLC solution, pre-

viously dissolved with ACN at a ratio of 1:10 v/v and filtered through a 0.45 μ m PTFE filter. Additionally, the stress test was used to verify if the validated method would be able to adequately quantify the analytes in the presence of possible degradation products. For this purpose, using concentrations of 35 μ g/mL of FL and 14 μ g/mL of CUR, the samples were exposed to solutions of NaOH (0.1 M), HCL (0.1 M), and H₂O₂ (0.3 M) for 1 h. The samples were also subjected to photolysis exposed to UV light for 1 h.

2.5 | Application of the method

2.5.1 | Preparation of NLC

NLCs were prepared by the hot shear homogenization method, as previously described by Araujo et al [28]. The oil phase (cholesterol, myristyl myristate, Tween 20, and castor oil) and aqueous phase (deionized water) were heated separately at 90°C, to obtain the nanostructure with the drugs (NLC_{FC}) the biomolecules were dispersed in the oil phase. After complete fusion of cholesterol, the aqueous phase was poured under the oil with followed by shearing in Ultra-Turrax IKA (Staufen, Germany) at a rotation of 10 000 rpm for 5 min. Subsequently, the formed pre-emulsion was subjected to gentle magnetic stirring until the system was cooled to room temperature and subsequent formation of NLCs.

2.5.2 | FL and CUR encapsulation efficiency by NLC

The samples were centrifuged at 14 000 rpm for 30 min at room temperature, then the supernatant containing the nanostructures was collected and diluted in ACN, promoting the disruption of the nanosystem and release of drugs kept inside. Subsequently, the solution formed was filtered through a 0.22 μ m Polytetrafluoroethylene filter, and the quantification was performed by HPLC, according to the previously validated analytical method and in triplicate. Encapsulation efficiency and drug-loading were calculated according to Equations (4) and (5).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | System suitability parameters

The chromatographic system demonstrated suitability for the quantification of CUR and FL simultaneously. The FL had a retention time of 2.63 ± 0.04 min and a CUR of 6.04 ± 0.13 min. The resolution (RS) is the parameter

TABLE 3 Statistical analysis performed on linearity

Parameters	Fluconazole	Curcumin
Visual evaluation	Apparent linear relationship	Apparent linear relationship
Homoscedasticity (Cochran Test)		
Calculated <i>C</i>	0.528	0.450
Tabuled <i>C</i>	0.616	0.561
Result	Homoscedastic	Homoscedastic
Regression Statistics		
Correlation coefficient (<i>r</i>)	0.9994	0.9995
Determination coefficient (<i>r</i> ²)	0.9988	0.9990
Slope Significance (<i>F</i> -test, ANOVA)		
Calculated <i>F</i>	3707.49	11302.74
Tabuled <i>F</i>	4.49	4.38
Result	Slope is non-zero	Slope is non-zero
Significance of the intercept (<i>T</i> -test)		
Calculated <i>T</i>	0.580	−1.509
Tabulated <i>T</i>	2.120	2.093
Result	Intercept equal to zero	Intercept equal to zero

that indicates how far two peaks are separated, the resolution between the FL and CUR peaks showed RS of 5.82 ± 0.217 , which indicates a significant separation between the peaks, as the FDA recommends $RS > 2$ [36]. The tail factor (*T*) was also calculated as the precision of the method can be affected by the tailing of the peak, since the integrator may find it difficult to integrate the peak with the tail. The *T* obtained for FL was 0.996 ± 0.01 and CUR of 1.01 ± 0.03 , considering that the indicated is $T \leq 2$ [36], the peaks presented adequate symmetry.

3.2 | Method validation

3.2.1 | Linearity

Linearity indicates the ability of the analytical method to provide results directly proportional to the concentration of the analyte. For the evaluation of this parameter, visual analysis, verification of the homoscedasticity of the data (Cochran test), evaluation of the angular coefficient with the *F*-test (analysis of variance (ANOVA)), and significance of the intercept were performed. As described in Table 3, it is observed that for both biomolecules the absorbances as a function of concentrations show an apparent linear relationship, with homoscedasticity (calculated *C* < critical *C*), high correlation and determination factor, with an angular coefficient different from zero ($F_{\text{calculated}} > F_{\text{tabulated}}$), and intercept equal to zero (calculated *T* < tabulated *T*). The analytical curves obtained for FL and CUR are shown in Figure 1 and its chromatograms in Figure 2.

3.2.2 | Sensitivity

The LODs calculated for FL and CUR were 2.10 and 0.83 $\mu\text{g/mL}$ respectively, while the LOQs calculated for FL and CUR were 6.38 and 2.5, respectively, which shows that the method can identify and quantify analytes even at low concentrations (Table 4).

3.2.3 | Precision

The quantification of analytes at concentrations equivalent to the 100% point of the analytical curves was carried out independently ($n = 6$) on the same day (intra-day precision), as well as on two different days (inter-day precision), after which the RSD was calculated (%RSD) of each experiment. As seen in Table 4, %RSD values were less than 2% intra-day and less than 5% inter-day, confirming the precision of the method [35,36,41].

3.2.4 | Accuracy

Accuracy was evaluated by the percentage of recovery of analytes at three levels: 50, 100, and 150% of FL and CUR in contact with empty NLC (Table 4). According to the results presented in Table 4, the analytical method presents satisfactory accuracy for both CUR and FL present in the NLC matrix, as they presented percentages of recoveries between 95 and 105% [40].

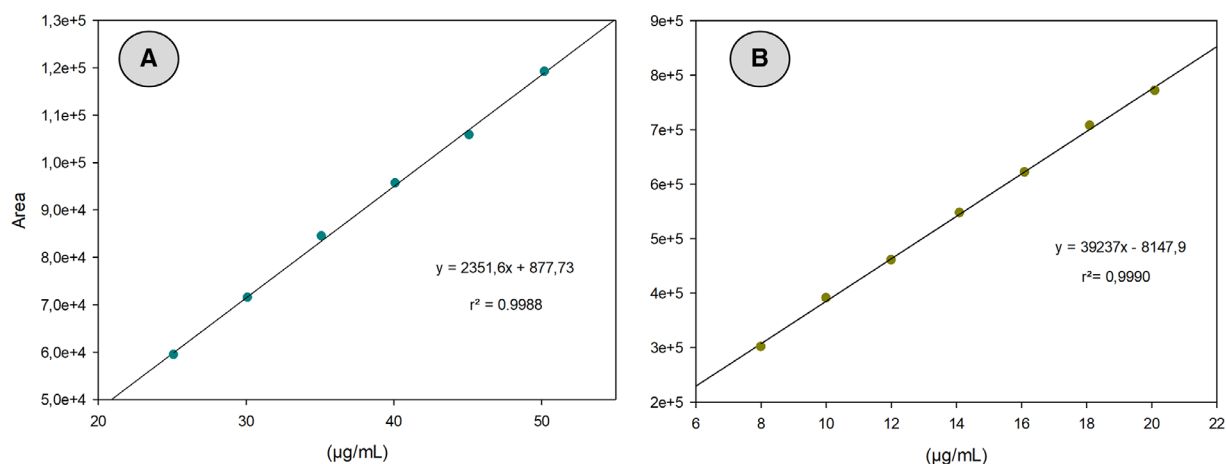


FIGURE 1 Curves obtained by evaluating the linearity of fluconazole (A) and curcumin (B)

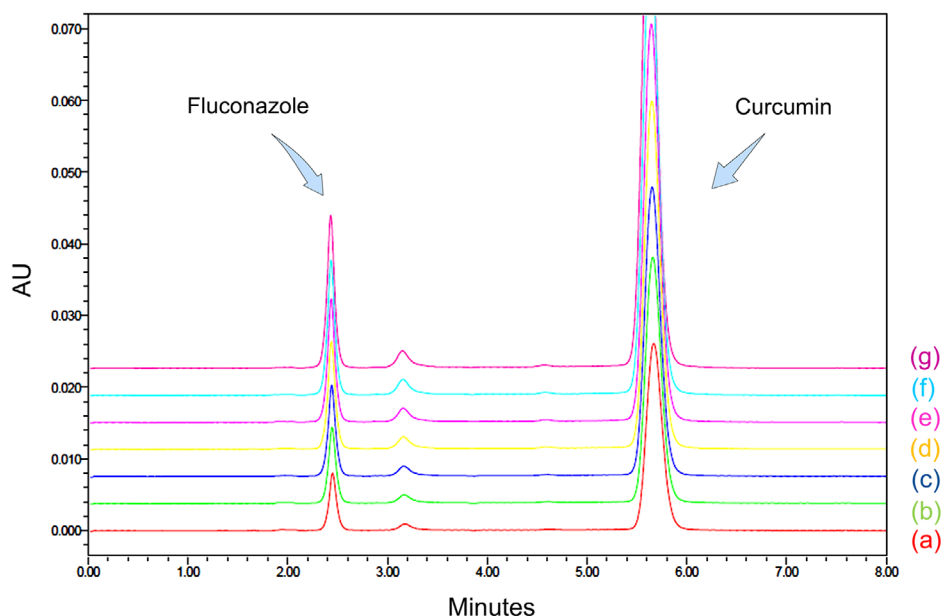


FIGURE 2 Fluconazole and curcumin chromatograms obtained for the linearity test, where (A–G) represents the increasing concentration of curcumin (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 µg/mL), and fluconazole (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg/mL)

3.2.5 | Robustness

The robustness of an analytical method refers to its ability to quantify the analyte against variations, and this characteristic was analyzed by quantification after applying small deliberate variations, as described in RDC 166/17 [42] and as proposed by Youden and Steiner [40]. The results obtained with the variables applied and described above are shown in Table 5. As can be seen, even with the variations it was possible to obtain a high percentage of the recovery. When analyzing separately, it is observed that the mobile phase flux was the parameter that most impacted the quantification of FL (5.75%), while the column lot

more in the quantification of CUR (10.30%), which may be related to uses previews of it. Considering the acceptance criteria of 95–105% recovery, it can be seen that the determination of CUR was significantly affected by the alteration of the chromatographic column and the proportion of the mobile phase [40].

3.2.6 | Selectivity

Selectivity is a parameter that indicates the ability of the method under study to measure the analyte in the presence of other compounds without interfering with the final

TABLE 4 Parameters of analytical validation for fluconazole (FL) and curcumin (CUR) by HPLC method

Parameters	FL	CUR
Linearity		
Linearity range ($\mu\text{g/mL}$)	20–50	8–20
Correlation coefficient (r^2)	0.9988	0.9990
Sensitivity		
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	2.10	0.83
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	6.38	2.5
Precision (%RSD)		
Repeatability (intra-day)	0.63	0.96
Intermediated (inter-day)	2.35	1.70
Accuracy (%recuperation)		
50%	97.21	100.48
100%	98.18	97.07
150%	97.21	96.51

TABLE 5 Results of recuperation and impact of every variable obtained after the robustness test

Variable*	Fluconazole		Curcumin	
	Mean Recuperation (%)	Impact (%)	Mean Recuperation (%)	Impact (%)
A/a	100.47	2.75	98.04	0.64
B/b	99.82	1.45	97.49	0.45
C/c	101.62	5.06	101.03	6.62
D/d	98.07	2.06	92.56	10.30
E/e	99.05	0.09	97.88	0.33
F/f	98.78	0.63	97.56	0.30
G/g	96.22	5.75	94.57	0.29

analysis [26]. The percentage recovery of FL and CUR in the blank nanoformulation was $98.18 \pm 0.74\%$ and $97.07 \pm 0.43\%$, respectively, indicating the method selectivity in the quantification of biomolecules in the matrix.

3.2.7 | Stress test

After subjecting the drugs to stress at alkaline pH, acidophilus pH, oxidation (H_2O_2 35%), and photolysis (Figure 3), the CUR peak preserved its definition, while the FL peak in oxidative stress (Figure 3b) showed compromised definition due to the presence of co-elution with molecule from FL degradation. Thus, observing the chromatograms, it is noted that the analytical method proposed in this work is not suitable for the quantification of FL after oxidative stress. Additionally, it was possible to verify significant interference for recovery of FL and CUR, as can be observed in Table 6. Admitting the previously mentioned

TABLE 6 Mean recuperation percentage of fluconazole and curcumin in presence of null formulation and after the stress test

Interfering	Mean recuperation (%)	
	Fluconazole	Curcumin
NLC _{BLANK}	98.18 ± 0.74	97.07 ± 0.43
NaOH (0.1 M)	97.22 ± 1.34	8.45 ± 0.36
HCl (0.1 M)	91.27 ± 1.87	85.58 ± 3.89
H_2O_2 (35%)	42.22 ± 3.72	84.24 ± 1.78
Photolysis	79.35 ± 0.82	84.16 ± 0.65

AOAC acceptance criteria, the developed method is not able to adequately determine the drugs after their degradation [40,42], except FL exposure at alkaline pH. It is suggested that the low percentage of recovery after the stress study is due to the high degradation of FL and CUR under the analyzed conditions, similar to that was observed in the studies conducted by Jebaliya et al. [43], and Syed et al. [44]. Thus, based on the results obtained, the proposed method is not suitable for the quantification of CUR and FL under conditions of photolysis, oxidative damage, and degradation in alkaline and acidophilic mediums.

4 | APPLICATIONS OF THE VALIDATED METHOD

After observing that the proposed method is satisfactory in all analytical validation parameters, the encapsulation efficiency and drug-loading analysis of NLC containing FL (100 $\mu\text{g/mL}$) and CUR (1000 $\mu\text{g/mL}$) were performed. The concentrations of CUR and FL described composing the NLC were selected based on in vitro microbiological results (data not shown). After quantifying the supernatant obtained after centrifugation and performing calculations based on Equations (4) and (5), it was possible to observe %EE and %DL of 77.36 ± 0.250 and 10.46 ± 0.03 for CUR, and 94.61 ± 0.664 and 14.63 ± 0.08 for FL. These values demonstrate the high capacity of the developed NLC to deliver both biomolecules simultaneously.

5 | CONCLUSION

The HPLC method proposed by the study was validated according to the ICH (Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Q2 (R1) and the FDA - Guidance for bioanalytical method, for the simultaneous quantification of FL and CUR in NLC composed of cholesterol, castor oil, myristyl myristate and Tween 20. The results showed that the developed analytical method is linear, selective, precise, accurate, sensitive, and robust, as it presented results that met the criteria

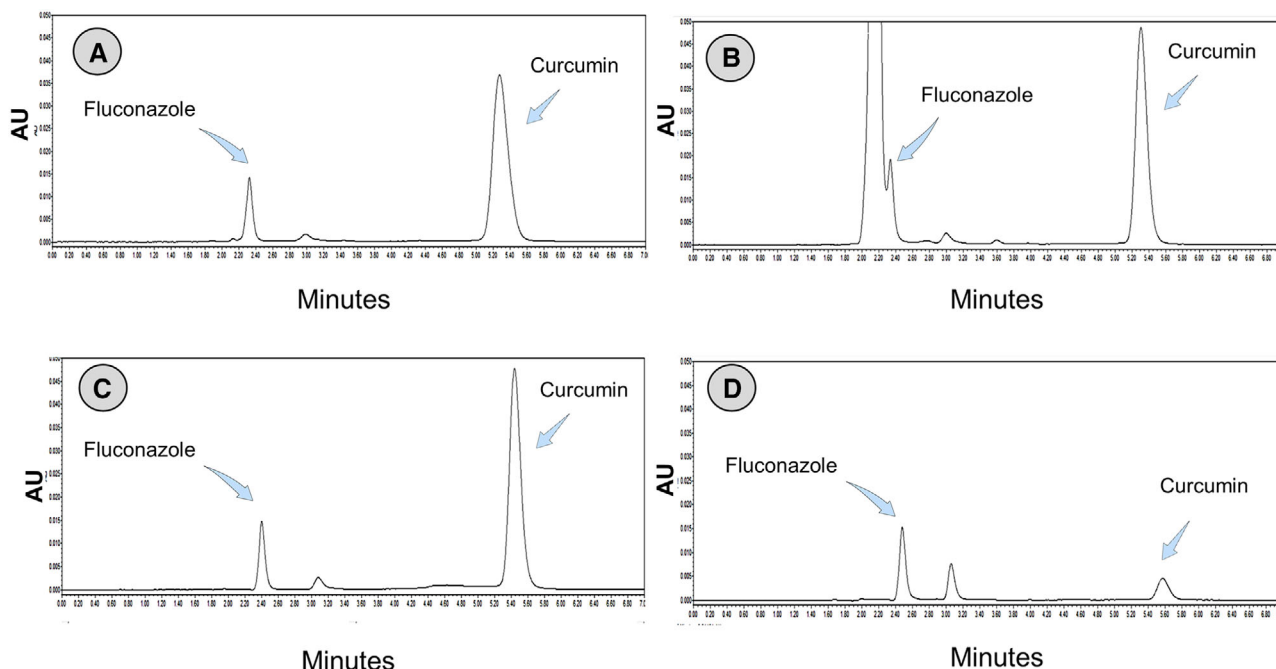


FIGURE 3 Fluconazole and curcumin chromatograms after stress test with UV light (A), oxidative stress (B), in acidophilic medium (C), and alkaline medium (D)

required in all parameters for the validation of analytical methods. Additionally, the method proved to be fast, capable of quantifying FL and CUR in a 7-min analysis. The suggested method was able to accurately and accurately provide the contents of CUR and FL encapsulated in NLCs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPESP (Sao Paulo Research Foundation, grant numbers #2019/26821-7, and #2019/10261-2) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Finance Code 001).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Victor Hugo Sousa Araujo  <https://orcid.org/0000-0003-1731-9918>

REFERENCES

1. Sangamithra V, Verma R, Sengottuvelu S, Sumathi R. Candida infections of the genitourinary tract. *Res J Pharm Technol* 2013;6:1111–5.
2. Ferreira PS, Victorelli FD, Rodero CF, Fortunato GC, Araújo VHS, Fonseca-Santos B, Bauab TM, Van Dijck P, Chorilli M. p-Coumaric acid loaded into liquid crystalline systems as a novel strategy to the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Int J Pharm* 2021;603:120658.
3. dos Santos Ramos MA, Da Silva PB, De Toledo LG, Oda FB, Da Silva IC, dos Santos LC, dos Santos AG, De Almeida MTG, Pavan FR, Chorilli M, Bauab TM. Intravaginal delivery of syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland fraction based on a nanoemulsion system applied to vulvovaginal candidiasis treatment. *J Biomed Nanotechnol* 2019;15:1072–89.
4. dos Santos Ramos MA, de Toledo LG, Fioramonti Calixto GM, Bonifácio BV, de Freitas Araújo MG, dos Santos LC, de Almeida MTG, Chorilli M, Bauab TM. Syngonanthus nitens Bong. (Rhul.)-loaded nanostructured system for Vulvovaginal candidiasis treatment. *Int J Mol Sci* 2016;17:1368–87.
5. Bonifácio BV, dos Santos Ramos MA, da Silva PB, Negri KMS, de Oliveira Lopes É, de Souza LP, Vilegas W, Pavan FR, Chorilli M, Bauab TM. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-Candida albicans activity of Astronium sp. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5081–92.
6. Anderson J, Cundiff L, Schnars B, Gao M, Mackenzie I, Soll DR. Hypha formation in the white-opaque transition of Candida albicans. *Infect Immun* 1989;57:458–67.
7. Donders GGG, Sobel JD. Candida vulvovaginitis: a store with a butterfly and a show window. *Mycoses* 2017;60:70–2.
8. Rodero CF, Fioramonti Calixto GM, dos Santos KC, Sato MR, dos Santos Ramos MA, Miro MS, Rodriguez E, Vigezzi C, Bauab TM, Sotomayor CE, Chorilli M. Curcumin-loaded liquid crystalline systems for controlled drug release and improved treatment of vulvovaginal candidiasis. *Mol Pharm* 2018;15:4491–504.
9. Vasconcelos CNETODE, Silva NNP, Batista PN, Kalil JH. Estudo comparativo entre terapia oral e local no tratamento de

- corrimentos vaginais : candidíase , tricomoníase e vaginose bacteriana comparative study between oral and topic therapy of vaginal discharge caused by candidiasis , tricomoniasis and bacterian. *Brazilian J Surg Clin Res* 2016;15:123–8.
10. Shiozawa P, Cechi D, Augusta M, Figueiredo P, Sekiguchi LT, Maria S, Rosa R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente : revisão atualizada. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med St Casa*. 2007;52:48–50.
 11. Ramos MAS, Calixto G, de Toledo LG, Bonifácio BV, do Ssantos LC, de Almeida MTG, Chorilli M, Bauab TM. 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 Nanomedicine*. 2015;10:7455–65.
 12. de Toledo LG, Ramos MADS, da Silva PB, Rodero CF, de Sá Gomes V, da Silva AN, Pavan FR, da Silva IC, Oda FB, Flumignan DL, Dos Santos AG, Chorilli M, de Almeida MTG, Bauab TM. Improved in vitro and in vivo anti-candida albicans activity of cymbopogon nardus essential oil by its incorporation into a microemulsion system. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:10481–97.
 13. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:69–77.
 14. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol* 2016;42:905–27.
 15. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007;4:807–18.
 16. Carolina Alves R, Perosa Fernandes R, Fonseca-Santos B, Damiani Victorelli F, Chorilli M. A critical review of the properties and analytical methods for the determination of curcumin in biological and pharmaceutical matrices. *Crit Rev Anal Chem* 2019;49:138–49.
 17. Shome S, Das A, Dutta M, Kanti M. Curcumin as potential therapeutic natural product : a nanobiotechnological perspective. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68:1481–500.
 18. Garcia-Gomes AS, Curvelo JAR, Soares RMA, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med Mycol* 2012;50:26–32.
 19. Araujo VHS, Duarte JL, Carvalho GC, Silvestre ALP, Fonseca-Santos B, Marena GD, Ribeiro TC, dos Santos Ramos MA, Bauab TM, Chorilli M. Nanosystems against candidiasis: a review of studies performed over the last two decades. *Crit Rev Microbiol* 2020;0:1–40.
 20. Weber S, Zimmer A, Pardeike J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;86:7–22.
 21. Garcês A, Amaral MH, Lobo JMS, Silva AC. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use : A review. *Eur J Pharm Sci* 2018;112:159–67.
 22. Saedi A, Rostamizadeh K, Parsa M, Dalali N, Ahmadi N. Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers as drug delivery system: influence of liquid lipid types on loading and cytotoxicity. *Chem Phys Lipids*. 2018;216:65–72.
 23. Souza PCDe, Silva PB. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper (II) complexes to be used against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:909–21.
 24. Fachinetti N, Rigon RB, Eloy JO, Sato MR, Cristina K, Chorilli M, dos Santos KC, Chorilli M. Comparative study of glyceryl behenate or polyoxyethylene 40 stearate-based lipid carriers for trans-resveratrol delivery: development, characterization and evaluation of the in vitro tyrosinase inhibition. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19:1401–9.
 25. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal* 2018;147:590–611.
 26. Fernandes MA, Eloy JO, Victorelli FD, Ferreira PS, Pironi AM, Chorilli M. Reversed-Phase HPLC: a fast and efficient analytical method to quantify docetaxel-loaded pegylated liposomes in release study. *J Sep Sci* 2021;1–21.
 27. Mutalik SP, Mullick P, Pandey A, Kulkarni SS, Mutalik S. Box–Behnken design aided optimization and validation of developed reverse phase HPLC analytical method for simultaneous quantification of dolutegravir sodium and lamivudine co-loaded in nano-liposomes. *J Sep Sci* 2021;44:2917–31.
 28. Araujo VHS, da Silva PB, Szlachetka IO, da Silva SW, Fonseca-Santos B, Chorilli M, Ganassin R, de Oliveira GRT, da Rocha MCO, Fernandes RP, de Carvalho Vieira Queiroz M, Azevedo RB, Muehlmann LA. The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2020;602:125070 DOI: [10.1016/j.colsurfa.2020.125070](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125070).
 29. Madane RG, Mahajan HS. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. *Drug Deliv*. 2016;23:1326–34.
 30. Fonseca-Santos B, Gremião MPD, Chorilli M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. *Arab J Chem* 2017;10:1029–37.
 31. Kim EJ, Lee HS, Zee OP, Lee ST. A sensitive and simplified HPLC analysis for the determination of fluconazol in human plasma. *Arch Pharm Res* 1988;11:250–2.
 32. Abdel-Moety EM, Khatib FI, Kelani KM, AbouAl-Alamein AM. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Far-maco* 2002;57:931–8.
 33. Kelidari HR, Moazeni M, Babaei R, Saeedi M, Akbari J, Parkoohi PI, Nabili M, Gohar AA, Morteza-Semnani K, Nokhodchi A. Improved yeast delivery of fluconazole with a nanostructured lipid carrier system. *Biomed Pharmacother* 2017;89:83–8.
 34. Domingues Bianchin M, Borowicz SM, da Rosa Monte Machado G, Pippi B, Stanisçuaski Guterres S, Raffin Pohlmann A, Meneghello Fuentefria A, Clemes Külkamp-Guerreiro I. Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple *Candida* species. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;175:523–9.
 35. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology Developed to Complement the Parent Guideline. 2005, pp. 1–13.

36. Linda L. Ng, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994, pp. 1015–3.
37. Khorshidi N, Rahimi M, Salimikia I. Application of aeration-assisted homogeneous liquid–liquid microextraction procedure using Box–Behnken design for determination of curcumin by HPLC. *J Sep Sci* 2020;43:2513–20.
38. ANVISA. Farmacopeia brasileira volume II – monografias insumos farmacêuticos e especialidades. *Farm Bras* 2019;2:1–1504.
39. Ayub AC, Vianna-Soares CD, Ferreira LAM. Fluconazol method validation by RP-HPLC for determination in biological skin matrices. *J Chromatogr Sci* 2007;45:286–90.
40. George L. Official Methods of Analysis of AOC International. 1:2019.
41. Zuben EDSV, Eloy JO, Araujo VHS, Daflon PMG, Chorilli M. Rapid and sensitive analytical method for the determination of insulin in liposomes by reversed-phase HPLC. *Acta Chim Slov* 2020;67:1273–80.
42. Ministry of Health of Brazil, National Health Surveillance Agency (ANVISA). Resolution of the Collegiate Board - RDC No. 166, of July 24, 2017. *Off Diary Union*. 2017;2017:1–21.
43. Jebaliya H, Patel M, Jadeja Y, Dabhi B, Shah A. A comparative validation study of fluconazole by HPLC and UPLC with forced degradation study. *Chromatogr Res Int* 2013;2013:1–5.
44. Syed HK, Liew KB, Loh GOK, Peh KK. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chem*. 2015;170:321–6.

How to cite this article: Araujo VHS, Fernandes LS, dos Reis LR, Carvalho GC, Scarpa MV, Chorilli M. Validation of an innovative analytical method for simultaneous quantification of curcumin and fluconazole using high-performance liquid chromatography from nanostructured lipid carriers. *J Sep Sci*. 2021; 1–10.
<https://doi.org/10.1002/jssc.202100514>