

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 30/01/2022.

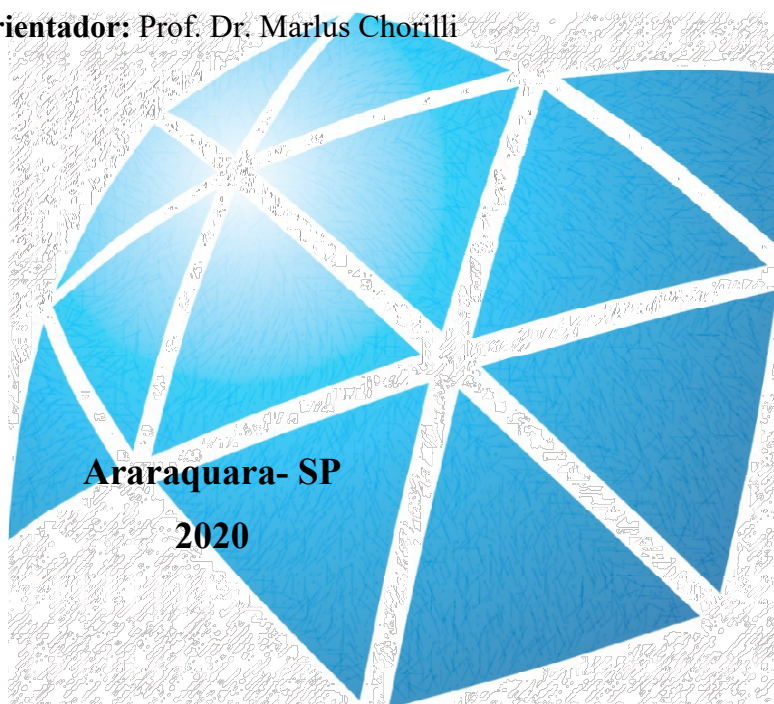
**Carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em
hidrogéis de geleificação *in situ* para administração vaginal
de hipericina associados à terapia fotodinâmica no
tratamento da candidíase vulvovaginal**

Mariana Rillo Sato

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara- SP

2020



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

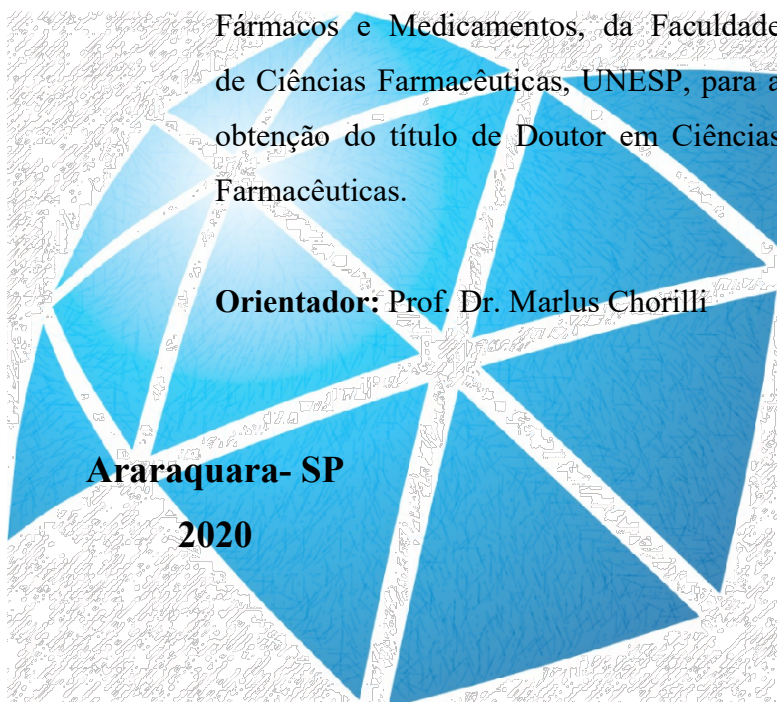
Mariana Rillo Sato

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara- SP

2020



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

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

Orientador: Marlus Chorilli.

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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: MARIANA RILLO SATO

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

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



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. RUI CARLOS RÜBER BECK

Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul



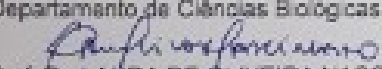
Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCF - UNESP - Araraquara



Prof. Dra. TAÍS MARIA BALAB

Departamento de Ciências Biológicas / FCF - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 30 de janeiro de 2020

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EPÍGRAFE

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE EQUAÇÕES

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7 REFERÊNCIAS

ACD/Structure Elucidator, version 2017, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canadá, www.acdlabs.com, 2019.

AIGNER, S.; FALK, H. On synthesis and properties of hypericin-porphyrin hybrids. **Monatshefte Fur Chemie-Chemical Monthly**, v. 139, p. 1513-1518, 2008.

ALVES, F.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. O.; MCHALE, A. P.; CALLAN, J. F. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. **Biofouling**, p. 1-11, 2018.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505–518, 2009.

ANTIMISSIONARIS, S. G.; MOURTAS, S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p.123–145, 2015.

ARAÚJO, P. R.; CALIXTO, G. M. F.; SILVA, I. C.; ZAGO, L. H. P.; OSHIRO-JUNIOR, J. A.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, A. O.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Mucoadhesive *in situ* gelling liquid crystalline precursor system to improve to the vaginal administration of drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, p. 225, 2019.

ARAÚJO, M. G. F.; PACIFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; SCARPA, M. V. C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, p. 673-682, 2013.

ARAÚJO-PEREIRA, R. R.; BRUSCH, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 6, p. 643-652, 2012.

BADEA, G.; LACATUSU, I.; OTT, C.; BADEA, N.; GRAFU, I.; MEGHEA, A. Integrative approach in prevention and therapy of basal cellular carcinoma by association of three actives loaded into lipid nanocarriers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology**, v. 147, p. 1–8, 2015.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influencia de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. S.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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