

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 11/08/2024.



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 Biotecnologia 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 BIOCÊNCIAS 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 Julio de Mesquita Filho,
O=UNESP, 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. IC50= 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 vulvovaginal, 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 vulvovaginais. 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 *Candida 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 conseqüente 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.

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 Servicos 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.

LIMAET 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 , Tricomoníase 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 Nanoplatfom 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.