



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Sistemas líquido-cristalinos como potencial estratégia
para administração vaginal de ácido *p*-cumárico no
tratamento de candidíase vulvovaginal**

Paula Scanavez Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara - SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Sistemas líquido-cristalinos como potencial estratégia para administração vaginal de ácido *p*-cumárico no tratamento de candidíase vulvovaginal

Paula Scanavez Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara - SP

2020

F383s

Ferreira, Paula Scanavez.

Sistemas líquido-cristalinos como potencial estratégia para administração vaginal de ácido *p*-cumárico no tratamento de candidíase vulvovaginal / Paula Scanavez Ferreira. – Araraquara: [S.n.], 2020.

121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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. Ácido *p*-cumárico. 2. Candidíase vulvovaginal. 3. Sistemas líquido-cristalinos. 4. *Candida albicans*. 5. *Candida glabrata*. 6. Biofilme.
I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

Ao longo do mestrado, muitas pessoas me acompanharam nessa caminhada de aprendizado, conhecimento e amizades. Foram elas que me apoiaram, ajudaram e alegraram meus dias, tanto dentro quanto fora do laboratório, durante esses dois anos de pesquisa. A essas pessoas queridas que de alguma maneira compartilharam essa fase de crescimento profissional e amadurecimento pessoal, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente aos meus familiares, especialmente aos meus pais Edna e Wilson e à minha irmã Isabella, por todo o apoio e confiança no meu trabalho, além de me acalmarem e nunca me deixarem desistir quando alguma coisa não saía conforme o planejado nos experimentos. Muitas vezes a saudade e a distância eram grandes, pois eu não podia deixar o laboratório, até mesmo nos finais de semana, e ainda assim vocês nunca me deixaram sozinha. Muito obrigada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade de realizar o mestrado em uma área totalmente nova para mim, por acreditar na minha capacidade mesmo não sendo da área farmacêutica e por sempre me encorajar a aceitar novos desafios e crescer tanto academicamente quanto profissionalmente.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da UNESP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço principalmente à Francesca, Mariza, Andressa, Camila, Mariana, Victor, Mauricio, Bruno, Eliete e Valéria, pela paciência, por sempre me ajudarem nos momentos que precisei, pelos ensinamentos, risadas no laboratório, almoços, lanchinhos, enfim, pela amizade. Sem a ajuda de vocês, eu teria levado muito tempo para aprender tudo o que foi necessário e provavelmente não teria tantas memórias boas para guardar.

Agradeço ao Eric que está sempre ao meu lado, nos momentos felizes e também naqueles não muito bons. Pelas risadas, por me incentivar a não desistir, pela paciência ouvindo minhas reclamações quando nada dá certo, pela companhia e pelo amor e carinho de sempre. Agradeço também aos meus amigos que, mesmo com a distância, sempre encontram uma maneira de se fazerem presentes na minha vida.

Às professoras Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin e Dra. Herida Regina Nunes Salgado pela parceria na utilização dos equipamentos, assim como aos alunos dos laboratórios CMAF e de Controle de Qualidade da UNESP/FCFar por toda ajuda e assistência.

À professora Dra. Tais Maria Bauab por permitir que eu realizasse os experimentos biológicos em seu laboratório e a todo o pessoal do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da UNESP/FCFar, pela ajuda e suporte durante esse período.

Agradeço à Natalia, técnica do laboratório de Farmacotécnica por todo o auxílio nos momentos de “perrengue” no laboratório e ao pessoal da Seção Técnica de Pós-Graduação que sempre foram muito atenciosos e prestativos, em especial à Claudia Molina e à Aniele Vilella.

Agradeço ao Prof. Dr. Patrick Van Dijck pela oportunidade e por me receber em seu laboratório durante o estágio de pesquisa que realizei na KU Leuven, Bélgica. Agradeço também a todos os colegas de trabalho do Instituto de Botânica e Microbiologia da KU Leuven e amigos que fiz em Leuven, por me receberem e acolherem tão bem, fazendo do meu intercâmbio uma experiência tão boa.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. À Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, Coordenadora do Programa de Ciências Farmacêuticas e aos demais membros do programa.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001 - pelo apoio financeiro durante o primeiro ano de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dessa pesquisa e auxílio financeiro, sob os Processos nº 2017/22928-6 (no Brasil) e nº 2018/22658-1 (no exterior).

E agradeço a todos que, ainda que seus nomes não foram citados aqui, contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, direta ou indiretamente. Muito obrigada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE ÁCIDO P-CUMÁRICO NO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

AUTORA: PAULA SCANAVEZ FERREIRA

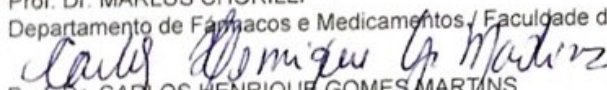
ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

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



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE GOMES MARTINS

Departamento de Microbiologia / Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR

Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Araraquara, 24 de janeiro de 2020

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é o tipo mais comum de vaginite aguda entre as mulheres, causada por fungos do gênero *Candida* spp. A *Candida albicans* é a espécie responsável por 80-90% dos casos, contudo nos últimos anos, houve um aumento no número de casos envolvendo outras espécies, sendo a *Candida glabrata*, a segunda mais reportada e mais resistente aos tratamentos convencionais. As terapias existentes para CVV apresentam desvantagens devido aos efeitos colaterais dos agentes antifúngicos convencionais além da resistência fúngica prevalente. Como alternativa, compostos naturais como o ácido *p*-cumárico (*p*-AC) vêm sendo estudados devido à sua potencial atividade antifúngica. Todavia, seu caráter lipofílico dificulta sua solubilidade em água, diminuindo sua eficácia. A incorporação do *p*-AC em um sistema de liberação de fármacos (SLF), como os cristais líquidos (CLs), pode auxiliar na sua administração tópica, e assim aumentar sua solubilidade, eficácia, reduzir efeitos colaterais sistêmicos e potencializar sua ação na mucosa vaginal. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas líquido-cristalinos com propriedades mucoadesivas para liberação controlada do ácido *p*-cumárico no tratamento de candidíase vulvovaginal, via administração tópica. A atividade antifúngica do *p*-AC foi avaliada a partir dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), formação de biofilme e ensaio *in vivo* contra cepas de *C. albicans* (SC5314), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. krusei* (ATCC 6258). Para o desenvolvimento das formulações, foram construídos dois diagramas de fases constituídos por ácido oleico e colesterol (5:1), uma dispersão de poloxamer a 16% e uma fase surfactante. Em relação a esta fase, duas substâncias foram testadas: trietanolamina (TEA) e oleato de trietanolamina (TEA-Oleato). Após uma pré avaliação dos pontos selecionados de cada diagrama, dois sistemas (P24 e P29) do diagrama TEA-Oleato foram caracterizados visualmente, por microscopia de luz polarizada, reologia, análise de perfil de textura, análise de mucoadesão *in vitro* e perfis de liberação, permeação e retenção. Além dos sistemas originais, foram avaliadas suas respectivas diluições em muco artificial vaginal (30 e 100% MVA), a fim de mimetizar o sítio de aplicação e verificar possíveis modificações nos CLs quando em contato com o ambiente vaginal. Os valores de CIM foram de 5000µg.mL⁻¹ para *p*-AC, 1,0µg.mL⁻¹ para anfotericina B (Anf. B) e ambas cepas foram resistentes ao fluconazol (Fluco). O valor de CFM para o *p*-AC foi 6000µg.mL⁻¹. A partir dos resultados *in vitro*, observou-se que o *p*-AC demonstrou melhor inibição dos biofilmes maduros que Anf. B e Fluco. *p*-AC inibiu 98% do biofilme de *C. albicans* e 92% de *C. glabrata* apenas com o seu valor da CFM enquanto que a Anf. B demonstrou taxas de inibição de 96% e 65% respectivamente, porém com seu valor de CIM aumentado em 1000x. À 1mg.mL⁻¹, Fluco ainda apresentou menor eficácia, inibindo apenas de 30-40% dos biofilmes. Os sistemas incorporados apresentaram perfil mucoadesivo, mesofases líquido-cristalinas (presença de cruces de Malta e estrias), alta organização estrutural e pseudoplasticidade, parâmetros desejáveis para formulações tópicas. Eles também apresentaram perfis de liberação controlados em 12h (46% - 50% de *p*-AC liberado) quando comparado ao fármaco livre (87%) assim como diminuíram a permeação do composto na mucosa vaginal de 38% para 9%, o que pode evitar efeitos sistêmicos. No ensaio *in vivo*, os CLs aumentaram a atividade antifúngica do Fluco e do *p*-AC, diminuíram a presença de formas filamentosas, além de que, os sistemas incorporados com *p*-AC apresentaram resultados similares àqueles incorporados com Fluco. A partir dos resultados obtidos, o *p*-AC demonstrou ser um composto natural com atividade antifúngica contra espécies do gênero *Candida* spp. A partir do presente trabalho foi possível obter CLs com propriedades desejáveis para administração vaginal tópica do *p*-AC como potencial SLF para tratamento da candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: Ácido *p*-cumárico, candidíase vulvovaginal, sistemas líquido-cristalinos, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, biofilme.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is the most common type of acute vaginitis among women, caused by fungi of the genus *Candida* spp. *Candida albicans* is the species responsible for 80-90% of cases, however in recent years, there has been an increase in the number of cases involving other species, with *Candida glabrata* being the second most reported and most resistant to conventional treatments. Existing therapies for VVC have disadvantages due to the side effects from conventional antifungal agents besides the prevailing fungal resistance. As an alternative, natural compounds such as *p*-coumaric acid (*p*-CA) have been studied due to their potential antifungal activity. However, its lipophilic character hinders its solubility in water, reducing its effectiveness. The incorporation of *p*-CA into a drug delivery system (DDS), such as liquid crystals (LCs), can assist in its topical administration, therefore increase its solubility, effectiveness, reduce systemic side effects and enhance its activity on the vaginal mucosa. Thus, this work aimed to develop liquid-crystalline systems with mucoadhesive properties for controlled release of *p*-CA in the treatment of vulvovaginal candidiasis, via topical administration. The antifungal activity of *p*-CA was analysed by assays of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), biofilm formation and *in vivo* assay against strains of *C. albicans* (SC5314), *C. glabrata* (ATCC 2001) and *C. krusei* (ATCC 6258). For the development of the formulations, two phase-diagrams were constructed consisting of oleic acid and cholesterol (5:1), a dispersion of poloxamer 16% and a surfactant phase. Regarding this phase, two substances were tested: triethanolamine (TEA) and triethanolamine oleate (TEA-Oleate). After a pre-evaluation of the selected points from each diagram, two systems (P24 and P29) from the TEA-Oleate diagram were characterized visually, by polarized light microscopy, rheology, texture profile analysis, *in vitro* mucoadhesion analysis and release, permeation and retention profiles. In addition to the original systems, their respective dilutions in artificial vaginal mucus (30 and 100%AVM) were evaluated in order to mimic the application site and verify possible changes in the LCs structure when in contact with the vaginal environment. MIC values were 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *p*-CA, 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for amphotericin B (Amph. B) and both strains were resistant to fluconazole (Fluco). The MFC value for *p*-CA was 6000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. From the *in vitro* results, it was observed that *p*-CA demonstrated better inhibition of mature biofilms than Amph. B and Fluco. *p*-CA inhibited 98% of the *C. albicans* biofilm and 92% of *C. glabrata*, only with its CFM value, while Amph. B exhibited inhibition rates of 96% and 65% respectively, but with its MIC value increased by 1000x. At 1mg.mL⁻¹, Fluco was still less effective, inhibiting only 30-40% of biofilms. *p*-CA loaded systems presented mucoadhesive profile, liquid crystalline mesophases (presence of Maltese crosses and striated structures), high structural organization and pseudoplasticity, desirable parameters for topical formulations. They also presented controlled release profiles in 12h (46% - 50% of released *p*-CA) when compared to the free drug (87%) as well as decreased the permeation of the compound in the vaginal mucosa from 38% to 9%, which may avoid systemic effects. In the *in vivo* therapeutic assay, LCs increased the antifungal activity of Fluco and *p*-CA, decreased the presence of filamentous forms, besides that *p*-CA loaded formulations showed similar results to those loaded with Fluco. From the obtained data, *p*-CA proved to be a natural compound with antifungal activity against species of the genus *Candida* spp. From the present work, it was possible to obtain LCs with desirable properties for *p*-CA topical vaginal administration as a potential drug delivery system for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Keywords: *p*-coumaric acid, vulvovaginal candidiasis, liquid-crystalline systems, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and biofilm.

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. PRINCIPAIS MORFOLOGIAS DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> SPP.	21
FIG. 2. COLORAÇÃO DE COLÔNIAS VIA CULTIVO EM CHROMAGAR.	22
FIG. 3. BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> VISTO A PARTIR DE MICROSCÓPIO. AS SETAS MOSTRAM A PRESENÇA DE BLASTOSPOROS E HIFAS. AS ESTRUTURAS MAIORES DE COLORAÇÃO ROXA SÃO CÉLULAS DO EPITÉLIO VAGINAL.	29
FIG. 4. ISÔMEROS DO ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO.	34
FIG. 5. ESTADO INTERMEDIÁRIO DA MATÉRIA, DE UM CRISTAL LÍQUIDO.	37
FIG. 6. FASES ESTRUTURAIS DOS CRISTAIS LÍQUIDOS: (A) LAMELAR, (B) HEXAGONAL E (C) CÚBICA.	39
FIG. 7. ESTRUTURAS QUÍMICAS DA TEA E DO TEA-OLEATO, RESPECTIVAMENTE.	42
FIG. 8. SISTEMA AUTOMÁTICO COM CÉLULA DE DIFUSÃO VERTICAL DE FRANZ – MICROETTE PLUS.	49
FIG. 9. DIAGRAMAS DE FASES (PONTUAL E DE LINHAS) COMPOSTOS POR FASE AQUOSA, FASE OLEOSA E TEA-OLEATO, APRESENTANDO A DISPOSIÇÃO DE VISCOSIDADE DE CADA PONTO.	54
FIG. 10. DIAGRAMAS DE FASES TERNÁRIOS (PONTUAL E DE LINHAS) COMPOSTOS POR FASE AQUOSA, FASE OLEOSA E TEA, APRESENTANDO A DISPOSIÇÃO DA VISCOSIDADE DE CADA PONTO.	55
FIG. 11. FORMULAÇÕES P24 E P29 SEM FÁRMACO, PRÉ-SELECIONADAS DE CADA DIAGRAMA CONSTRUÍDO.	57
FIG. 12. DESLOCAMENTO DOS SISTEMAS PRÉ-SELECIONADOS NOS DIAGRAMAS APÓS A ADIÇÃO DE MVA.	57
FIG. 13. FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MLP DAS FORMULAÇÕES COMPOSTAS POR TEA-OLEATO COMO TENSOATIVO. COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS COM E SEM ADIÇÃO DO MUCO, NÃO-INCORPORADOS E INCORPORADOS COM <i>P</i> -AC. AS SETAS BRANCAS INDICAM A PRESENÇA DE CRUZES DE MALTA. A) P24 TEA-OLEATO; B) P24 TEA-OLEATO 30%; C) P24 TEA-OLEATO 100%; D) P24 TEA-OLEATO + <i>P</i> -AC; E) P24 TEA-OLEATO 30% + <i>P</i> -AC; F) P24 TEA-OLEATO 100% + <i>P</i> -AC; G) P29 TEA-OLEATO; H) P29 TEA-OLEATO 30%; I) P29 TEA-OLEATO 100%; J) P29 TEA-OLEATO + <i>P</i> -AC; K) P29 TEA-OLEATO 30% + <i>P</i> -AC; L) P29 TEA-OLEATO 100% + <i>P</i> -AC.	60
FIG. 14. FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MLP DAS FORMULAÇÕES COMPOSTAS POR TEA COMO TENSOATIVO. COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS COM E SEM ADIÇÃO DO MUCO, NÃO-INCORPORADOS E INCORPORADOS COM <i>P</i> -AC. AS SETAS BRANCAS INDICAM A PRESENÇA DE CRUZES DE MALTA. A) P24 TEA; B) P24 TEA 30%; C) P24 TEA 100%; D) P24 TEA + <i>P</i> -AC; E) P24 TEA 30% + <i>P</i> -AC; F) P24 TEA 100% + <i>P</i> -AC; G) P29 TEA; H) P29 TEA 30%; I) P29 TEA 100%; J) P29 TEA + <i>P</i> -AC; K) P29 TEA 30% + <i>P</i> -AC; L) P29 TEA 100% + <i>P</i> -AC.	61
FIG. 15. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADA OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	64
FIG. 16. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 30% DE MVA, À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADA OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	64
FIG. 17. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 100% DE MVA, À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADA OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	64
FIG. 18. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADO OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	65
FIG. 19. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 30% DE MVA, À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADA OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	65
FIG. 20. REOGRAMA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 100% DE MVA, À 25°C E 37°C, QUANDO INCORPORADA OU NÃO COM <i>P</i> -AC. OS SÍMBOLOS CHEIOS REPRESENTAM AS CURVAS ASCENDENTES E OS VAZIOS, AS CURVAS DESCENDENTES.	65
FIG. 21. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO.	68

FIG. 22. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 30% DE MVA.	68
FIG. 23. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P24 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 100% DE MVA.	68
FIG. 24. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO.	69
FIG. 25. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 30% DE MVA.	69
FIG. 26. VARIAÇÃO DO MÓDULO DE ARMAZENAGEM G' (SÍMBOLOS CHEIOS) E DE PERDA G'' (SÍMBOLOS VAZIOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DA FORMULAÇÃO P29 TEA-OLEATO COM ADIÇÃO DE 100% DE MVA.	69
FIG. 27. VISCOSIDADE APARENTE DAS FORMULAÇÕES P24 TEA-OLEATO (A) E P29 TEA-OLEATO (B) SEM FÁRMACO.	71
FIG. 28. PERFIL DE TEXTURA DOS SISTEMAS P24 E P29 TEA-OLEATO. AS BARRAS DE COLORAÇÃO CINZA ESCURA SÃO REFERENTES AOS SISTEMAS INCORPORADOS COM <i>P</i> -AC, E AS DE COLORAÇÃO CINZA CLARA SÃO AS FORMULAÇÕES SEM FÁRMACO.	72
FIG. 29. GRÁFICOS DE BARRA PARA AS MEDIDAS DE TRABALHO DA FORÇA MUCOADESIVA DOS SISTEMAS INCORPORADOS OU NÃO COM <i>P</i> -AC, NA TEMPERATURA DE $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$. ANÁLISE TWO-way ANOVA E PÓS TESTE TUKEY COM $\alpha = 0,05$, SENDO $*p<0,05$ PARA OS SISTEMAS P24 E $^{+}p<0,05$ PARA OS SISTEMAS P29. ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE RESULTADOS DO MESMO SISTEMA COM E SEM <i>P</i> -AC. SÍMBOLOS IGUAIS INDICAM VALORES MÉDIOS SEM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.	74
FIG. 30. VARREDURA DE ESPECTRO DE <i>P</i> -AC QUANDO DILUÍDO EM METANOL E NA FASE MÓVEL.	76
FIG. 31. CROMATOGRAMAS DO ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO NA CONCENTRAÇÃO DE 50MG.ML^{-1} , OBTIDOS PELO MÉTODO PROPOSTO EM METANOL (A) E EM MEIO RECEPTOR (B).	78
FIG. 32. CURVAS PADRÃO DE ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO EM MEIO RECEPTOR COM INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO DE $0,5 - 7,0 \text{MG.ML}^{-1}$ OBTIDA POR CLAE.	78
FIG. 33. CURVAS PADRÃO DE ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO EM METANOL COM INTERVALO DE CONCENTRAÇÃO DE $0,5-7,0\text{MG.ML}^{-1}$ OBTIDA POR CLAE.	79
FIG. 34. SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE SELETIVIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DESENVOLVIDOS PARA O ÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO.	80
FIG. 35. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO <i>P</i> -AC (%) DOS DIFERENTES SISTEMAS AVALIADOS DURANTE UM ENSAIO DE 12H.	84
FIG. 36. PERFIL DE PERMEAÇÃO EX-VIVO (%) DO <i>P</i> -AC, EM MUCOSA VAGINAL SUÍNA, QUANDO INCORPORADO EM DIFERENTES MATRIZES, DURANTE UM ENSAIO DE 12H.	88
FIG. 37. RETENÇÃO DO <i>P</i> -AC (%) NA MUCOSA SUÍNA APÓS 12 HORAS DE EXPERIMENTO. ANÁLISE ONE-way ANOVA E PÓS TESTE TUKEY COM $\alpha = 0,05$, SENDO SÍMBOLOS IGUAIS INDICAM VALORES MÉDIOS SEM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.	90
FIG. 38. LEITURA DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS BIOFILMES DE <i>CANDIDA</i> SPP TRATADOS COM <i>P</i> -AC LIVRE, ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL, A PARTIR DA QUANTIFICAÇÃO POR XTT.	91
FIG. 39. REGIÕES VAGINAIS DE FÊMEAS DE SWISS PARA VISUALIZAÇÃO DO ESTADO DE PSEUDOESTRO E DE SINAIS DE INFECÇÃO. A IMAGEM A MOSTRA A REGIÃO GENITAL COM ASPECTO NORMAL, EM SWISS SADI. A IMAGEM B MOSTRA A REGIÃO GENITAL DE UM ANIMAL INFECTADO EM FASE DE ESTRO, NO INÍCIO DO TRATAMENTO, ONDE AINDA É POSSÍVEL OBSERVAR EDEMA E LIGEIRO ERITEMA. JÁ A IMAGEM C MOSTRA UM ANIMAL INFECTADO NÃO TRATADO, COM REGIÃO ERITEMATOSA E COM SECREÇÃO VINDA DO CANAL VAGINAL (CONFORME APRESENTADO POR BYERS <i>ET AL.</i> , 2012 E SENA, 2013).	95
FIG. 40. FORMULAÇÕES P24 (A) E P29 (B) INCORPORADAS COM <i>P</i> -AC, NOS CANAIS VAGINAIS DE FÊMEAS SWISS.	98
FIG. 41. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE NEGATIVO, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB 40x.....	OBJETIVA DE 99

FIG. 42. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE POSITIVO, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	
40X.....			99
FIG. 43. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO TRATAMENTO P24+ FLUCO, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.
.....			99
FIG. 44. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO TRATAMENTO P29+ FLUCO, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.
.....			99
FIG. 45. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE P24, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB		DE	40X.
OBJETIVA			99
FIG. 46. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE P29, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB		DE	40X.
OBJETIVA			99
FIG. 47. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO TRATAMENTO P24+ P-AC, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.....
			100
FIG. 48. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO TRATAMENTO P29+ P-AC, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.....
			100
FIG. 49. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE P-AC LIVRE, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.....
			100
FIG. 50. LEITURA MICROSCÓPICA DOS LAVADOS DO CONTROLE DO SOLVENTE DMSO, EM COLORAÇÃO DE GIEMSA, SOB	OBJETIVA	DE	40X.
.....			100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> SPP.	22
TABELA 2. RELAÇÃO DOS ESTÁGIOS DA INFECÇÃO COM A ATIVIDADE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA (ADAPTADO DE NAGLIK <i>ET AL.</i> , 2003).	29
TABELA 3. COMPOSIÇÃO DO MUCO VAGINAL ARTIFICIAL	43
TABELA 4. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS UTILIZADOS NO ENSAIO <i>IN VIVO</i> DE VVC.	52
TABELA 5. APRESENTAÇÃO DAS FORMULAÇÕES SELECIONADAS, SUAS COMPOSIÇÕES, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E VISUAIS EMPREGANDO TEA-OLEATO.	56
TABELA 6. APRESENTAÇÃO DAS FORMULAÇÕES SELECIONADAS, SUAS COMPOSIÇÕES, CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E VISUAIS EMPREGANDO TEA.	56
TABELA 7. FORMULAÇÕES PRÉ-SELECIONADAS COMO POSSÍVEIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE P-AC.	58
TABELA 8. VALORES DE ÍNDICE DE FLUXO (N) E ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (K) À $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	66
TABELA 9. VALORES DA RESISTÊNCIA DO GEL (S) E DO EXPOENTE VISCOELÁSTICO (H) PARA AS FORMULAÇÕES ANALISADAS.	70
TABELA 10. PARÂMETROS ANALISADOS PARA AVALIAR A ADEQUABILIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA ANÁLISE DE P-AC EM METANOL.	76
TABELA 11. PARÂMETROS ANALISADOS PARA AVALIAR A ADEQUABILIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA ANÁLISE DE P-AC EM MEIO RECEPTOR.	77
TABELA 12. RESULTADO DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO POR ANOVA FATOR ÚNICO PARA A REGRESSÃO LINEAR DAS CURVAS CONSTRUÍDAS.	79
TABELA 13. EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE P-AC NO SISTEMA P24 TEA-OLEATO DILUÍDO EM METANOL.	80
TABELA 14. EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE P-AC NO SISTEMA P29 TEA-OLEATO DILUÍDO EM METANOL.	81
TABELA 15. EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE P-AC NO SISTEMA P24 TEA-OLEATO DILUÍDO EM SOLUÇÃO RECEPTORA.	81
TABELA 16. EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE P-AC NO SISTEMA P24 TEA-OLEATO DILUÍDO EM SOLUÇÃO RECEPTORA.	81
TABELA 17. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTRA-DIA OU REPRODUTIBILIDADE.	81
TABELA 18. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTER-DIA OU INTERMEDIÁRIA.	82
TABELA 19. ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO DE P-AC EM METANOL.	82
TABELA 20. ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO DE P-AC EM MEIO RECEPTOR.	82
TABELA 21. REPRESENTAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA LD E LQ.	83
TABELA 22. TEOR DE P-AC (%) OBTIDO NOS CRISTAIS LÍQUIDOS DA FORMULAÇÃO 24 TEA-OLEATO.	83
TABELA 23. TEOR DE P-AC (%) OBTIDO NOS CRISTAIS LÍQUIDOS DA FORMULAÇÃO 29 TEA-OLEATO.	83
TABELA 24. PERCENTUAL DE P-AC LIBERADO A PARTIR DAS FORMULAÇÕES APÓS 12 HORAS DE ENSAIO.	84
TABELA 25. VALORES DE R^2 REFERENTES AOS DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS, CALCULADOS PARA O ESTUDO LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO P-AC A PARTIR DAS FORMULAÇÕES SELECIONADAS	85
TABELA 26. PERCENTUAL DE P-AC PERMEADO A PARTIR DAS FORMULAÇÕES APÓS 12 HORAS DE ENSAIO.	89
TABELA 27. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS SISTEMAS INCORPORADOS COM P-AC E FLUCONAZOL CONTRA BIOFILMES DE <i>CANDIDA</i> . OS VALORES REPRESENTAM A PORCENTAGEM DE BIOFILME ERRADICADA APÓS OS TRATAMENTOS.	93
TABELA 28. LOG UFC.ML ⁻¹ DOS LAVADOS VAGINAIS DO PRIMEIRO DIA DE TRATAMENTO AO ÚLTIMO DIA DE TRATAMENTO DE ANIMAIS INFECTADOS COM $2,5 \times 10^8$ CÉLULAS .ML ⁻¹ DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> SC5314, N = 5. OS RESULTADOS ESTÃO DESCRITOS COMO MÉDIA DOS VALORES DE CFU OBTIDOS POR GRUPO $\pm$ DESVIOS PADRÕES DAS MÉDIAS.	96

LISTA DE ABREVIATURAS

A.O. - Fase Oleosa

CLs – Cristais Líquidos

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Col. – Colesterol

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CFM - Concentração Mínima Fungicida

CVV - Candidíase Vulvovaginal

CVVR - Candidíase Vulvovaginal Recorrente

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão relativo

DMSO - Dimetilsulfóxido

Down-curve – Curva descendente

TEA-Oleato – Oleato de trietanolamina

F.A. – Fase aquosa

Fluco - Fluconazol

G' - Módulo de armazenamento

G'' - Módulo de perda

K – Índice de consistência

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MLP - Microscopia de Luz Polarizada

MVA - Muco Vaginal Artificial

η – Índice de escoamento

Pa – Pascal

p-AC ou *p*-CA – ácido *p*-cumárico

SF - Separação de Fase

SLC – Sistemas líquido cristalinos

SLT – Sistema líquido transparente

SLTL – Sistema líquido translúcido

SLO – Sistema líquido opaco

SVT – Sistema viscoso transparente

SVTL – Sistema viscoso translúcido

SVO- Sistema viscoso opaco

TEA - Trietanolamina

TPA - Análise de perfil de textura

XTT- 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

Up – curve – Curva ascendente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Candidíase Vulvovaginal	18
2.2. Microbiologia das espécies do gênero <i>Candida</i> spp.	20
2.3. Patogenicidade e fatores de virulência.....	22
2.3.1. Adesão.....	23
2.3.2. Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares	25
2.3.3. Formação de biofilme e hifas.....	27
2.4. Tratamento da candidíase vulvovaginal.....	30
2.4.1. Resistência das espécies de <i>Candida</i> spp. contra antifúngicos convencionais	31
2.2. Ácido <i>p</i> -cumárico e suas propriedades	33
2.3. Cristais Líquidos e aplicação vaginal.....	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Materiais.....	39
4.2. Equipamentos.....	41
4.3. Microrganismos	41
4.4. Métodos	41
4.4.1. Preparo das formulações	41
4.4.2. Construção dos diagramas de fases	42
4.4.3. Seleção das formulações a partir do diagramas de fases	43
4.4.4. Caracterização físico-química dos sistemas liquido-cristalinos	43
4.4.5. Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação do ácido <i>p</i> - cumárico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
4.4.6. Avaliação do perfil de liberação do ácido <i>p</i> -cumárico <i>in vitro</i>	48
4.4.7. Avaliação da permeação cutânea do ácido <i>p</i> -cumárico <i>ex vivo</i>	49
4.4.8. Avaliação da retenção do ácido <i>p</i> -cumárico em mucosa suína	49
4.5. Ensaios biológicos.....	50
4.5.1. Obtenção das cepas e condições de crescimento.....	50
4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	50
4.5.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	51
4.5.4. Formação de biofilme.....	51
4.5.5. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes de <i>Candida</i> spp.	51
4.5.6. CVV experimental e ensaio terapêutico <i>in vivo</i> utilizando modelo murino	52
4.5.7. Análise da eficácia do tratamento.....	53
4.6. Análise estatística	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Construção dos diagramas de fases.....	54
5.3. Pré-seleção das formulações.....	56
5.4. Microscopia de luz polarizada.....	58
5.5. Comportamento reológico	61
5.5.1. Análise reológica contínua	62
5.5.2. Análise oscilatória.....	67
5.6. Análise de perfil de textura (TPA).....	71
5.7. Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva	73
5.8. Desenvolvimento do método analítico por CLAE para determinação do ácido <i>p</i> -cumárico.....	75

5.8.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do p-AC no espectro ultravioleta-visível (UV-Vis).....	75
5.8.2. Adequabilidade	76
5.8.3. Linearidade	77
5.8.4. Especificidade e Seletividade.....	79
5.8.5. Exatidão	80
5.8.6. Precisão.....	81
5.8.7. Robustez	82
5.8.8. Limite de detecção e Limite de quantificação	83
5.8.9. Determinação do teor (%) de fármaco nos cristais líquidos.....	83
5.9. Perfil de liberação in vitro do ácido p-cumárico	84
5.10. Avaliação da permeação e retenção in vitro do ácido p-cumárico	88
6. Ensaios biológicos	90
6.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias e fungicidas	90
6.2. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	91
6.3. Avaliação dos resultados dos ensaios terapêuticos in vivo.....	93
6.5. Análise citológica do conteúdo vaginal	98
7. CONCLUSÕES.....	101
8. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e da vagina, causada por fungos comensais das mucosas vaginal e digestiva, os quais, devido a alterações do ambiente vaginal, tornam-se patogênicos. De acordo com Fidel (2002) e Holanda *et al.* (2007), é também considerada uma das formas mais comuns de infecções fúngicas oportunistas e o tipo mais comum de vaginite aguda nos países tropicais. A CVV atinge cerca de 75% das mulheres entre a fase da puberdade e a menopausa, pelo menos uma vez na vida, sendo que aproximadamente 50% dessas apresentam ao menos um episódio de recidiva da doença. A maioria dos fungos relacionados a essa patologia pertence ao gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* responsável por cerca de 90% dos casos de CVV. (MINOOEIANHAGHIGHI; SEPEHRIAN ; SHOKRI, 2017; BHESANIA ; NARA-YANKHEDKAR, 2017).

O tratamento da CVV apresenta limitações relacionadas ao uso indiscriminado dos antifúngicos, efeitos adversos, toxicidade e interações medicamentosas, proporcionando o desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos (PAZ-CRISTOBAL *et al.*, 2013). Deste modo, o estudo de moléculas bioativas de fontes naturais capazes de superar tais limitações, se faz extremamente necessário. Dentre essas moléculas, os compostos fenólicos se destacam como uma promissora classe de agentes antifúngicos naturais, visto que há muitos estudos demonstrando a atividade antimicrobiana de uma variedade destes metabólitos, como é o caso do ácido *p*-cumárico (*p*-AC).

O *p*-AC é um ácido hidroxicinâmico que pertence a uma classe importante de metabólitos secundários amplamente encontrados em plantas superiores e também em bebidas, como chás, vinhos e café (TEODORO *et al.*, 2015). Grande parte do interesse no *p*-AC está relacionado às suas atividades antioxidante e antitumoral (ZANG *et al.*, 2000; ESPINOSA *et al.*, 2015), entretanto, sua baixa toxicidade, facilidade de ser encontrado na natureza e ação antimicrobiana faz dele um componente vantajoso para ser utilizado no tratamento de CVV (PEI *et al.*, 2016). Todavia, as propriedades biológicas do *p*-AC podem ser afetadas pela sua baixa solubilidade em solventes aquosos (FERREIRA *et al.*, 2018), o que resulta em sua baixa biodisponibilidade oral. Dessa forma, a fim de superar este obstáculo, estratégias nanotecnológicas são necessárias para aprimorar a utilização deste composto fenólico no tratamento da CVV.

Sistemas de liberação de fármacos (SLF) são alternativas promissoras para a administração vaginal de fármacos hidrofóbicos, uma vez que a liberação sustentada tende a diminuir sua toxicidade, melhorar a estabilidade físico-química, aumentar o tempo de permanência no local alvo, reduzir os efeitos adversos e assim, contribuir para a adesão do paciente ao tratamento (KOLENYAK-SANTOS

et al., 2015). Um exemplo de SLF são os cristais líquidos (CLs), os quais apresentam propriedades de líquidos como fluidez, mobilidade e regiões desorganizadas, mas também de sólidos, como rigidez, ordem estrutural e ligações definidas (CHORILLI *et al.*, 2009). Tratando-se da aplicação vaginal, é interessante que esses sistemas apresentem propriedades mucoadesivas, de modo a evitar o vazamento das formulações devido à diluição do sistema em contato com as secreções vaginais ou à ação auto-limpante do trato vaginal (OKADA; HILLERY, 2001; PEREIRA; BRUSCHI, 2011). Para isso, polímeros podem ser adicionados à fase aquosa, como é o caso do Poloxamer 407, um copolímero tri-bloco que consiste em um bloco hidrofóbico central de polipropileno glicol, flanqueado por dois blocos hidrofílicos de polietileno glicol (PEG) e que, em concentrações entre 20-30% gelifica à temperatura ambiente e corporal, mas liquefaz quando resfriado a 4°C (BENTLEY *et al.*, 1999; CAFAGGI *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2015).

Portanto, tendo em vista os efeitos adversos causados pelo atual tratamento convencional de CVV a base de antifúngicos, pretendeu-se avaliar se o potencial antifúngico do ácido *p*-cumárico incorporado em sistemas líquido-cristalinos contra cepas de *Candida* spp. Suas propriedades biológicas fazem dele um componente vantajoso para ser utilizado, ademais, não há relatos na literatura de sua incorporação em cristais líquidos, a qual pode promover uma ação sinérgica, aumentando a atividade antifúngica deste composto fenólico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Candidíase Vulvovaginal

Infecções fúngicas ginecológicas como a candidíase vulvovaginal (CVV) afetam mulheres de todas as idades e podem ser desencadeadas devido a vários fatores, como: características sócio-demográficas, imunossupressão, diabetes mellitus, falta de higiene pessoal, condições genéticas, o uso de antibióticos e contraceptivos orais, atividades sexuais e até gravidez, entretanto, a maioria dos episódios não apresenta um gatilho identificável (NYIRJESY; SOBEL, 2003; DOVNIK *et al.*, 2015; BITEW; ABEBAW, 2018).

A CVV é uma infecção da vulva e da vagina, causada por fungos comensais das mucosas vaginal e digestiva, os quais, devido à alterações do ambiente vaginal, tornam-se patogênicos (DOVNIK *et al.*, 2015). É considerada uma das formas mais comuns de infecções fúngicas oportunistas e consequentemente um dos diagnósticos mais frequentes na área ginecológica (FIDEL, 2002; DEL-CURA *et al.*, 2011). A CVV é causada por fungos do gênero *Candida* spp., podendo ser cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral. Os sintomas mais comuns são dor ardente e prurido da vulva, podendo causar desconforto ao urinar e dispareunia em casos mais graves, além de mulheres também

reportarem perda de confiança, autoestima e incapacidade de continuar com suas atividades físicas normais (DENNING *et al.*, 2018). Dentre as variadas espécies que compõem esse gênero, 80-90% das infecções são causadas por *Candida albicans*, contudo nos últimos anos, houve um aumento no número de casos envolvendo outras espécies, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* (NYIRJESY, 2001; HOLANDA *et al.*, 2007; SARDI *et al.*, 2013). A patogenicidade dessas espécies é dada por meio de fatores de virulência que auxiliam na invasão do tecido hospedeiro ao mesmo tempo que protegem o microrganismo dos mecanismos de defesa do sistema imune (CALDERONE; FONZI, 2001; SILVA *et al.*, 2012).

Por não ser uma doença sempre relatada, muitos dados sobre a incidência de CVV são incompletos ou baseados em estudos epidemiológicos que utilizam populações não representativas (GONÇALVES *et al.*, 2016). Em escala global, é considerada como a segunda maior causa de vaginite, logo depois da vaginite bacteriana (ANDERSON, 2004). Na literatura, os casos de CVV são classificados de duas maneiras: não complicados e complicados (PAPPAS *et al.*, 2009; ACHKAR; FRIES, 2010). A CVV não complicada é caracterizada por menos de quatro episódios por ano, com gravidade leve a moderada, causada por *C. albicans* em mulheres aparentemente saudáveis. A CVV complicada inclui casos mais graves causados por outras espécies do gênero, como por exemplo a candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), caracterizada por quatro ou mais episódios por ano com ocorrência devido aos fatores de risco supracitados (gravidez, diabetes e imunossupressão) (PAPPAS *et al.*, 2009; ACHKAR; FRIES, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2016). Estima-se que 70-75% das mulheres irão apresentar CVV em algum momento durante a vida, 50% dessas mulheres infectadas inicialmente, irão sofrer um segundo caso de CVV e 5-10% desenvolverão CVVR (SOBEL, 2007).

A CVV é considerada um importante problema de saúde pública, pois embora não esteja associada à mortalidade, a morbidade relacionada à mesma, torna-a uma das principais causas de dor, grande desconforto, autoestima alterada e ansiedade, prejudicando o desempenho no trabalho e interferindo nas relações afetivas e sexuais (SOBEL, 2007). Outro problema também associado à infecção são os elevados custos econômicos, pois estima-se que, em 2013 o mercado global para produtos ginecológicos destinados aos tratamento de CVV foi de US\$ 600 milhões (DENNING *et al.*, 2018). BENEDICT *et al.* (2019), fizeram um levantamento para estimar o valor nacional de custos médicos associados à doenças fúngicas, na perspectiva de um prestador de serviços de saúde nos Estados Unidos. A partir dos dados coletados, todos os custos foram ajustados para valores em dólares referentes a 2017. De acordo com os autores, o gasto nacional com pacientes ambulatoriais e hospitalizados devido à candidíase vaginal foi de US\$ 368 milhões.

Por outro lado, caso não seja tratada, a CVV pode desencadear uma série de complicações como doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica, abscesso pélvico, aborto espontâneo e distúrbios menstruais (GONÇALVES *et al.*, 2016).

2.2. Microbiologia das espécies do gênero *Candida* spp.

O gênero *Candida* spp. têm ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrado em humanos, animais domésticos e selvagens (SIDRIM; ROCHA, 2004). Por pertencer à flora normal dos seres humanos, as espécies de *Candida* são organismos comensais caracterizados como oportunistas, pois podem mudar de inofensivos para patogênicos com a variação das condições do hospedeiro (ASCIOGLU *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2016). São capazes de colonizar as mucosas dos tratos genital, urinário, respiratório e gastrointestinal, além da cavidade oral, unhas, couro cabeludo e pele (DIGNANI *et al.*, 2009). Lactobacilos, estrogênio e repostas imunes são elementos importantes para a manutenção da microflora vaginal, como mecanismo de defesa do corpo, pois eles mantêm um equilíbrio entre a taxa de leveduras de *Candida* permitindo que as mesmas permaneçam como comensais vaginais, evitando possíveis alterações no ambiente vaginal do hospedeiro que possam desencadear a CVV (FERRER, 2000; NYIRJESY; SOBEL, 2003).

As espécies mais comuns de *Candida* associadas à CVV são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, respectivamente nesta ordem de importância (FERRER, 2000; BLOSTEIN *et al.*, 2017;). Como dito anteriormente, *C. albicans* é de longe a espécie mais comum identificada em mulheres com CVV (80-90% dos casos), seguida por *C. glabrata* (5 -15% dos casos). Outras espécies como *C. tropicalis* e *C. krusei* também podem ser encontradas em aprox. 5% dos casos, já a *C. parapsilosis* raramente é identificada e é uma das espécies menos virulentas do gênero (FERRER, 2000; KENNEDY e SOBEL, 2010; SILVA *et al.*, 2011). A partir dos isolados de pacientes, normalmente, uma única espécie é identificada, porém já foram encontrados casos de mulheres com CVV infectadas por duas ou mais espécies (1-10%), em sua maioria, infecções mistas causadas por uma associação entre *C. albicans* e *C. glabrata* (RICHTER *et al.*, 2005; PAULITSCH *et al.*, 2006; CETIN *et al.*, 2007; AMOURI *et al.*, 2011; MAHMOUDI *et al.*, 2011).

O gênero *Candida* spp. pode ser encontrado no ambiente hospedeiro na forma filamentosa ou leveduriforme (THOMPSON *et al.*, 2011). Sob condições ideais de nutrientes e temperatura, a maioria das espécies cresce por brotamento na forma de blastoconídios, com formato esférico/oval e medem aproximadamente $2-5 \times 3-7 \mu\text{m}$ (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1995; SILVA *et al.*, 2012). Durante a infecção, a forma de levedura (blastosporos) permite a rápida disseminação pelas mucosas através de fluidos corporais (como saliva, secreções vaginais e água no trato gastrointestinal), podendo chegar até mesmo à corrente sanguínea. Já a formação de hifas auxilia na fixação

do fungo, formação de biofilme, evasão imunológica e invasão de células epiteliais, como também de outros tecidos (THOMPSON *et al.*, 2011).

C. albicans é um organismo polimórfico, com células de tamanho entre $4\mu\text{m}$ - $6\mu\text{m}$, capaz de crescer tanto na forma filamentosa (como hifas e/ou pseudo-hifas), como na forma leveduriforme (blastosporos). De maneira oposta, *C. glabrata* possui um tamanho celular consideravelmente menor que todas as outras espécies ($1\mu\text{m}$ - $4\mu\text{m}$) e não é um organismo polimórfico, visto que seu crescimento ocorre apenas com a formação de blastosporos. As espécies *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* produzem tanto blastosporos quanto pseudo-hifas, e suas células possuem respectivamente tamanhos celulares de $4\mu\text{m}$ - $8\mu\text{m}$; $2\mu\text{m}$ - $6\mu\text{m}$ e $2,5\mu\text{m}$ - $9\mu\text{m}$ (SILVA *et al.*, 2012).

Na figura 1 estão representadas as diferentes formas de crescimento morfológico das espécies de *Candida*. Os blastosporos são esporos assexuados formados por brotamento ou gemulação e que representam a forma leveduriforme. As pseudo-hifas são células de levedura que se multiplicaram e permaneceram unidas, assim cada novo crescimento permanece ligado à célula-mãe, alongando-se, o que resulta em filamentos com constrições nas junções célula-célula. Já as hifas são filamentos de células que se iniciam a partir de um tubo germinativo, alongam-se e se ramificam com septos definidos, os quais dividem as hifas em unidades fúngicas separadas (SILVA *et al.*, 2012).



Fig. 1. Principais morfologias das espécies do gênero *Candida* spp.

Fonte: Adaptado de Thompson *et al.*, 2011.

Para o isolamento e cultivo das leveduras, há vários meios de cultura disponíveis, os quais são utilizados de acordo com a finalidade do cultivo, seja para o crescimento das células, formação do tubo de germinação, produção de clamidósporos, identificação morfológica, atividade hemolítica, formação de biofilme ou susceptibilidade antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2011). Dentre esses meios, estão o ágar-sangue, ágar de batata-dextrose (PDA) ou caldo (PDB), Ágar infusão Cérebro e Coração (BHI), ágar Sabouraud dextrose (SDA) ou caldo (SDB), base de nitrogênio de levedura (YNB), ágar ou caldo de levedura de batata dextrose (YPD), meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e o meio CHROMagar. Quando cultivadas nos meios SDA e YPD, as colônias geralmente são de coloração creme-amarelada, e dependendo da espécie, a textura da colônia pode ser lisa ou enrugada/áspera, brilhante ou opaca, cremosa ou seca. Para uma

maior seletividade e identificação, meios como o CHROMagar podem ser utilizados, pois diferenciam cada espécie a partir de uma coloração específica (Figura 2) (RODRIGUES *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2011 SILVA *et al.*, 2012). A tabela 1 apresenta as características morfológicas das cinco espécies supracitadas, desde suas formas de crescimento até a cor das colônias.

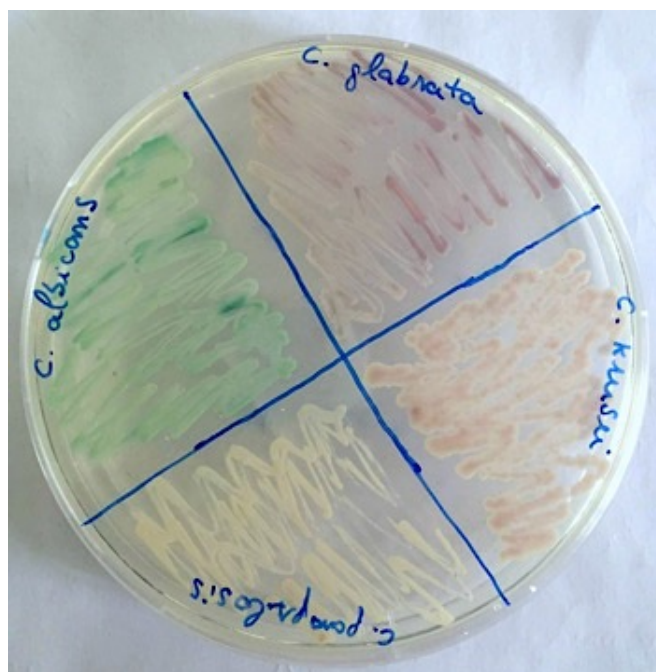


Fig. 2. Coloração de colônias via cultivo em CHROMagar.

Fonte: Fotografia tirada pela autora.

Tabela 1. Características morfológicas de espécies de *Candida* spp.

Espécie	Blastosporos/ leveduras	Pseudo-hifas	Hifas	Tamanho das células (μm)	Cor da colônia em CHROMagar	Morfologia da colônia
<i>C. albicans</i>	+	+	+	4 - 6	verde	lisa e brilhante
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	1 - 4	rosa/roxo	lisa e brilhante
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+/-	4 - 8	azul / azul escuro	lisa e/ou enrugada cremosa e brilhante
<i>C. krusei</i>	+	+	-	2 - 6	rosa claro/pálido	áspera e opaca
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	2,5 - 9	branco/creme	lisa e brilhante com borda micelial

2.3. Patogenicidade e fatores de virulência

Para que o processo de infecção das leveduras seja invasivo e efetivo, há uma série de fatores de virulência fundamentais para a indução do mecanismo de patogenicidade das espécies de *Candida*. Dentre eles, destacam-se a habilidade de adesão do microrganismo, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, o desenvolvimento de hifas e/ou pseudo-hifas, formação de biofilme e

variabilidade fenotípica (switching) e genética (HAZEN *et al.*, 1986; CALDERONE; FONZI, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2016).

2.3.1. Adesão

O primeiro estágio para a sobrevivência e proliferação das leveduras é a adesão dessas células no organismo hospedeiro ou em superfícies médico-hospitalares (para formação de biofilme) (CHANDRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2011). A interação inicial entre o microrganismo e a superfície de contato, e consequentemente sua aderência à ela, dependem de fatores como: as propriedades físico-químicas da superfície celular (ex: hidrofobicidade) e o perfil de proteínas da parede celular do fungo (HAZEN *et al.*, 1986; CHAFFIN, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

Espécies de *Candida* são capazes de reconhecer receptores nas membranas celulares do epitélio vaginal por meio da ancoragem de proteínas específicas de sua parede celular, também conhecidas como adesinas (FERRER, 2000; VERSTREPEN; KLIS, 2006). Alguns dos ligantes do hospedeiro reconhecidos pelas adesinas são proteínas e componentes séricos da matriz extracelular dos tecidos hospedeiros, como por exemplo: laminina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno, vitronectina e entactina (CHAFFIN, 2008). Por ser a mais prevalente nos casos de CVV, há uma grande variedade de estudos relacionados às adesinas presentes na *C. albicans*. Múltiplas proteínas dessa espécie foram detectadas como adesinas para os ligantes supracitados, e várias das adesinas interagem com mais de um ligante. Dentre os grupos principais, estão: a família de proteínas ALS (agglutinin-like sequence) e a família de proteínas HWP (hyphal wall protein), principalmente a adesina Hwp1p (CALDERONE; FONZI, 2001; CHAFFIN, 2008). As adesinas ALS são um grupo de proteínas glicosiladas formada por oito membros (ALS1-7, 9), os quais exercem o papel principal na aderência de *C. albicans* às células do hospedeiro, e a expressão de cada gene ALS depende do local de infecção e do modelo utilizado para estudo (VERSTREPEN; KLIS, 2006; CHENG *et al.*, 2005). A Als1p, uma proteína da parede celular pertencente à família ALS, foi descrita como sendo fundamental a aderência de *C. albicans* e formação inicial do tubo de germinação. Já a Als5p liga-se às proteínas de matriz extracelular (CHAFFIN, 2008). Em modelos de CVV, as adesinas mais expressas são ALS2, ALS3, ALS6, ALS7 e ALS9, porém a expressão dos membros ALS4 e ALS5 é reprimida. Já em amostras de candidíase oral, as adesinas mais expressas são as ALS1-5 e ALS9, enquanto que as reprimidas são as ALS6 e ALS7. (GREEN *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2005).

Depois da *C. albicans*, a *C. glabrata* é a segunda espécie mais estudada em relação às adesinas. A capacidade de adesão dessa espécie se dá pela expressão de uma adesina epitelial (EPA), a qual é induzida pela presença de ácido nicotínico e ocorre na superfície das células (MA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011). Já foram identificados 23 genes de parede celular da *C. glabrata* que codificam

adesinas epiteliais, porém apenas três (EPA1, EPA6 e EPA7) apresentaram ação importante na adesão do fungo (CORMACK *et al.*, 1999; GROOT *et al.*, 2008). Dentre essas, verificou-se que a Epa1p media a ligação entre a levedura e células imunes inatas, além de que sua deleção promove uma redução da adesão *in vitro* (DE LAS PENAS *et al.*, 2003; KUHN; VYAS, 2012). Ademais, embora o EPA6 não seja expresso *in vitro*, sua expressão aumenta durante a infecção do trato urinário *in vivo*, sugerindo que *C. glabrata* é capaz de se adaptar às diferentes condições ambientais (DOMERGUE *et al.*, 2005).

Para as outras espécies do gênero, as pesquisas sobre adesinas ainda são em menor número. A presença de genes do tipo ALS foi confirmada em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, assim como homólogos de Rbt-1, gene responsável pela expressão de proteínas da superfície celular associadas à hifa em *C. albicans* (GROOT *et al.*, 2013). Também foram identificados 11 genes relacionados a proteínas adesinas da parede celular em *C. parapsilosis* e, pelo menos, três proteínas Als na *C. tropicalis* (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Uma vez que o gênero *Candida* spp. é capaz de colonizar não apenas tecidos vivos, mas também superfícies inertes, como cateteres venosos urinários e centrais, marca-passos, válvulas cardíacas mecânicas, próteses articulares, lentes de contato e dentaduras, torna-se pouco provável que a adesão das leveduras a estes dispositivos médicos seja mediada pela interação receptor-adesina (KLOTZ *et al.*, 1985; GULATI; NOBILE, 2016). Dessa forma, propriedades gerais da superfície celular do fungo também foram investigadas, como é o caso da hidrofobicidade (HAZEN *et al.*, 1986; FIDEL *et al.*, 1999). Klotz e colaboradores (1985) demonstraram pela primeira vez que a aderência de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* em superfícies poliméricas ocorre graças às forças hidrofóbicas, como forças de Van der Waals, as quais podem ser influenciadas de acordo com o tamanho e forma das espécies. Já Hazen *et al.* (1986), em um estudo com 19 isolados de *C. albicans* e 4 de *C. glabrata* demonstraram que alterações nas condições de crescimento, como na composição do meio de cultivo ou temperatura, podem influenciar o grau de hidrofobicidade das leveduras, principalmente o da *C. albicans*. Esta espécie apresentou uma cinética de crescimento mais rápida e maior ligação às matrizes de fibrina e plaquetas quando cultivada à temperatura ambiente, e não à 37°C (temperatura do ambiente vaginal). Panagoda *et al.* (2001) observaram que a adesão inicial de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em superfícies acrílicas para dentaduras e células epiteliais bucais estava associada à hidrofobicidade da superfície celular. Alguns estudos comparando as cinco espécies relataram que *C. krusei* apresenta uma hidrofobicidade superficial maior que as outras espécies, consequentemente possui uma maior capacidade de colonizar superfícies inertes, como implantes e cateteres (KLOTZ *et al.*, 1985; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; SAMARANAYAKE *et al.*, 1995). MINAGI *et al.* (1986) também

apresentaram resultados semelhantes que indicaram que *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* têm maior hidrofobicidade na superfície celular que *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Após a adesão das leveduras, ocorre a germinação de blastosporos e o desenvolvimento de micélio ou hifas, os quais podem ser desencadeados por fatores exógenos, como por exemplo a presença de estrógeno no epitélio vaginal (FERRER, 2000).

2.3.2. Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares

Após o desenvolvimento do micélio, algumas espécies de *Candida* são capazes de penetrar, invadir e causar danos ao tecido vaginal, a partir da secreção de enzimas hidrolíticas (SCHALLER *et al.* 2005). As enzimas frequentemente envolvidas na virulência do gênero *Candida* spp. são as proteínas aspartil secretadas (SAPs), fosfolipases (PLs), proteases, lipases e hemolisinas (SCHALLER *et al.* 2005; SILVA *et al.*, 2011). As funções realizadas pelas SAPs durante o processo infeccioso envolvem a digestão de membranas celulares hospedeiras para facilitar a adesão do fungo e invasão tecidual, digestão das células e moléculas do sistema imunológico hospedeiro para evitar ou resistir a ataques antimicrobianos, além do básico que é a digestão para aquisição de nutrientes (PICHOVÁ *et al.*, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003). É sabido que algumas espécies do gênero *Candida* possuem uma grande expressão e atividade de SAPs, porém outras não. Enquanto que foram identificados dez genes SAP (1-10) para *C. albicans*, quatro para *C. tropicalis* (SAP1-4) e, pelo menos, duas para *C. parapsilosis* (SAP1-2), *C. glabrata* e *C. krusei* parecem apresentar atividade proteolítica baixa ou nula, assim como a produção e expressão de SAPs (CAPOBIANCO *et al.*, 1992; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; NAGLIK *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012). Há apenas um estudo que demonstra a capacidade de *C. glabrata* produzir proteinases, mas o tipo de proteinase permanece desconhecido (CHAKRABARTI *et al.*, 1992). Outro dado interessante é que Silva *et al.*, (2009a) demonstraram que a *C. parapsilosis* possui baixa capacidade invasiva no epitélio oral, porém ainda é capaz de induzir um dano significativo no tecido, graças à expressão de SAPs. A produção e atividade das proteínas aspartil secretadas podem estar associadas ao local em que a levedura foi isolada e a espécie em questão (MOHANDAS; BALLAL, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Em relação à ação das SAPs na mucosa vaginal, diferentemente de outras proteinases, essas apresentam atividade proteolítica sob condições ácidas (pH 4,0), recurso importante para a CVV, visto que o ambiente vaginal tem um pH em torno de 4, o que torna as condições favoráveis para ação dessas enzimas (SOBEL *et al.*, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2016). Há estudos que mostram uma maior expressão e atividade de SAPs em isolados vaginais de mulheres infectadas com CVV do que em mulheres assintomáticas portadoras de *Candida* (CASSONE *et al.*, 1987; GONÇALVES *et al.*, 2016). Devido a produção de SAPs estar relacionada a vários outros

atributos putativos de virulência nas espécies incluindo formação de hifas, adesão e troca fenotípica, sua expressão e regulação controlada levantam uma série de questões sobre os papéis e funções dessas proteinases durante o processo infeccioso (NAGLIK *et al.*, 2003).

Na literatura, diferentes fosfolipases já foram descritas como fatores de virulência para espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, e sugere-se que elas contribuam para danos à membrana celular do hospedeiro, o que pode causar a exposição de receptores que facilitem a adesão da levedura e consequentemente invasão do tecido (GHANNOUM, 2000; KANTARCIOLU; YUCEL, 2002). Fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídios em ácidos graxos e glicerol. Estudos iniciais sobre o tema eram conduzidos a partir do crescimento de leveduras em um meio de ágar de gema de ovo, porém os resultados obtidos a partir deste ensaio demonstravam que apenas *C. albicans* era capaz de produzir PLs extracelulares (SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; GHANNOUM, 2000). Contudo, em 1998, Clancy e colaboradores apresentaram um trabalho durante a 36ª reunião anual da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) no qual demonstravam a partir de ensaios colorimétricos e à base de gema de ovo que espécies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* produziram atividade fosfolipase detectável, mesmo que em níveis significativamente mais baixos do que aqueles detectados para *C. albicans* (GHANNOUM, 2000). Com o passar dos anos, mais estudos começaram a apresentar resultados que corroboram com a ideia de produção de PLs por espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (GALAN-LADERO *et al.*, 2010; MOHANDAS BALLAL, 2011). Entretanto, há também na literatura grupos de pesquisa que ao avaliar as mesmas cepas, não encontraram/detectaram atividade dessas enzimas (KANTARCIOLU; YUCEL, 2002).

Para *C. albicans*, das fosfolipases encontradas, as principais são: PLA, PLB, PLC, PLD e lisofosfolipases (Lyso-PL) (GHANNOUM, 2000; CALDERONE; FONZI, 2001). Estudos referentes à essas fosfolipases observaram que PLA, PLB e a lisofosfolipase-transacilase são produzidas por cepas virulentas, mas não comensais de *C. albicans*, aderem fortemente às células epiteliais e estão correlacionadas com a patogenicidade das cepas de isolados clínicos (IBRAHIM *et al.*, 1995). Naglik e colaboradores (2003) observaram a expressão de PLB1 e PLB2 em lavagens vaginais de mulheres infectadas por CVV e de portadoras assintomáticas de *Candida* na flora vaginal, onde os níveis encontrados foram mais baixos nas mulheres saudáveis. Já Alves *et al.* (2014) detectaram a expressão de famílias de PLB e PLD em epitélio vaginal humano reconstituído infectado com várias cepas de *C. albicans*, sendo a PLD1 a que apresentou o nível de expressão mais alto. Ao avaliar a expressão de PLs em *C. glabrata*, esta espécie apresentou atividade apenas para PLB e Lyso-PL (GHANNOUM, 2000).

As lipases estão envolvidas na hidrólise dos triacilgliceróis e assim como as SAPs e fosfolipases, suponha-se que seu papel no processo infeccioso também esteja relacionado com a adesão da levedura às células hospedeiras, a digestão lipídica para aquisição de nutrientes e o desencadeamento de cascatas inflamatórias (STEHR *et al.*, 2004; TÓTH *et al.*, 2015). Em *C. albicans* os genes encontrados que codificam lipases são LIP1-10, e sequências semelhantes foram encontradas para *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, mas nenhuma em *C. glabrata* (HUBE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2012). Já as hemolisinas são utilizadas pelo fungo para a recuperação de ferro, a partir da degradação de hemoglobinas, e são consideradas essenciais para a sobrevivência das leveduras e persistência no hospedeiro (LUO *et al.*, 2004). Luo e colaboradores (2002) examinaram 80 isolados de *Candida*, representando 14 espécies para avaliar suas respectivas respostas frente um teste hemolítico *in vitro*. A partir dos resultados, classificaram a capacidade das espécies de produzir hemolisinas de duas maneiras diferentes: α e β hemolisina, os quais denotavam hemólise incompleta e completa do meio de ágar sangue, respectivamente. Os autores observaram que oito espécies (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. zeylanoides*, e *C. lusitaniae*) demonstraram hemólise alfa e beta após 48 horas de inoculação, quatro espécies (*C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* e *C. utilis*) apresentaram somente hemólise alfa e duas espécies não demonstraram atividade hemolítica após incubação por 48 h ou mais (*C. parapsilosis* e *C. pelliculosa*). Kumar *et al.* (2009) realizaram um estudo que envolveu 62 isolados de *Candida* identificados como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Com exceção da *C. krusei*, todas as outras espécies apresentaram atividade hemolítica.

2.3.3. Formação de biofilme e hifas

A formação de biofilme é um forte fator de virulência para as leveduras de *Candida*, pois promove a proteção das células fúngicas contra respostas imunes do hospedeiro, confere tolerância à terapia antifúngica limitando a penetração de substâncias através da matriz de biofilme, além de também auxiliar resistindo à pressão competitiva de outros microrganismos (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; SILVA *et al.*, 2009b). Biofilmes são comunidades biológicas estruturadas, formadas por microrganismos associados à superfície e incorporados à uma matriz extracelular. Essa matriz é geralmente composta por água, carboidratos, glicoproteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; ZARNOWSKI *et al.*, 2014). Isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são capazes de formar biofilmes, e a presença deles durante a infecção é associada a maiores taxas de mortalidade em comparação com isolados incapazes de formar biofilmes (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; KUMAMOTO, 2002; SILVA *et al.*, 2009b).

Em um indivíduo saudável, a microbiota humana inclui bactérias e fungos que coexistem em equilíbrio, formando um ecossistema complexo. Caso este equilíbrio seja perturbado, há a possibilidade de ocorrer uma infecção, a qual acarretará na formação de biofilmes polimicrobianos (formados por mais de um tipo de organismo) graças à essa diversidade de microrganismos (GULATI; NOBILE, 2016). Muitas infecções, como as da cavidade oral, do trato urinário e infecções por cateter, são normalmente originárias ou resultantes de biofilmes polimicrobianos (PELEG *et al.*, 2010). Além da interação química e física entre microrganismos, sabe-se que quatorze proteínas extracelulares também causam impacto na formação, estrutura e manutenção dos biofilmes, as quais são referentes aos genes ALS1, ALS3, CHT2, CHT3, CSA1, CSH1, EAP1, MP65, PGA10, PHO100, RBT4, SAP9, SUN41 e YWP1 (CHAFFIN, 2008).

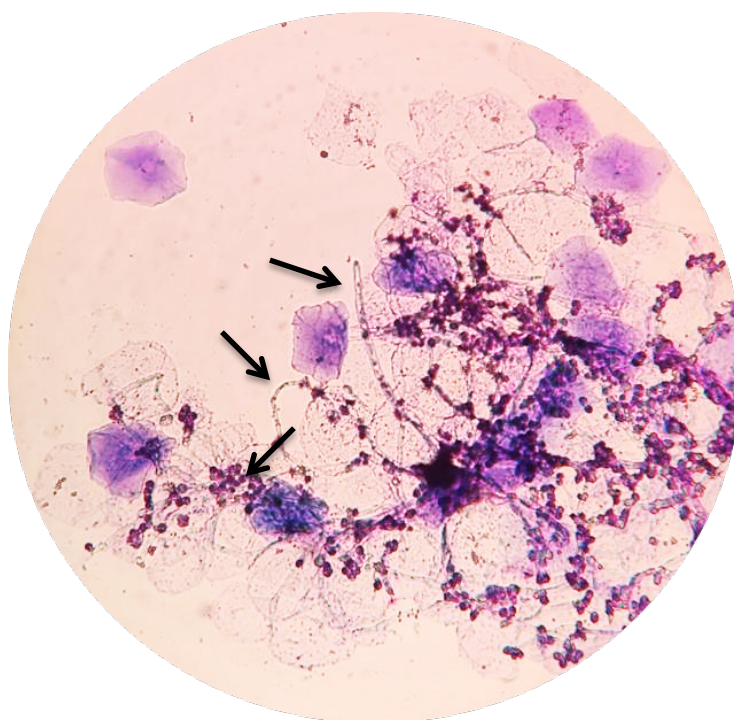
Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2009b), os biofilmes produzidos por diferentes cepas de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram caracterizados a partir da sua estrutura, morfologia e composição da matriz extracelular. De acordo com os resultados, os biofilmes maduros de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* consistiam em uma densa rede de células de várias morfologias. Algumas cepas de *C. parapsilosis* apresentaram biofilmes compostos por leveduras e pseudo-hifas, enquanto que outras cepas da mesma espécie formaram biofilmes desprovidos de pseudo-hifas. O mesmo ocorreu com a *C. tropicalis*, pois algumas cepas exibiram um biofilme formado apenas por leveduras, ao passo que outras apresentaram também hifas, com filamentos especialmente longos. Por fim, como esperado, todas as cepas de *C. glabrata* apresentaram biofilmes compostos apenas por formas leveduriforme. A estrutura dos biofilmes também variou de acordo com a estirpe e a espécie de *Candida*, pois algumas formaram biofilmes compactos, que cobriam toda a superfície, ou espessos com células co-agregadas, enquanto que outras apresentaram biofilmes constituídos por aglomerados de células.

Chandra *et al.*, (2001) classificaram os biofilmes maduros de *C. albicans* como altamente estruturados, formados por uma arquitetura heterogênea composta de células em forma de levedura, pseudo-hifas e hifas, envoltas em uma matriz extracelular (Figura 3). As hifas por sua vez, contribuem para a estabilidade estrutural do biofilme e atuam como suporte para células de leveduras, pseudo-hifas e outras células microbianas (no caso de biofilmes polimicrobianos). Outros autores também afirmam que as formas filamentosas dão mais força mecânica, melhoram a colonização e invasão dos tecidos hospedeiros e demonstram maior resistência à fagocitose. (KUMAMOTO; VINCES, 2005; SILVA *et al.*, 2012).

A fim de visualizar os itens descritos acima de uma maneira sucinta, na tabela 2 estão resumidos as fases envolvidas na infecção por *Candida* spp. e a contribuição dos fatores de virulência para a patogenicidade.

Tabela 2. Relação dos estágios da infecção com a atividade dos fatores de virulência (Adaptado de Naglik *et al.*, 2003).

Estágios da infecção	Ação das leveduras no hospedeiro	Fatores de virulência envolvidos
1. Colonização	Adesão epitelial e aquisição de nutrientes	Adesinas, enzimas hidrolíticas, formação de hifas e variabilidade fenotípica
2. Infecção superficial	Penetração epitelial e destruição das proteínas do hospedeiro	Enzimas hidrolíticas e formação de hifas
3. Infecção profunda	Penetração do tecido, invasão vascular e escape do sistema imune	Enzimas hidrolíticas e formação de hifas e talvez imunomoduladores
4. Infecção disseminada	Adesão endotelial, infecção de outros tecidos do hospedeiro, ativação da cascata de coagulação e coagulação do sangue	Adesinas, enzimas hidrolíticas, formação de hifas, talvez variabilidade fenotípica e imunomoduladores

**Fig. 3.** Biofilme de *Candida albicans* visto a partir de microscópio. As setas mostram a presença de blastosporos e hifas. As estruturas maiores de coloração roxa são células do epitélio vaginal.

Fonte: Fotografia tirada pela autora.

2.4. Tratamento da candidíase vulvovaginal

Atualmente há cinco classes de agentes antifúngicos utilizados no tratamento contra infecções causadas por *Candida* spp.: polienos, azóis, equinocandinas, alilaminas e flucitosina. A classificação desses medicamentos baseia-se no seu sítio alvo de ação. Os polienos, como é o caso da anfotericina B, interagem com o ergosterol presente na membrana celular da levedura gerando poros na mesma, e consequentemente o vazamento do conteúdo citoplasmático. Os azóis (ex: fluconazol, itraconazol, voriconazol, etc.) atuam inibindo a síntese do ergosterol, o que leva à depleção do esterol na membrana celular fúngica, causando danos funcionais e estruturais. As equinocandinas (ex: caspofungina) por sua vez, inibem a via de biossíntese de glicanos, causando uma depleção destes polímeros nas células fúngicas, enfraquecendo a parede celular. As alilaminas como a terbinafina, também atuam na síntese do ergosterol, causando ruptura da membrana plasmática e acúmulo de esqualeno. Por último, a flucitosina prejudica a síntese de ácidos nucleicos, interferindo também com a síntese de proteínas (SILVA *et al.*, 2012; NETT; ANDES, 2016; De OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2018). Entretanto, as terapias envolvendo esses antifúngicos possuem desvantagens relacionadas principalmente a efeitos colaterais, baixa biodisponibilidade ou espectro de ação, alta toxicidade em células humanas e o fato de que muitas espécies desse gênero estão adquirindo resistência aos tratamentos (CHANDRASEKAR, 2010; LIAO *et al.*, 2015; De OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2018).

A escolha de tratamento para CVV depende do diagnóstico do paciente, ou seja, se a CVV é considerada complicada ou não complicada. Para casos de candidíase não complicados, geralmente a terapia local por curto prazo ou oral em uma única dose são eficazes em 90% das vezes (SOBEL *et al.*, 1998; DOVNIK *et al.*, 2015). Para tratamento tópico, existe uma ampla gama de produtos disponíveis no mercado, como óvulos, pomadas e cremes vaginais, em sua grande parte incorporados por agentes azólicos. Os fármacos azólicos aplicados topicamente são mais eficazes que a nistatina e a recomendação para este tipo de terapia é de até três dias, pois é o tempo no qual os sintomas geralmente desaparecem e ocorre a cura da doença (DOVNIK *et al.*, 2015). Os principais efeitos colaterais da terapia tópica são: a queima localizada que alguns pacientes podem sofrer, (entre 5% e 10%) como resultado de uma reação alérgica ou irritante; e a oposição de alguns pacientes em utilizar formulações vaginais devido à falta de habilidade para aplicação das mesmas (SOBEL *et al.*, 1998; NYIRJESY; SOBEL, 2003). No geral, tanto antifúngicos azólicos de uso oral, quanto de uso tópicos são eficazes no tratamento de CVV não complicada, pois nenhum agente isolado parece ser claramente superior aos outros (PAPPAS *et al.*, 2009; DOVNIK *et al.*, 2015).

Tratando-se de CVV complicada ou casos de CVVR, pacientes com episódios graves de infecção sintomática são menos propensos a responder às terapias antifúngicas padrões, pois nestes casos, fatores envolvendo o microrganismo, o hospedeiro ou até mesmo o tratamento escolhido, afetam

adversamente a taxa de cura (SOBEL *et al.*, 1998; SOBEL *et al.*, 2001) A seleção do medicamento antimicótico apropriado, da via de administração e duração da terapia também podem afetar profundamente a resposta clínica e micológica (SOBEL *et al.*, 1998). Em pacientes com sintomas graves infectados por *C. albicans*, deve-se considerar um tempo de tratamento entre 7 e 14 dias usando formulações azólicas tópicas ou uma dose oral de fluconazol a cada três dias, totalizando 3 doses, com a finalidade de alcançar remissão clínica e status negativo para a cultura fúngica (SOBEL *et al.*, 1998; CDC, 2015). Há também a possibilidade de utilização de anfotericina B e/ou caspofungina (GULATI; NOBILE, 2016). Para casos de CVVR também envolvendo essa espécie, recomenda-se um regime maior de tratamento, iniciando com terapia oral por aproximadamente 14 dias, seguida de um regime de manutenção por 6 meses, para garantir a remissão clínica. Para uso oral podem ser utilizados cetoconazol, itraconazol e fluconazol diariamente e para o tratamento tópico, óvulos vaginais de clotrimazol semanalmente. (SOBEL *et al.*, 1998; CDC, 2015).

No entanto, infecções causadas por outras espécies do gênero *Candida* podem exigir a utilização de diferentes classes de antifúngicos que não os azóis, ou combinações farmacêuticas, por serem menos propensas à responder a terapia antifúngica azólica (NYIRJESY; SOBEL, 2003). As opções de tratamento variam de acordo com a espécie. Há descrições na literatura que recomendam administração vaginal de ácido bórico em uma cápsula de gelatina por 2 semanas para tratamento de *C. glabrata* e *C. krusei*, formulações vaginais de flucitosina para *C. glabrata* e *C. tropicalis* e também óvulos vaginais de anfotericina B para cepas de *C. glabrata* resistentes a azóis (SINGH *et al.*, 2002; NYIRJESY SOBEL, 2003; SOBEL *et al.*, 2003; PHILLIPS, 2005).

Com o propósito de minimizar a toxicidade dos antifúngicos e a resistência por parte das leveduras, certas estratégias farmacológicas foram desenvolvidas, como é o caso da combinação de fármacos (ex: anfotericina e flucitosina, fluconazol e flucitosina ou anfotericina e caspofungina), o desenvolvimento de novas fórmulas antifúngicas (ex: dispersões coloidais ou complexos lipídicos de anfotericina B) e a utilização da nanotecnologia para encapsulação, carreamento e liberação de fármacos de maneira mais eficiente, menos citotóxica e em doses menores (SOUZA; AMARAL, 2017; De OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2018).

2.4.1. Resistência das espécies de *Candida* spp. contra antifúngicos convencionais

Com o desenvolvimento dos agentes azólicos, houve uma melhora nas opções de tratamento para infecções fúngicas devido a toxicidade reduzida desses compostos no hospedeiro, quando comparado às outras classes de agentes antifúngicos, o que levou ao uso generalizado dos mesmos (COMO; DISMUKES, 1994; PFALLER DIEKEMA, 2007). Consequentemente, com este uso extensivo, muitas espécies de *Candida* começaram a apresentar resistência aos azóis, particularmente

ao fluconazol. Os primeiros fármacos azólicos lançados no mercado (cetoconazol e miconazol) apresentam toxicidade significativa durante a administração sistêmica, contudo os triazóis de primeira e segunda geração (fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e isavuconazol) são mais tolerados pelo organismo humano (NETT; ANDES, 2016). O fluconazol é o antifúngico mais comumente prescrito usado para a maioria das infecções por *C. albicans* (PFALLER *et al.*, 2010), além de também ser utilizado como terapia de primeira linha para o tratamento de pacientes com candidíase em mucosas, como candidíase vulvovaginal e oral, incluindo terapias semanais para a prevenção de novas infecções em pacientes com CVVR (PAPPAS *et al.*, 2009; NETT; ANDES, 2016).

As infecções causadas por *C. albicans* estão associadas aos variáveis níveis de resistência da levedura frente ao fluconazol. Os isolados de *C. albicans* de pacientes candidêmicos têm a menor incidência de resistência ao azol (0–5%), enquanto que *C. glabrata* tem a maior incidência de resistência entre isolados clínicos de *Candida*, a qual pode ser desenvolvida após a exposição a antifúngicos azólicos, pois exibe suscetibilidade intrínseca reduzida à essa classe (LEE *et al.*, 2009; OXMAN *et al.*, 2010; DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2014; YING *et al.*, 2015). Desse modo, é uma das espécies mais frequentemente isoladas em infecções causadas por pacientes que recebem profilaxia com azol (BENNETT *et al.*, 2004; HACHEM *et al.*, 2008).

Pfaller e Diekema (2007) demonstraram que o fluconazol é eficaz contra as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e o voriconazol possui maior atividade fungicida que o fluconazol contra espécies clinicamente importantes, como *C. albicans* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, com exceção de *C. tropicalis*. O itraconazol é moderadamente ativo contra a maioria das espécies de *Candida* suscetíveis e resistentes ao fluconazol, exceto *C. glabrata* (PFALLER *et al.*, 2005). Já a flucitosina, mesmo exibindo atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, é geralmente administrada em combinação com outros agentes, como a anfotericina B, pois seu uso como agente único pode rapidamente induzir o desenvolvimento de resistência (PAPPAS *et al.*, 2009; NETT; ANDES, 2016). A anfotericina B é um dos antifúngicos mais potentes e possui atividade contra a maioria das espécies de *Candida* spp, exceto *Candida lusitanae*. Ela é aprovada para o tratamento de candidemia e candidíase invasiva, no entanto, seu uso é frequentemente limitado por toxicidades significativas, como por exemplo a insuficiência renal aguda que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes e está associada a uma taxa de mortalidade de mais de 50% nesse cenário (BATES *et al.*, 2001; NETT; ANDES, 2016). Todas as equinocandinas apresentam atividade antifúngica potente contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Já para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, os valores utilizados são mais altos, porém as equinocandinas ainda são agentes úteis no tratamento dessas infecções clinicamente (PFALLER *et*

al., 2012). *Candida* spp geralmente apresenta baixa resistência ao tratamento por equinocandinas, inferior a 3%, porém as taxas de resistência para *Candida glabrata* aumentaram e agora são relatadas com valores que variam de 3% a 15% (PFALLER *et al.*, 2003).

Uma limitação dos tratamentos comerciais é a presença de biofilmes na infecção. Os biofilmes de *C. albicans*, os mais comuns na área médica, são resistentes à maioria dos medicamentos antifúngicos conhecidos e utilizados, como azóis e polienos, por isso torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas com eficácia contra esse tipo de fator de virulência das leveduras (GULATI; NOBILE, 2016).

Segundo Sobel *et al.* (1998), o tipo de formulação vaginal utilizado não é clinicamente relevante para o resultado terapêutico, e sim o composto antifúngico, dessa forma algumas características são imprescindíveis na pesquisa por antimicóticos ideais, como por exemplo: I) A facilidade de administração; II) a eficácia em curto período de tempo; III) efeito fungicida e não fungistático; IV) que proporcione alívio imediato, pois grande parte do alívio obtido inicialmente com agentes tópicos é uma função do veículo ao invés do próprio agente antifúngico; V) e que não cause efeitos colaterais locais ou sistêmicos, nem apresente citotoxicidade.

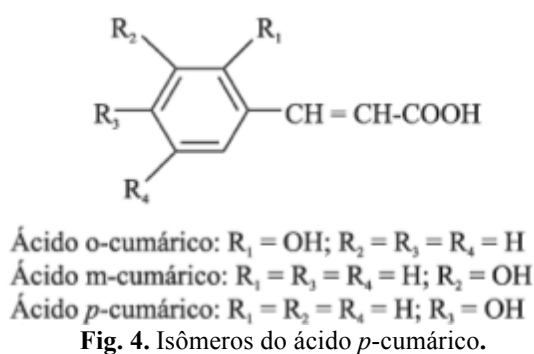
Assim, muita ênfase tem sido colocada na descoberta de novas moléculas provenientes de fontes naturais e que possam atuar eficazmente contra várias espécies de *Candida* spp. Dentre essas moléculas, os compostos fenólicos se destacam como uma promissora classe de agentes antifúngicas naturais, visto que há muitos estudos demonstrando a atividade antimicrobiana de uma variedade destes metabólitos, como é o caso do ácido *p*-cumárico (*p*-AC).

2.2. Ácido *p*-cumárico e suas propriedades

Compostos fenólicos constituem uma classe importante de metabólitos secundários amplamente encontrados em plantas superiores e também em bebidas, como chás, vinhos e café (TEODORO *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos são classificados em polifenóis: flavonoides e taninos; e fenólicos simples: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Estes compostos desempenham atividades biológicas importantes tanto no próprio metabolismo vegetal, quanto no metabolismo animal ao serem ingeridos na forma de alimentos e bebidas (De BEER *et al.*, 2002; KHODDAMI *et al.*, 2013). Os ácidos fenólicos, caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila/metila na molécula, podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com suas estruturas: ácidos hidroxibenzóicos (como os ácidos gálico e vanílico) e ácidos hidroxicinâmicos (por exemplo, ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico) (MARTINS *et al.*, 2011).

O ácido cumárico apresenta três isômeros conhecidos como: ácidos *o*-cumárico, *m*-cumárico e *p*-cumárico (*p*-AC), sendo o último, o mais abundante na natureza (Figura 4). A diferença destas três

moléculas dá-se pela posição do grupamento hidroxila no anel aromático. O *p*-AC é biologicamente sintetizado a partir da via metabólica do Xiquimato, tendo como precursores os aminoácidos tirosina e fenilalanina (EL-SEEDI *et al.*, 2012). Este ácido é de extrema importância no metabolismo secundário de plantas, visto que age como precursor de outros compostos fenólicos, tais como os ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico e sinapínico, de flavonoides e ligninas (EL-SEEDI *et al.*, 2012). Ele pode ser encontrado em plantas na sua forma livre ou ligado à outras moléculas, como aminas, álcoois, mono ou oligossacarídeos.



Fonte: Ramalho & Jorge, 2006.

Segundo Zhao *et al.* (2009), o *p*-AC apresenta uma biodisponibilidade maior que os ácidos ferúlico, cafeico e rosmarínico, visto que pode ser absorvido em todas as secções do trato gastrointestinal em ratos, incluindo o estômago, o jejuno e o íleo, além de apresentar baixa toxicidade, já que é encontrado em diversos tipos de alimentos e ocorre naturalmente nas plantas (PEI *et al.*, 2016; LAFAY, 2008). Devido à tais características, o *p*-AC vêm sendo estudado e avaliado como um composto farmacologicamente ativo, pois já apresentou uma variedade de propriedades biológicas, como: atividade antioxidante e antitumoral, ação antiplaquetária, efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, mitigação de diabetes, efeitos nefro e hepatoprotetores e atividade antimicrobiana (KONG *et al.*, 2012; VAUZOUR *et al.*, 2010; ABDEL-WAHAB, 2003; LUCERI *et al.*, 2007; NAVANEETHAN; RASOOL, 2014; AKDEMIR *et al.*, 2017; ADISAKWATTANA *et al.*, 2004; AMALAN *et al.*, 2016; PRAGASAM *et al.* 2013).

O interesse no *p*-AC ocorre principalmente em virtude de suas atividades antioxidante e antitumoral. Estudos demonstraram que o *p*-AC confere proteção contra a oxidação do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (ZANG *et al.*, 2000), possui capacidade de reduzir hidroperóxido, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e malondialdeído no sistema de emulsão do ácido graxo ômega 3 (ESPINOSA *et al.* 2015). Ele também promove a inibição de vias de sinalização responsáveis pela angiogênese, dessa forma reduz a expressão de mRNA de dois fatores angiogênicos que estimulam a permeabilidade, proliferação, migração e formação de tubos em células endoteliais, o

que atribuiria os efeitos quimiopreventivos alcançados em anéis aórticos de ratos (KONG *et al.*, 2013).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, há estudos que indicam tanto um potencial efeito bactericida quanto fungicida do *p*-AC. Lou e colaboradores (2012) verificaram que o *p*-AC apresentou efeito bactericida contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, eliminando as bactérias através de dois mecanismos diferentes: 1) Causando danos na membrana e aumentando sua permeabilidade; e 2) Ligando-se ao ânion fosfato do DNA, inibindo funções celulares, como replicação, transcrição e expressão celular. Kot *et al.* (2015) avaliaram o efeito do *p*-AC em biofilmes formados por *E. coli* na superfície interna de cateteres urinários e demonstraram em seus resultados que este ácido fenólico não só apresentou uma atividade preventiva contra a formação do biofilme, como também inibiu o desenvolvimento do mesmo já formado. Outro estudo realizado por Stojković *et al.* (2013) relatou que ao testarem o *p*-AC em sistemas alimentares, a fim de se avaliar sua atividade antimicrobiana e antioxidante em sopa de frango, este composto inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, um conhecido contaminante bacteriano alimentar.

Já Kim *et al.* (2004) avaliaram a ação fungicida dos três isômeros do ácido cumárico contra *Aspergillus flavus*. Eles demonstraram que as três isoformas inibiram o crescimento dos microrganismos, e que o ácido *o*-cumárico apresentou o melhor resultado frente aos outros isômeros, indicando que a posição do grupamento –OH no anel aromático deve ser uma característica que afeta a as propriedades físico-químicas da molécula e a interação dela com outras moléculas. Zabka e Pavela (2013) testaram a atividade antifúngica de 21 compostos fenólicos (dentre eles o *p*-AC) contra fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados os que produzem a grande maioria das micotoxinas conhecidas. O *p*-AC provocou uma inibição maior que 95% nas espécies do gênero *Fusarium*, ação intermediária (45%) nas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e baixas (19-30%) contra o gênero *Penicillium*. Este efeito fungicida contra espécies do gênero *Fusarium* também pode ser verificado no trabalho de Barral *et al.* (2017), o qual avaliou a ação de diferentes compostos fenólicos no crescimento micelial de *F. ananatum* (responsável pela Fusariose no abacaxi) bem como seus efeitos fungitóxicos *in vitro* e *in vivo*. Dentre todos os ácidos analisados, o *p*-AC foi o que apresentou melhores resultados, promovendo total inibição de crescimento micelial *in vitro* e efeito fungitóxico, enquanto os outros compostos apresentaram efeito fungistático.

Da mesma forma, Faria e colaboradores (2011) testaram a ação de diferentes compostos fenólicos (entre eles, os três isômeros do ácido cumárico) contra cepas de nove espécies de *Candida* spp. Os resultados demonstraram que as três isoformas do ácido apresentaram taxas de inibição de

crescimento em todas as espécies, sendo que *C. albicans* e *C. lusitaniae* foram aquelas com maior susceptibilidade aos compostos.

Algumas informações gerais do ácido *p*-cumárico podem ser úteis no desenvolvimento e pesquisa do composto como potencial antimicrobiano, dentre elas:

- Apresenta-se na forma de um pó cristalino amarelo claro, é solúvel em solventes orgânicos como o etanol (50mg.mL⁻¹), DMSO e dimetilformamida; e pouco solúvel em água (1,02g.L⁻¹) ou em tampões aquosos.
- Sua fórmula química é C₉H₈O₃, com massa molecular de 164,16 g/mol e densidade de 1.3±0.1g/cm³
- O ponto de fusão encontra-se entre 211 - 214°C, o Log P é de 1,79 e a molécula possui dois valores de pK_A: (pK_{A1}) ≈ 4,32 (pK_{A2}) ≈ 8,9 (OZKORUCUKLU *et al.*, 2009; SEQUEIROS 2009).

Devido à sua baixa solubilidade em solventes aquosos (FERREIRA *et al.*, 2018), as propriedades biológicas do *p*-AC podem ser afetadas, pois a polaridade e a solubilidade de um fármaco são fatores que podem influenciar na capacidade do mesmo em permear membranas biológicas (SHAZLY *et al.*, 2012). Com o avanço da Nanotecnologia Farmacêutica, muitos pesquisadores têm recorrido a sistemas nanoestruturados para potencializar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos. Esses sistemas, como lipossomas, nanopartículas e cristais líquidos, também atuam na liberação controlada do fármaco e na redução de possíveis efeitos colaterais ou citotoxicidade que o este possa apresentar (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012).

2.3. Cristais Líquidos e aplicação vaginal

Cristais líquidos (CLs) são fluidos com propriedades intermediárias entre o estado sólido cristalino e o estado líquido isotrópico (Figura 5), podendo ser classificados conforme a adição de moléculas anfífilas em um solvente (liotrópicos) ou conforme a influência da temperatura (termotrópicos) (CHORILLI *et al.*, 2009). CLs podem ser formados através da mistura de uma fase oleosa, uma fase aquosa e um tensoativo, assim, de acordo com condições de temperatura, pressão, concentrações dos diferentes componentes e arranjo molecular das fases, pode-se delinear as estruturas pertencentes a cada mesofase (GOODBY *et al.* 2001; PATEL; PATEL, 2010). Os cristais-líquidos liotrópicos estão atraindo cada vez mais a atenção pelas suas propriedades físico-químicas e sua organização estrutural diferenciadas. Moléculas bioativas, como fármacos e proteínas, podem ser solubilizadas tanto na fase aquosa ou na fase oleosa, sendo protegidos pela hidrólise ou oxidação, além de terem sua liberação modificada e controlada (GUO *et al.*, 2010).

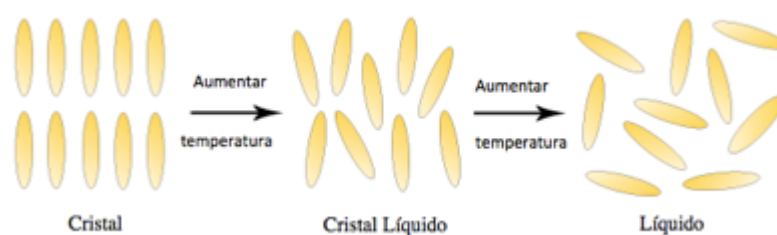


Fig. 5. Estado intermediário da matéria, de um cristal líquido.

Fonte: Traduzido de “Dissemination of IT for the Promotion of Materials Science” – University of Cambridge.

Essa característica de mesofase líquida-cristalina faz com que CLs sejam promissores sistemas de liberação de compostos bioativos, pois promovem uma melhor estabilidade física e aumenta a solubilidade do composto veiculado, visto que essa alternância entre as fases pode formar micelas ordenadas com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, auxiliando na administração da formulação (STEVENSON *et al.*, 2005).

Os cristais líquidos apresentam três mesofases conhecidas, denominadas: lamelar, hexagonal e cúbica (Figura 6). Cada mesofase apresenta uma viscosidade diferente: geralmente fases lamelares apresentam comportamento plástico, sendo mais fluídas, fases hexagonais, propriedades viscoelásticas, e as cúbicas possuem viscosidade elevada, característica que pode influenciar no comportamento do CL como sistema de liberação de fármacos (MEZZENGA *et al.*, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Segundo Guo *et al.* (2010) as mesofases hexagonais e cúbicas possuem propriedades que as tornam de grande interesse para administração tópica de medicamentos, como toxicidade baixa/nula, alta viscosidade, biodegradabilidade e bioadesividade. Essas características fazem com que os cristais líquidos sejam bons candidatos à administração de drogas nas mucosas, visto que a natureza bioadesiva desses sistemas permite que eles direcionem os medicamentos para a cavidade oral, vaginal ou para diferentes partes do trato gastrointestinal (SHAH *et al.* 2001). Além disso, ao desenvolver CLs, os materiais geralmente utilizados em sua constituição possuem no mínimo, dois grupamentos hidroxila, o que os torna susceptíveis à ligarem-se nas membranas das mucosas a partir de ligações de hidrogênio (GUO *et al.* 2010). Mesofases com características mais fluídas, como a lamelar, também são atrativas para a aplicação em mucosas, pois ao entrar em contato com o muco presente no sítio de aplicação, elas podem absorver o fluido corporal e formar géis viscosos cúbicos ou hexagonais (GUO *et al.* 2010).

Dentre os componentes utilizados na formulação dos CL, o poloxamer é um copolímero tri-bloco que consiste em um bloco hidrofóbico central de polipropileno glicol, flanqueado por dois blocos hidrofílicos de polietileno glicol (PEG), e que pode ser usado na fase aquosa. Uma das características interessantes deste polímero é que, em dispersões aquosas, o poloxamer apresenta

gelificação térmica reversível, por exemplo, uma dispersão com 20-30% de poloxamer apresenta-se fluida entre 4-5 °C, porém, à temperatura corporal, forma géis altamente viscosos. Essa propriedade sol-gel reversível do poloxamer permite que o mesmo seja utilizado em possíveis sistemas tópicos de administração de fármacos, visto que apresenta vantagens em relação às bases tradicionais, em termos de facilidade de aplicação e características de liberação de fármaco (BENTLEY *et al.*, 1999).

Diante das informações supracitadas, uma possível aplicação destes sistemas é na administração de fármacos através de mucosas, pois, ao entrarem em contato com estes locais, os CLs gelificam pela mudança de mesofase, apresentando características mucoadesivas, permitindo que o tempo de contato entre a formulação e a mucosa seja maior (CALIXTO *et al.*, 2015). Ao comparar as diferentes vias utilizadas para a aplicação de medicamentos, a via vaginal apresenta vantagens para a administração de CLs, tais como: 1) Auxilia na queda de incidência e gravidade dos efeitos colaterais gastrointestinais quando comparada à via oral; 2) Evita o metabolismo de primeira passagem; 3) Facilidade de auto-inserção e remoção da forma farmacêutica, 4) Evita o inconveniente causado pela dor, dano do tecido e risco de infecções causados pela administração parenteral (PEREIRA *et al.*, 2011).

O muco vaginal é um fluido bifásico complexo composto por um componente de baixo peso molecular (plasma cervical) e um componente de alto peso molecular (fase de gel), além disso, compostos como glicogênio, mucina, ácido lático, ácido acético, glicerol, uréia e glicose também estão presentes em concentrações significativas nos fluidos vaginais (CAMELLA *et al.*, 2015; LEYVA-GÓMEZ *et al.*, 2019). Tratando-se da aplicação vaginal de formulações farmacêuticas, sob algumas condições e distúrbios de saúde, o muco vaginal sofre alterações, as quais podem fazer com que ele aja como uma barreira ou como um “mecanismo de limpeza”, o que limitaria a retenção vaginal dos sistemas (LEYVA-GÓMEZ *et al.*, 2019). Uma maneira de superar esse obstáculo é através da utilização de polímeros mucoadesivos ou materiais com capacidade de gelificação, como o poloxamer.

Referente à aplicação de formulações tópicas mucoadesivas, após o contato, a hidratação e a umidificação dos sistemas, a próxima etapa envolve o fortalecimento da ligação polímero-mucina, graças à interpenetração das cadeias poliméricas na camada de muco. Essa ligação é formada principalmente por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals ou interações eletrostáticas. (BODDUPALLI *et al.*, 2010). Polímeros com elevado número de grupos funcionais, por exemplo grupos hidroxila ou carboxila, são moléculas com propriedades mucoadesivas promissoras (GUO *et al.* 2010; CAMELLA *et al.*, 2015).

Dessa forma, ao analisar as terapias disponíveis para CVV, os sistemas líquido-cristalinos tornam-se úteis para incorporação de fármacos, já que, pela aplicação do composto ser tópica há uma

diminuição dos efeitos colaterais. Ademais, este sistema pode ser aplicado no estado líquido, pois ao entrar em contato com o muco vaginal, irá ocorrer a transição de mesofase, tornando-se mucoadesivo. (CHORILLI *et al.*, 2011).

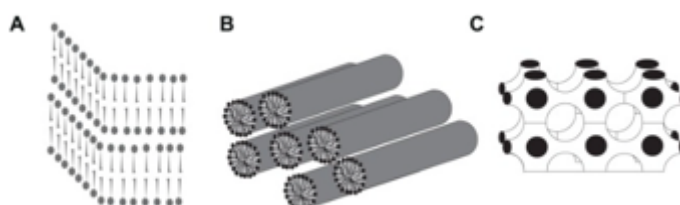


Fig. 6. Fases estruturais dos cristais líquidos: (A) lamelar, (B) hexagonal e (C) cúbica

Fonte: Calixto *et al.*(2014).

Portanto, tendo em vista os efeitos adversos causados pelo atual tratamento convencional de CVV a base de antifúngicos, torna-se interessante avaliar se o ácido *p*-cumárico possui algum potencial antifúngico contra cepas de *Candida* spp., em especial contra *C. albicans*. Sua baixa toxicidade, facilidade de ser encontrado na natureza e ação antimicrobiana faz dele um componente vantajoso para ser utilizado, além disso, sua incorporação nos cristais líquidos representa uma estratégia inovadora, a qual pode promover uma ação sinérgica, aumentando a atividade antifúngica deste composto fenólico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial de sistemas líquido-cristalinos como estratégia para administração vaginal de ácido *p*-cumárico no tratamento da candidíase vulvovaginal.

3.2. Objetivos Específicos

- I) Desenvolver e caracterizar os sistemas líquido-cristalinos para incorporação do fármaco;
- II) Validar metodologia analítica para quantificação do ácido *p*-cumárico;
- III) Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de *p*-AC em células fúngicas planctônicas e na erradicação de biofilme de *Candida* spp.;
- IV) Avaliar *in vivo* a atividade antifúngica do *p*-AC e tratamento terapêutico utilizando modelo murino contra diferentes espécies de *Candida* spp.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Principais reagentes e matérias-primas:

- Ácido acético glacial, PA (Qhemis);
- Ácido clorídrico 37%, PA (Qhemis);
- Ácido ferúlico (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Ácido fórmico, PA (Synth[®], Brasil);
- Ácido gálico (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Ácido láctico;
- Ácido *p*-cumárico $\geq 98.0\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Ácido vanílico (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Ácido oleico P.A. (Synth[®], Brasil);
- Albumina de soro bovino;
- Álcool etílico 95%, PA (Vetec, Brasil);
- Ágar Sabouraud Chloramphenicol (Kasvi[®]);
- Ágar bacteriológico (Difco[™]);
- Anfotericina B em pó (Sigma Aldrich[®]);
- Água ultra pura (Milli-Q Plus[®]);
- Colesterol Purex (INLAB, Brasil);
- Cloreto de sódio (Synth[®], Brasil);
- Dimetilsulfóxido (Synth[®], Brasil);
- D-(+)-Glicose (Sigma Aldrich[®]);
- Extrato de levedura granulado (Merck[®], Alemanha);
- Fluconazol $\geq 98.0\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich[®]);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth[®], Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Synth[®], Brasil);
- Glicerol;
- Glicose (Synth[®], Brasil);
- Hidróxido de cálcio (Dinamica, Brasil);
- Hidróxido de potássio (Dinamica, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio (Synth[®], Brasil);
- Membrana de acetato de celulose para tubos de diálise, 76 mm (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker[®], EUA);
- MOPs $\geq 99,5\%$ - titulação (Sigma Aldrich[®]);
- Meio RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium - (Sigma Aldrich[®]);

- Mucina de estômago de porco (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Mucosas vaginais suínas (Abatedouro USP Pirassununga);
- Peptona bacteriológica (Oxoid[®]);
- Poloxamer 407 (Sigma Aldrich[®], EUA);
- Trietanolamina (Synth[®], Brasil);
- Uréia;
- XTT Sodium Salt BioChemica (PanReac AppliChem- ITW Reagents).

4.2. Equipamentos

- Analisador de textura TA-XTplus, Stable Micro System[®] (Surrey, Inglaterra);
- Balança semi-analítica modelo AW220 (Shimadzu,);
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1220 Infinity DAD LC (Agilent Technologies, EUA);
- Coluna Luna C18 250 mm x 4.6mm, 5 μ m (Phenomenex, EUA);
- Espectrofotômetro UV Carry 60 (Agilent Technologies, EUA);
- Micrômetro digital Mitutoyo (0-25mm range)
- Microscópio de luz polarizada Carl-Zeiss Axion 40 (Carl-Zeiss, Alemanha);
- Reômetro, modelo AR2000ex (TA Instruments[®]);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE[®], Milli - Q Plus, condutividade 18,2 μ S.cm-1;
- Sistema automático com células de difusão vertical de Franz (Microette Plus –Hanson Research Corporation[®]);
- Ultraturrax Digital T25 (Ika, Alemanha).

4.3. Microrganismos

- Cepas de *Candida albicans* (SC5314), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

4.4. Métodos

4.4.1. Preparo das formulações

As formulações foram preparadas em frascos transparentes com tampa, variando-se as concentrações dos componentes (fases oleosa, aquosa e tensoativo) conforme descrito no item 4.4.2., totalizando uma massa final de dois gramas. Cada componente foi pesado em balança semi-analítica ou analítica, e as formulações preparadas sob pressão de 1 atm à 25 $\pm$ 0,5°C.

4.4.2. Construção dos diagramas de fases

Dois diagramas de fases ternários foram construídos, fixando-se em ambos ácido oleico (A.O.) e colesterol (Col.) como fase oleosa (na proporção 5:1) e uma dispersão de poloxamer 16% como fase aquosa. Foram utilizados dois componentes na fase tensoativa: o oleato de trietanolamina (TEA-Oleato) e a trietanolamina (TEA), que ao ser misturada com A.O., torna-se uma precursora do tensoativo TEA-Oleato. Ambas substâncias são utilizadas pela indústria na produção de cosméticos e produtos de uso tópico (Figura 7).

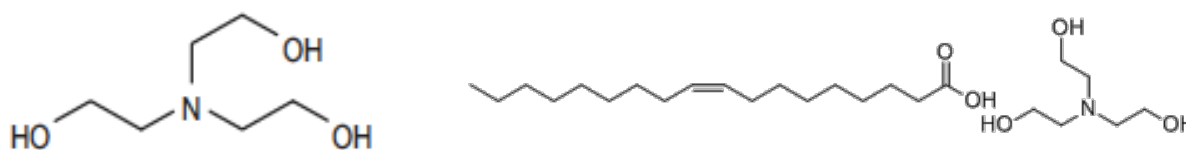


Fig. 7. Estruturas químicas da TEA e do TEA-Oleato, respectivamente.

Fonte: Fiume *et al.* (2013).

Os sistemas foram preparados por mistura direta dos componentes, em temperatura ambiente, homogeneizados com auxílio de uma espátula de metal. Para construção do diagrama, foram misturadas diferentes proporções, de 0 a 100% (m/m) de cada fase dos sistemas, resultando, desse modo, na construção do diagrama de fases ternário com 54 pontos. Para todos os sistemas, a sequência de adição de cada componente na mistura foi: fase aquosa, sistema tensoativo e por último fase oleosa.

Tanto a fase aquosa quanto a oleosa foram preparadas no dia anterior ao da mistura final. No primeiro caso, para gelificação e completa dissolução do poloxamer sob refrigeração, enquanto que no segundo, para dissolução do colesterol no ácido oleico, sob agitação magnética por 24 horas. Após o preparo, as formulações foram colocadas em banho ultrassônico por 15min para maior homogeneização dos componentes, e posteriormente deixadas em repouso por 24 horas até o completo equilíbrio de fases e eliminação de bolhas. Em seguida, cada ponto do diagrama foi analisado de acordo com sua viscosidade, pH e presença de área de anisotropia. Os sistemas foram classificados visualmente como sistema líquido transparente (SLT), sistema líquido translúcido (SLTL), sistema viscoso transparente (SVT), sistema viscoso translúcido (SVTL), sistema líquido opaco (SLO), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF). Aqueles que apresentaram separação de fases foram descartados da análise. Os diagramas de fases foram plotados empregando programa SigmaPlot[®], versão 11.0 (Systat Software, EUA).

4.4.3. Seleção das formulações a partir do diagramas de fases

De acordo com as informações obtidas dos diagramas construídos, foram selecionados os sistemas que apresentaram em ambos os diagramas perfis de viscosidade favoráveis para mucoadesão e estruturas de fases lamelar, hexagonal e/ou cúbica quando avaliados por microscopia de luz polarizada.

Devido à aplicação dos sistemas líquido-cristalinos ser voltada para o ambiente vaginal, as formulações foram caracterizadas em sua composição original e adicionadas de muco vaginal artificial (MVA), com o intuito de mimetizar possíveis condições existentes fisiologicamente e investigar a ocorrência de alterações estruturais ou mudanças de fase dos CLs, quando em contato com a mucosa vaginal (RODERO *et al.* (2018). O MVA (Tabela 3) foi adicionado nas proporções de 1:0,3 e 1:1 (m/m), valores referentes às concentrações de 30% e 100% de muco respectivamente.

Tabela 3. Composição do muco vaginal artificial

Reagentes	Quantidade (g)
NaCl	1,755
KOH	0,70
Ca(OH) ₂	0,111
Albumina de soro bovino	0,009
Ácido láctico	1,0
Ácido acético	0,50
Glicerol	0,08
Ureia	0,20
Glicose	2,50
Mucina	7,50
Água Mili-Q	500mL

Obs: O pH foi ajustado com HCl 0,1% até obtenção do valor 4,2 e o MVA foi mantido na geladeira, sob refrigeração.

4.4.4. Caracterização físico-química dos sistemas líquido-cristalinos

4.4.4.1 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada foi realizada para as formulações selecionadas colocando-se uma pequena quantidade das amostras sobre lâminas de vidro, as quais foram cobertas com lamínula e analisadas no microscópio de luz polarizada Carl-Zeiss Axion 40 à 25±0,5°C. Avaliou-se a

homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observou-se a presença de área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos.

4.4.4.2. Determinação do comportamento reológico

As análises reológicas foram realizadas em triplicata à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, empregando reômetro de tensão controlada modelo AR2000 – TA Instruments®. Para as amostras altamente viscosas, utilizou-se a geometria placa-placa de 20mm, enquanto que para as amostras líquidas, a geometria placa-placa de 40mm. O gap aplicado foi de 200 μm e cada sistema teve um tempo de equilíbrio de 30s antes da análise. Alíquotas das formulações foram cautelosamente colocadas sobre a base metálica do equipamento a fim de evitar ao máximo o cisalhamento das amostras. Nessas condições, foram realizados os ensaios de escoamento e os de oscilação (Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2015; CHANg *et al.*, 2002).

4.4.4.2.1 Análise reológica contínua (ensaio de escoamento)

As propriedades de fluxo das formulações foram determinadas usando um procedimento controlado de taxa de cisalhamento variando de 0,01 a 100s⁻¹ a (*up-curve*) 100 a 0,01s⁻¹ (*down-curve*). Cada análise durou 120s com um intervalo de 10s entre as curvas. Para análise quantitativa das formulações quanto ao comportamento de fluxo, o índice de consistência e o índice de fluxo foram determinados por meio da lei da potência descrita na Equação 1.

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (\text{Equação 1})$$

na qual o τ corresponde a tensão de cisalhamento (Pa), γ a taxa de cisalhamento (1/s); k o índice de consistência [(Pa. s)ⁿ], e o n indica o índice de fluxo (CALIXTO *et al.*, 2015).

4.4.4.2.2 Análise reológica oscilatória

As análises oscilatórias foram iniciadas pela condução de uma varredura de tensão para determinar a região viscoelástica das formulações. Essa varredura foi realizada em uma frequência constante de 1Hz na faixa de tensão de cisalhamento de 0,1-10Pa. Após a determinação da tensão de 1Pa da região viscoelástica, realizou-se uma varredura de frequência para determinação dos módulos de armazenamento (G' - *Storage Modulus*) e de perda (G'' - *Loss Modulus*). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10Hz, à tensão de 1Pa.

A fim de se estabelecer uma análise quantitativa da dependência de G' da frequência foi calculado o expoente n através da Equação 2, o qual indica a estrutura dos sistemas obtidos.

$$G' = S \cdot \omega^n \quad (\text{Equação 2})$$

em que G' é o módulo de armazenamento (Pa), S é a força da formulação (Pa.s), ω é a frequência de oscilação (Hz) e o n é o expoente de viscoelasticidade (SAXENA *et al.*, 2011).

4.4.4.3. Análise de perfil de textura (TPA)

A análise do perfil de textura das formulações foi realizada em um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems) operando no modo TPA, o qual a partir dos dados das curvas (força x tempo) determina os parâmetros, como dureza, compressibilidade, adesividade e coesão (NISHINARI *et al.*, 2013).

Para realização do teste, 7 gramas das formulações foram pesadas em tubos de centrífuga cônicos de 50mL e centrifugados a 4000 rpm, por 3 minutos, para eliminação de bolhas e tornar sua superfície lisa. Em seguida, os tubos foram colocados abaixo da sonda analítica (10mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programado para comprimir a amostra numa velocidade de $0,5\text{mm.s}^{-1}$ até a profundidade pré-definida de 10mm e retornar a superfície na mesma velocidade. Após o tempo de 5s, uma segunda compressão iniciou-se nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, à $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Adaptado de KOFFI *et al.*, 2006; FONSECA-SANTOS, 2015).

4.4.4.4. Obtenção da mucosa vaginal de suínos

Para a realização dos ensaios de mucoadesão, permeação e retenção, foram utilizadas mucosas vaginais suínas. As mucosas foram obtidas no abatedouro da USP, situado na cidade de Pirassununga - SP e armazenadas em banho de gelo, à 4°C , até o seu processamento que ocorreu em, no máximo, 5 horas. As regiões de interesse foram cortadas e seccionadas, embaladas em filme plástico e posteriormente em papel alumínio e mantidas em congelador por um período de, no máximo, 2 meses. Quando utilizadas, as amostras teciduais foram descongeladas e mantidas em solução salina fisiológica contendo 0,9% (m/v) de NaCl (Adaptado de FONSECA-SANTOS, 2015).

4.4.4.5. Avaliação in vitro da força mucoadesiva

A mucoadesão foi avaliada por meio da medida da força máxima e trabalho necessário para destacar as formulações da superfície da mucosa vaginal. A análise foi realizada em triplicata à $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Inicialmente, as formulações foram dispostas em pequenos recipientes de forma que apresentassem uma superfície lisa e sem ondulações, e a mucosa suína foi fixada à extremidade inferior da sonda cilíndrica de 10mm de diâmetro do equipamento. O teste teve início abaixando a sonda à uma velocidade constante de 1mm.s^{-1} até que a mucosa entrasse em contato com a amostra. O tecido e a formulação foram mantidos em contato por 60s e nenhuma força foi aplicada durante esse período. Em seguida, a sonda subiu à uma velocidade constante de $0,5\text{mm.s}^{-1}$ até ocorrer o destacamento entre a mucosa e a formulação. A força necessária para esse destacamento foi calculada pela curva força $\times$ tempo (Adaptado de FONSECA-SANTOS, 2015).

4.4.5. Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação do ácido *p*-cumárico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A validação da metodologia analítica para quantificação de ácido *p*-cumárico foi adaptada de Lee, Boyce e Breadmore (2011) e Karthikeyan, Devadasu e Babu (2015). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limites de quantificação e detecção, conforme as diretrizes do guia Harmonised Tripartite Guideline (ICH, 2005) e as especificações da RDC N°166 da ANVISA (BRASIL, 2017). Foram desenvolvidas duas metodologias analíticas, nas quais o *p*-AC foi quantificado em meio receptor (Tampão Fosfato 30mM + 1,25% LSS) e em metanol.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido modelo 1220 Infinity (Agilent Technologies), constituído por duas bombas (sistema binário), detector DAD e injetor automático, utilizando uma coluna C18 Luna® Phenomenex (250mm x d.i. 4,6 mm; 5µm). Os parâmetros utilizados para validação foram:

- Temperatura de forno: $35 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$;
- Vazão: $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- Fase móvel: Água acidificada contendo solução de 1% de ácido fórmico : metanol (60:40, v/v);
- Comprimento de onda para detecção no UV: 310nm
- Tempo de corrida: 11 minutos

O volume de injeção variou de acordo com o solvente utilizado. Para a construção da curva analítica em meio receptor, o volume de injeção foi de 20µL, enquanto que para a curva em metanol, foi de 10µL. As amostras foram filtradas em membrana PTFE 0,45µm antes do início das leituras.

4.4.5.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do *p*-AC em espectrofotômetro UV-Vis

Uma solução de *p*-AC foi preparada em metanol e na fase móvel utilizada para validação do método analítico, à uma concentração de $2,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ambas as soluções foram colocadas em cubetas de quartzo e uma varredura espectrofotométrica foi realizada no intervalo de comprimento de onda a partir de 250 a 350nm.

4.4.5.2. Linearidade

A linearidade foi determinada pela média de três curvas analíticas do *p*-AC. A partir de uma solução mãe na concentração de $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram preparadas oito diluições, com concentrações variando de 0,5 – $70,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A leitura dos oito pontos de concentração foi realizada em triplicata para cada curva padrão. A linearidade foi avaliada através da análise de regressão linear, utilizando

ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados e a qualidade do ajuste do modelo foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) a nível de significância de 0,05%.

4.4.5.3. Especificidade e seletividade

A fim de demonstrar que os constituintes da formulação não interferem nas análises quantitativas do *p*-AC, a seletividade do método foi avaliada por meio da comparação entre cromatogramas obtidos nas análises do fármaco livre, dos componentes da fase móvel, do metanol e meio receptor utilizados como solventes, das formulações sem o fármaco, da mucosa vaginal e do MVA.

4.4.5.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio da contaminação das formulações com três níveis de concentrações conhecidas do *p*-AC: baixo ($2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$), médio ($25\mu\text{g.mL}^{-1}$) e alto ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$). Preparou-se soluções-mãe do fármaco ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$) e de cada formulação selecionada, sem o fármaco (2mg.mL^{-1}), para que estas fossem contaminadas na mesma proporção da concentração original de cada sistema. As amostras foram analisadas em triplicata em um mesmo dia. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado por meio do cálculo de recuperação (Equação 3):

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

4.4.5.5. Precisão

A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. Assim como na exatidão, esses parâmetros foram analisados por meio de três níveis de concentrações baixa ($2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($25\mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) individualmente preparadas. Para determinação da repetibilidade as análises foram realizadas em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesma instrumentação e condições experimentais. Para avaliar a precisão intermediária os ensaios foram realizados em dois dias diferentes com dois analistas diferentes. A proximidade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a equação 4, na qual DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

4.4.5.6. Robustez

Segundo a Anvisa (BRASIL, 2017), a robustez de um método analítico indica sua confiança durante o uso normal, pois mede a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Dessa forma, a robustez do método foi avaliada frente à pequenas alterações na vazão (mL.min^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e comprimento de onda para detecção no

UV (nm). As análises foram realizadas utilizando a concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ em sextuplicata ($n=6$).

4.4.5.7. Limites de detecção e quantificação

Considera-se que os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são respectivamente a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado e a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

Dessa forma, a menor quantidade de *p*-AC que pode ser detectada foi determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a Equação 5. Já a menor quantidade de *p*-AC que pode ser quantificada com precisão e exatidão foi determinada a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas construídas, conforme a equação 6. Em ambas as equações, o valor de IC corresponde à inclinação da curva analítica DP ao desvio padrão.

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

4.4.5.8. Determinação do teor (%) de fármaco nos cristais líquidos

O ensaio de doseamento tem como objetivo a quantificação da concentração de substância presente na amostra. Para determinar o conteúdo de ácido *p*-cumárico incorporado nos CLs, 0,5g de formulação foi diluído em 50mL de metanol, obtendo-se a concentração teórica de *p*-AC igual a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 15 minutos em banho ultrassônico para facilitar solubilização, uma alíquota de 1mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com metanol, a fim de se obter o ponto referente a $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ da curva analítica. As amostras foram então filtradas e analisadas por CLAE.

4.4.6. Avaliação do perfil de liberação do ácido *p*-cumárico *in vitro*

O ensaio de liberação do *p*-AC incorporado nos cristais líquidos foi adaptado das metodologias descritas por Spagnol (2014) e Victorelli (2016). Foram avaliados os perfis de liberação das formulações selecionadas e do fármaco livre, o último diluído na solução receptora. Os ensaios foram realizados em equipamento Hanson Microette (HANSON 0700-1251) constituído por seis células de Franz, as quais possuem uma área de difusão de $1,77\text{ cm}^2$ e um volume nominal do compartimento receptor de aproximadamente 7,0mL (Figura 8). Foram utilizadas membranas sintéticas de polietersulfona com porosidade de $0,45\mu\text{m}$ pré-hidratadas por 16 horas em tampão-fosfato 30mM de pH=6,8. A fase receptora consistiu de tampão fosfato 30mM (pH = 6,8) contendo lauril sulfato de sódio

(1,25%) atendendo as condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade. O ensaio foi mantido em agitação de 300rpm e temperatura de $37\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e realizado em quintuplicata.

As formulações selecionadas foram pesadas (300mg) e a solução de fármaco livre pipetada (300 μL), em seguidas foram transferidas para o copo dosador, colocado sobre a membrana disposta na célula de Franz. Aliquotas de 2mL foram coletadas nos tempos de 5min, 10min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 12h. A quantificação do *p*-AC nas alíquotas foi realizada por CLAE utilizando a curva analítica em meio receptor, obtida no desenvolvimento do método analítico. Quando necessário, as mesmas foram diluídas com meio receptor para que a concentração fosse mantida dentro da linearidade.



Fig. 8. Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus.

Fonte: Fotografia tirada pela autora.

4.4.7. Avaliação da permeação cutânea do ácido *p*-cumárico *ex vivo*

Este ensaio foi desenvolvido da mesma forma como descrito anteriormente para avaliar a liberação do *p*-AC, porém, ao invés de membranas sintéticas, foram empregadas mucosas vaginais de suínos. As mucosas foram mantidas em solução salina fisiológica 0,9% NaCl por 30 minutos antes do início dos experimentos. A fim de se evitar resultados desproporcionais entre as replicatas, a espessura das mucosas utilizadas no experimento foram medidas com o auxílio de um micrômetro, para que todas estivessem dentro da mesma faixa.

4.4.8. Avaliação da retenção do ácido *p*-cumárico em mucosa suína

A extração do *p*-AC retido na mucosa vaginal foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Mazzarino *et al.* (2015). Decorridas 12 horas de permeação *ex vivo*, a mucosa suína foi retirada do aparelho de difusão, e a área que esteve em contato com as formulações foi limpa com algodão embebido em metanol, recortada e picotada. Os fragmentos obtidos foram triturados com 4 mL de metanol, com auxílio do Ultraturrax, velocidade de 8000rpm por 2 minutos, até a total dilaceração da mucosa. A suspensão resultante foi centrifugada a 4000rpm por 10min para precipitação do tecido. Em seguida o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtros de seringa PTFE de 0,45 μm e injetado em

CLAE. As extrações foram realizadas da mucosa de cada célula utilizada no experimento de permeação (n=5).

4.5. Ensaio biológicos

4.5.1. Obtenção das cepas e condições de crescimento

As cepas de *C. albicans* (SC5314), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. krusei* (ATCC 6528) foram obtidas a partir das coleções de cepas micológicas de dois laboratórios: o Laboratório de Biologia Celular Molecular no Instituto de Botânica e Microbiologia de KU Leuven, Bélgica, sob a supervisão do professor Patrick Van Dijck e do Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCF-UNESP) sob responsabilidade da Profª. Dra. Tais Maria Bauab. Os estoques das culturas foram mantidas em caldo YPD (extrato de levedura - Peptona - Dextrose) e/ou caldo SD (Sabouraud Dextrose) com 20% de glicerol à $-80\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Antes dos experimentos, cada cultura de estoque congelada foi inoculada em ágar YPD 2% de glicose e cultivada durante a noite à $30\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Colônias foram colhidas, subcultivadas em ágar novamente e passadas para garantir pureza e viabilidade. Após três passagens, as colônias foram então colhidas e transferidas para 3mL de caldo YPD e incubadas à $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24h. Para cada espécie de *Candida*, utilizou-se esta suspensão para realizar os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana e erradicação de biofilme.

4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antifúngica do *p*-AC livre e do *p*-AC incorporado foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), através da técnica de microdiluição, de acordo com o documento CLSI M27-A3 (2008) e Rodero *et al.* (2018) com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de *p*-AC em DMSO (100mg.mL^{-1}) e, a partir disso, foram realizadas diluições seriadas (diluições de 2x) da solução estoque em meio RPMI 1640 ajustado para pH 7,0 com tampão MOPS, a fim de atingir concentrações finais de *p*-AC variando de 0,04 a 6mg.mL^{-1} . Fluconazol e anfotericina B foram utilizados como controles positivos e suas diluições seriadas variaram de $0,5\mu\text{g}$ a $64\mu\text{g.mL}^{-1}$. As diluições foram realizadas em uma microplaca de 96 poços, onde cada poço foi inoculado com $100\mu\text{L}$ de suspensão de inóculo ($0,5\times 10^3$ - $2,5\times 10^3$ células. mL^{-1}) e depois foram adicionadas concentrações apropriadas de *p*-AC livre, CLs incorporados e os agentes antifúngicos padrões. Também foram preparados controles para o meio de cultura, crescimento de levedura, esterilidade do fármaco, solventes e formulações. As microplacas foram então incubadas à $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e os valores da CIM lidos visualmente 24 e 48h após a incubação. A

CIM foi definida como a menor concentração na qual pode-se detectar a inibição total do crescimento microbiano, ou seja, não há crescimento visível de fungos após o tempo de incubação.

4.5.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A partir de cada poço que apresentou atividade antifúngica (100% de inibição do crescimento ou um poço opticamente claro) no ensaio de CIM, uma alíquota de 100µL foi inoculada em uma placa de ágar YPD 2% glicose para determinar a CFM. Após a inoculação, as placas foram incubadas novamente a 37°C por 24h e o CFM definido como a concentração mínima necessária para evitar a formação de unidades formadoras de colônias, que devem mostrar crescimento ou menos de três colônias para obter aproximadamente 99 a 99,5% de atividade de morte (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2002; CANTÓN *et al.*, 2003).

4.5.4. Formação de biofilme

A formação de biofilme foi realizada em microplacas esterilizadas de 96 poços de fundo plano, como descrito por Pierce *et al.*, (2008) e Rodero *et al.*, (2018) com algumas modificações. Em cada poço, 100µL das suspensões de células de levedura padronizadas ($3,0 \times 10^7$ células.mL⁻¹) foram inoculados e as placas incubadas à 37±0,5°C por 90min, para completar a fase de pré-adesão, o que permite a ligação das células à superfície. Depois disso, as células não aderidas foram removidas lavando os poços com 100µL de PBS estéril (2x). Finalmente, 200µL de caldo YPD foram adicionados e as microplacas incubadas à 37 ± 0,5 °C por 24h.

4.5.5. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes de *Candida* spp.

Após a formação de um biofilme maduro, os poços foram lavados com PBS estéril para remoção de leveduras fracamente aderidas. Fluconazol e anfotericina B foram utilizados como controle positivo na concentração de 1mg.mL⁻¹ (1000x CIM). Os tratamentos com *p*-AC livre e *p*-AC incorporado foram realizados em duas concentrações: 6mg.mL⁻¹ (CFM) e 12mg.mL⁻¹ (2x CFM). Para verificar se os sistemas poderiam melhorar a atividade de um agente antifúngico comercial, o fluconazol também foi incorporado nas formulações à 1mg/g. As microplacas foram então incubadas novamente por 24 horas à 37±0,5°C e os ensaios realizados em triplicata. Após a incubação, realizou-se a determinação de leveduras viáveis nos poços de duas maneiras diferentes: para os poços tratados com agentes antifúngicos em solução, a quantificação dos biofilmes de *Candida* foi realizada usando o 2,3-bis (2- metoxi-4-nitro-5 ensaio de redução de -sulfofenil) -5 [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazólio (XTT). Enquanto que os poços tratados com CLs tiveram seu número de células determinado por diluição em série, com o auxílio da ruptura estrutural do biofilme via sonicação. As

unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas após incubação à $37 \pm 0,5$ °C por 24h e expressas em UFC.mL⁻¹.

4.5.6. CVV experimental e ensaio terapêutico in vivo utilizando modelo murino

O protocolo utilizado para o ensaio *in vivo* de CVV foi aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais (Projeto: CEUA/FCF/CAR: 16/2019) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP. Os procedimentos foram realizados de acordo com Yano *et al* (2010) e Rodero *et al.* (2018) com algumas modificações. Foram utilizados 90 camundongos Swiss fêmeas (8-10 semanas de idade, 20-25g), alojados em gaiolas forradas com aparas esterilizadas, mantidas em temperatura adequada, com ventilação, ciclo de 12 horas claro/escuro, e água e alimentos disponíveis gratuitamente durante toda a duração do experimento. Inicialmente, os animais receberam 0,1 ml de solução de estradiol (2 mg.mL⁻¹ de óleo de gergelim) duas vezes por semana para estimular um estado hormonal de pseudoestro. Depois disso, 50 camundongos foram infectados com *C. albicans* e 40 com *C. glabrata* no dia 0, e no dia seguinte à infecção foram mantidos em repouso para permitir a fixação dos microrganismos. No dia 2, lavagens vaginais foram realizadas com PBS estéril para verificar a carga fúngica vaginal através de análise microscópica e contagem de colônias em SDA com cloranfenicol. Nos dias 2, 4 e 6 após a infecção, eles receberam uma nova dose de estradiol para manter a fase de pseudoestro. As infecções vaginais foram realizadas no dia 0, usando 100µL de uma suspensão referente à cada cepa contendo $2,5 \times 10^8$ células/mL. Posteriormente, nos dias 2, 4, 6 e 8 as lavagens vaginais foram realizadas com PBS (140µL) e os tratamentos foram realizados em dias alternados. Para monitorar o tempo de infecção em animais individuais, 50µL dos lavados vaginais foram cultivados em placas de SDA com cloranfenicol. As placas foram incubadas à $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas e a carga de fungos na lavagem vaginal foi medida por UFC. O ensaio envolveu dez grupos experimentais contendo cinco animais cada (n = 50). As formulações com fluconazol foram testadas na concentração de 1mg/g, enquanto o *p*-AC foi testado com seu valor de CFM (6mg.mL⁻¹). A tabela 4 mostra os grupos experimentais.

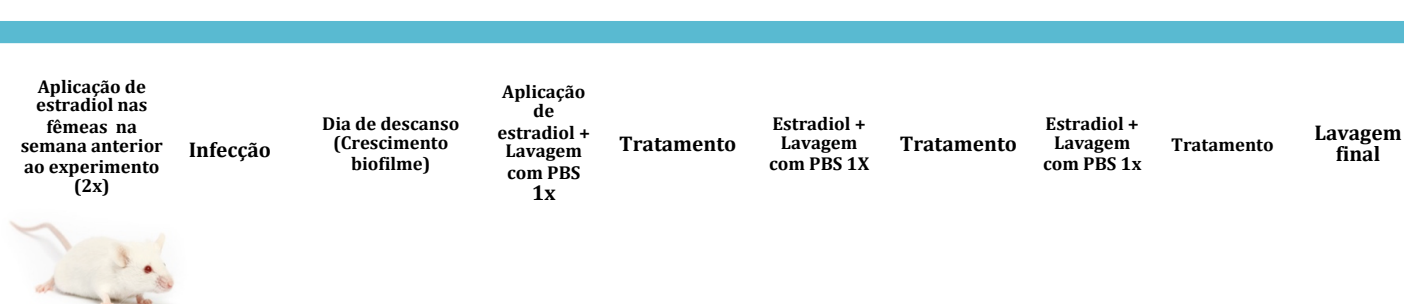
Tabela 4. Grupos experimentais e tratamentos utilizados no ensaio *in vivo* de VVC.

Grupo experimental	Especificação	Tratamento
Grupo 1	Controle negativo de infecção	Os animais não serão infectados e consequentemente não tratados.
Grupo 2	Controle positivo de infecção	Os animais serão infectados com o inóculo de <i>Candida</i> e não tratados.
Grupo 3	Controle positivo com antifúngico convencional	Animais infectados tratados com 20µL de CLs incorporados com Fluconazol (P24)
Grupo 4	Controle positivo com antifúngico convencional	Animais infectados tratados com 20µL de CLs incorporados com Fluconazol (P29)

Grupo 5	Controle do sistema	20µL do sistema sem o fármaco (P24)
Grupo 6	Controle do sistema	20µL do sistema sem o fármaco (P29)
Grupo 7	Tratamento 1 (CLs + <i>p</i> -AC)	20µL do sistema P24 com 6mg/g de fármaco (P24+ <i>p</i> -AC)
Grupo 8	Tratamento 2 (CLs + <i>p</i> -AC)	20µL do sistema P29 com 6mg/g de fármaco (P29+ <i>p</i> -AC)
Grupo 9	Tratamento 3 (<i>p</i> -AC livre)	20µL do fármaco livre (6mg.mL ⁻¹) em solução de DMSO 6%
Grupo 10	Controle do solvente	20µL da solução DMSO à 6%

Visto que duas cepas foram avaliadas, o controle negativo e o controle de solvente foram o mesmo para ambas as cepas, pois no primeiro não houve a infecção do animal e no segundo avaliou-se a citotoxicidade do DMSO frente à mucosa do camundongo, e não contra a cepa (esta foi verificada *in vitro*). Assim, não há a necessidade de dois grupos com DMSO. Este é o motivo para a diferença de número de camundongos supracitados utilizados para cada cepa.

O delineamento do experimento *in vivo*, com a ordem das aplicações de tratamento e lavagens, pode ser encontrado a seguir. Após a lavagem final e coleta dos lavados, as fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO₂ (CEUA-FIOCRUZ, 2008).



4.5.7. Análise da eficácia do tratamento

Nos dias 2, 4, 6 e 8 do período de lavagens, os animais foram submetidos à coleta de fluidos vaginais para verificar a presença ou ausência de leveduras no ambiente vaginal. Os lavados foram semeados em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubados à 37°C por 48 horas, assim a eficácia dos tratamentos foi verificada pela contagem do número de UFC das lavagens vaginais de cada grupo. Os lavados também foram submetidos à coloração de Giemsa para análise microscópica, a fim de visualizar as formas de virulência das cepas.

4.6. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente por análise de variância Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, sendo este com nível de significância de 0,05%. O software utilizado para processar os dados foi o GraphPad Prisma., versão 8.0, 2018.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção dos diagramas de fases

Foram construídos 2 diagramas com fase oleosa constituída por ácido oleico e colesterol (na proporção 5:1 v/v) e fase aquosa constituída por dispersão de poloxamer 16%. A fim de se avaliar as propriedades tensoativas do oleato de trietanolamina (TEA-Oleato), em um dos diagramas ele foi adicionado como tensoativo e no outro ele foi formado a partir da mistura da trietanolamina (TEA) com ácido oleico. Ambos os diagramas estão representados nas figuras 9 e 10. As formulações do diagrama formado por TEA, visto que trata-se de um composto líquido viscoso incolor, puderam ser diferenciadas visualmente como: transparente, translúcida e opaca (branca) e compõem em sua maioria sistemas viscosos translúcidos (SVTL), sistemas viscosos opacos (SVO) e sistemas líquidos translúcidos (SLTL). Ainda que as fases aquosa e oleosa tenham sido fixadas para ambos os diagramas, as formulações provenientes de cada um deles mostraram-se bastante distintas devido apenas à mudança dos componentes utilizados como tensoativos.

O diagrama de TEA-Oleato apresentou em sua maioria sistemas viscosos transparentes (SVT) e sistemas viscosos opacos (SVO).

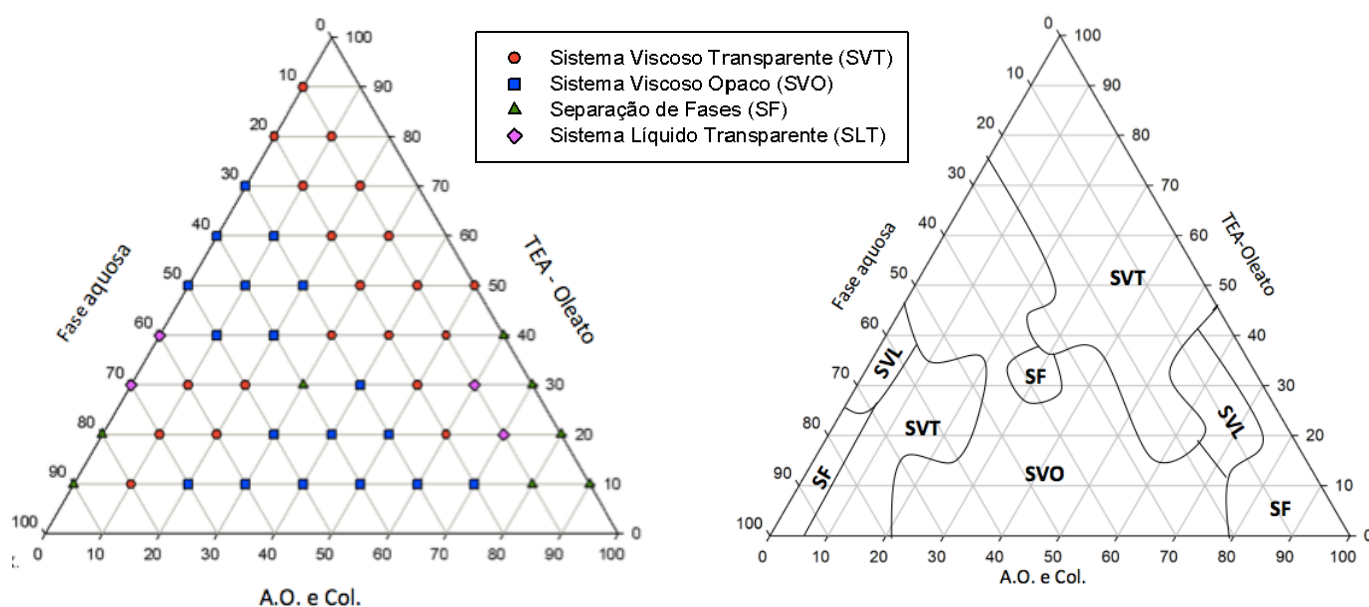


Fig. 9. Diagramas de fases (pontual e de linhas) compostos por fase aquosa, fase oleosa e TEA-Oleato, apresentando a disposição de viscosidade de cada ponto.

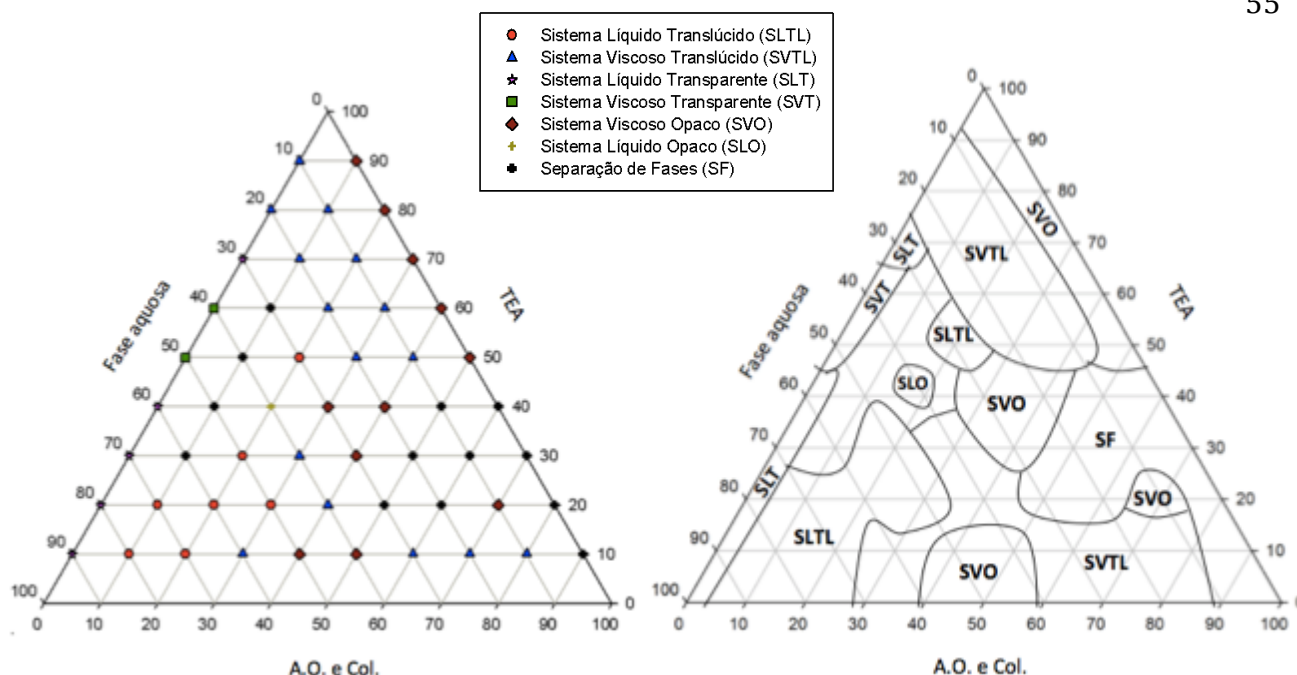


Fig. 10. Diagramas de fases ternários (pontual e de linhas) compostos por fase aquosa, fase oleosa e TEA, apresentando a disposição da viscosidade de cada ponto.

Por ser comumente utilizada para balancear o pH de produtos químicos, fez-se necessária uma pesquisa a fim de apurar a toxicidade da TEA. Fiume e colaboradores (2013) elaboraram um painel avaliando a segurança do uso da trietanolamina e de ingredientes que contenham TEA em cosméticos. Segundos os autores, substâncias formadas com TEA podem agir como tensoativos e são seguras para utilização em formulações de uso tópico, desde que estas sejam voltadas para uso descontínuo. Em seu trabalho, eles apresentam diversos exemplos em que este composto pode ser utilizado na indústria de cosméticos, como por exemplo: emulsões *leave-on*, shampoos, condicionadores capilares, géis capilares, loções corporais e cremes hidratantes. Além disso, a exposição ao uso de TEA pode envolver contato via pele, mucosas, unhas, cabelo e as vezes, inalação acidental.

Kraeling e Bronaugh (2003) analisaram a penetração da TEA na pele humana empregando técnica de difusão celular *in vitro*, utilizando uma emulsão O/A, na qual o agente emulsificante foi o estearato de trietanolamina. Os resultados obtidos demonstraram que absorção de TEA é dependente do pH da formulação, possivelmente devido à ionização do composto. No pH 7,0, a absorção de TEA foi de 0,43% durante uma exposição de 24h, enquanto que no pH 8,0 foi de 1,1%. Quantidades substanciais de TEA permaneceram na pele no final do estudo (9,4% da dose), mas apenas quantidades mínimas foram difundidas no fluido receptor quando o tempo de coleta foi estendido para 72h. Dessa forma, a absorção de TEA pela pele humana demonstrou-se baixa em condições que simulam a exposição do uso cosmético.

Friberg, Liang e Lockwood (1987) ao apresentarem combinações entre tensoativos iônicos e anfífilicos hidrofóbicos de cadeia longa para a formação de cristais líquidos liotrópicos descreveram que a combinação de ácido oleico e trietanolamina promove a formação de cristais líquidos de

mesofase lamelar, visto que a reação entre estes dois compostos produz moléculas de oleato de trietanolamina, e a interação entre essas moléculas com o ácido oleico e a TEA remanescentes, que não interagiram, forma o cristal líquido.

Segundo Hyde (2001), a fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso, a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel e a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada. Diante de tais informações, foram selecionados sistemas que em ambos os diagramas apresentaram anisotropia sob microscopia de luz polarizada e viscosidade favorável para mucoadesividade.

5.3. Pré-seleção das formulações

As formulações pré-selecionadas em ambos os diagramas (Figura 11) estão em regiões de viscosidade evidentes visualmente e apresentaram estruturas características de cristais líquidos quando analisadas por MLP. Além delas, também avaliou-se o possível deslocamento dos pontos nos diagramas ao adicionar o MVA nas proporções 1:0,3 (m/m) e 1:1 (m/m) ou seja, à 30% e 100% da massa final das formulações. Essa adição promove uma diluição no sistema devido ao aumento na fase aquosa. Nas tabelas 5 e 6 estão representados os sistemas escolhidos, a composição de cada fase, a viscosidade, anisotropia visualizadas e os respectivos pHs. Já a figura 12 apresenta a diluição das formulações pré-selecionados nos diagramas.

Tabela 5. Apresentação das formulações selecionadas, suas composições, características estruturais e visuais empregando TEA-Oleato.

Formulações selecionadas	Fase Oleosa	TEA-Oleato	Fase aquosa	Análise da viscosidade	Estruturas visualizadas por MLP	pH
P24	30%	40%	30%	SVT	Estrias	5
P29	30%	50%	20%	SVT	Estrias e cruces de malta	5

Tabela 6. Apresentação das formulações selecionadas, suas composições, características estruturais e visuais empregando TEA.

Formulações selecionadas	Fase Oleosa	TEA	Fase aquosa	Análise da viscosidade	Estruturas visualizadas por MLP	pH
P24	30%	40%	30%	SVO	Estrias e cruces de malta	8
P29	30%	50%	20%	SVTL	Cruces de malta	7

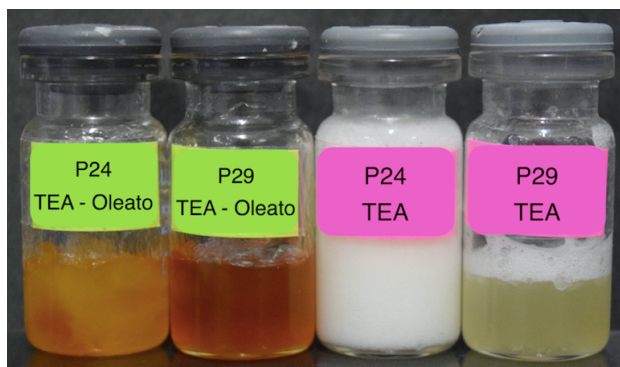


Fig. 11. Formulações P24 e P29 sem fármaco, pré-selecionadas de cada diagrama construído.

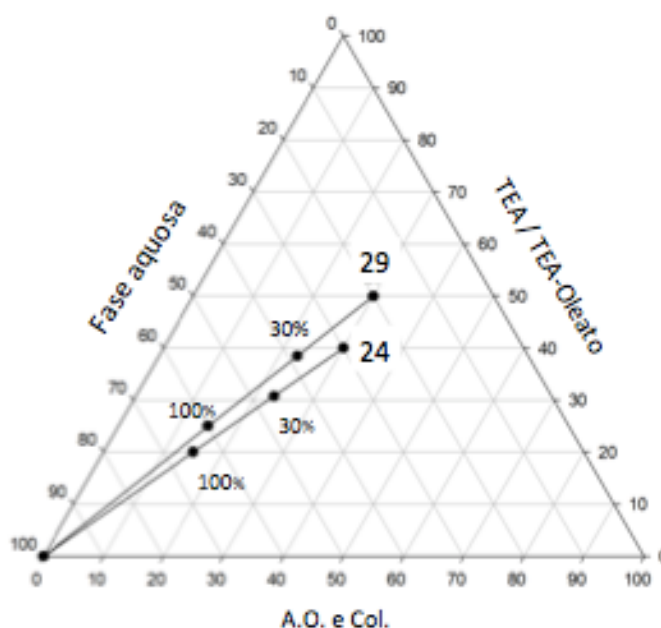


Fig. 12. Deslocamento dos sistemas pré-selecionados nos diagramas após a adição de MVA.

Dessa maneira, 12 formulações foram analisadas visualmente e por MLP, com o intuito de observar possíveis mudanças após a adição do muco artificial. Na tabela 7, observa-se que mesmo com a adição do MVA, os sistemas compostos por TEA-Oleato permaneceram altamente viscosos, já aqueles constituídos de TEA modificaram de um sistema viscoso para um sistema líquido translúcido, tanto na proporção de 30% quanto na de 100%. Essa mudança na viscosidade faz com que as formulações constituídas por TEA sejam menos interessantes para uma possível aplicação vaginal, visto que ao entrar em contato com o muco, o sistema pode tornar-se líquido e não aderir à mucosa, inviabilizando o tratamento. Outro fator a ser considerado é o pH das formulações. Para um ambiente vaginal saudável, o pH deve ser mantido abaixo de 4,5 (NYIRJESY, 2001). Assim, analisando os valores obtidos para cada formulação, os sistemas do diagrama TEA desestabilizariam o pH ácido vaginal, caso não tenham seus pHs corrigidos.

Como último parâmetro de avaliação, a análise reológica foi utilizada para definir quais das 12 formulações possui o melhor perfil para aplicação tópica.

Tabela 7. Formulações pré-selecionadas como possíveis sistemas de liberação de *p*-AC.

Formulações analisadas	Análise visual de viscosidade	Leitura por MLP
P24 TEA-Oleato	SVT	Estrias
P24 TEA-Oleato 30%	SVT	Estrias e cruces de malta
P24 TEA-Oleato 100%	SVT	Estrias e cruces de malta
P29 TEA-Oleato	SVT	Estrias e muitas cruces de malta
P29 TEA-Oleato 30%	SVO	Estrias e cruces de malta
P29 TEA-Oleato 100%	SVO	Estrias e cruces de malta
P24 TEA	SVO	Estrias e cruces de malta
P24 TEA 30%	SLTL	Cruces de malta
P24 TEA 100%	SLTL	Cruces de malta
P29 TEA	SVTL	Muitas cruces de malta
P29 TEA 30%	SLTL	Cruces de malta
P29 TEA 100%	SLTL	Cruces de malta

As formulações pré-selecionadas foram caracterizadas antes e após a incorporação do ácido *p*-cumárico, o que possibilitou verificar se a presença do fármaco provoca mudanças na mesofase, viscosidade, estrutura, comportamento reológico ou aparência visual. Para isso, o trabalho de Spagnol (2014) com ácido cafeico (composto derivado do ácido *p*-cumárico e de estrutura química semelhante) foi utilizado como referência, e para cada sistema selecionado, foram incorporados 10mg/g de *p*-AC.

5.4. Microscopia de luz polarizada

Através da MLP é possível classificar os cristais líquidos quanto à anisotropia visualizada. Algumas mesofases características de cristais líquidos liotrópicos podem apresentar anisotropia, dessa forma, a organização estrutural de um sistema líquido-cristalino pode ser identificada de acordo com a ocorrência de campos de visualização específicos, como as cruces de Malta no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal. Em contrapartida, a fase cúbica não apresenta anisotropia, assim como sistemas micelares, microemulsões e emulsões, consequentemente apenas um campo escuro é observado nesses casos (HYDE, 2002; FONSECA-SANTOS, 2015).

Nas figuras 13 e 14 observa-se que, tanto antes quanto após a incorporação do *p*-AC, os sistemas pré-selecionados apresentaram estrias, cruces de malta ou a presença de ambos durante a

microscopia. Os resultados obtidos coincidem com os estudos supracitados nos quais sugere-se a formação de cristais líquidos de fase lamelar durante a interação de TEA com ácido oleico. Esta afirmação pode ser feita visto que a maior parte das formulações apresentou cruces de malta, algumas delas em grande quantidade. Dessa forma, a anisotropia observada por MLP sugere a formação de mesofases hexagonais (P24 TEA-Oleato) e lamelares (todos os outros sistemas). A partir das imagens obtidas é possível observar que a incorporação do ácido *p*-cumárico não alterou as mesofases dos CLs, tampouco provocou mudança na viscosidade das formulações, quando observada visualmente. Entretanto, após a incorporação do MVA, os sistemas P24 sofreram alterações em suas mesofases, pois a formulação P24 TEA-Oleato passou a apresentar cruces de Malta, enquanto que a P24 TEA perdeu suas estrias. Também pode-se notar a presença de bolhas em quase todas as fotomicrografias do diagrama da TEA, situação que também ocorreu após a adição do MVA seguida de homogeneização. A trietanolamina em contato com o aumento da fase aquosa provocou a formação de espuma, e consequentemente, bolhas. Esse fenômeno provavelmente foi originado por uma reação de saponificação, resultante da mistura entre o ácido graxo (ácido oleico) e uma base orgânica (trietanolamina). Este é mais um fator que descarta a possibilidade de utilização dos sistemas compostos apenas por TEA como substância com propriedade tensoativa.

Os sistemas estudados também mostraram boa estabilidade, visto que não houve alteração nas características organolépticas, como odor, cor e homogeneidade em nenhuma das formulações analisadas, durante um período de 30 dias. Em um período de 40 dias, a única diferença verificada foi um aumento numérico na quantidade de cruces de malta nos sistemas que inicialmente possuíam poucas cruces.

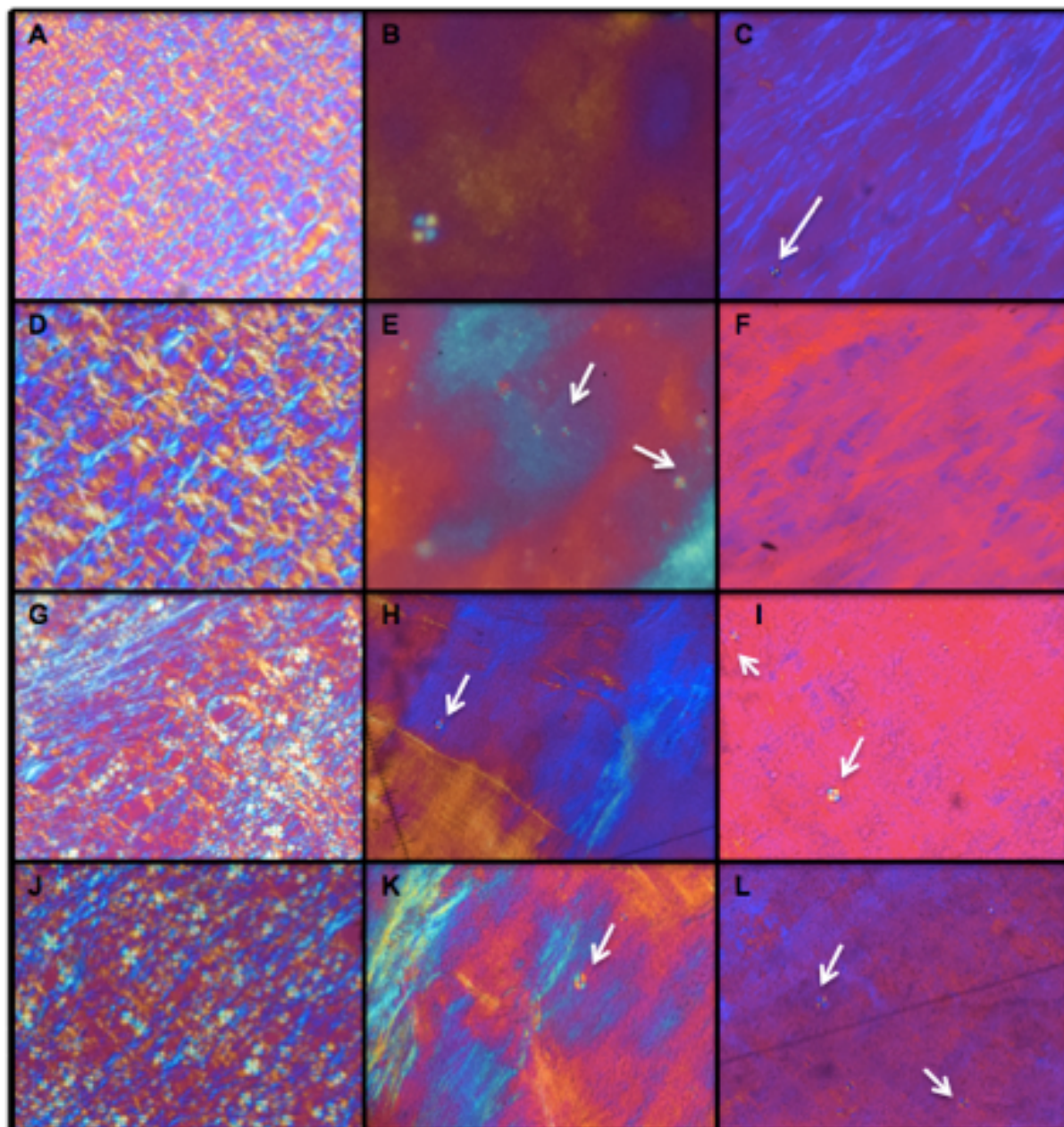


Fig. 13. Fotomicrografias obtidas por MLP das formulações compostas por TEA-Oleato como tensoativo. Comparação entre os sistemas com e sem adição do muco, não-incorporados e incorporados com *p*-AC. As setas brancas indicam a presença de cruces de Malta. A) P24 TEA-Oleato; B) P24 TEA-Oleato 30%; C) P24 TEA-Oleato 100%; D) P24 TEA-Oleato + *p*-AC; E) P24 TEA-Oleato 30% + *p*-AC; F) P24 TEA-Oleato 100% + *p*-AC; G) P29 TEA-Oleato; H) P29 TEA-Oleato 30%; I) P29 TEA-Oleato 100%; J) P29 TEA-Oleato + *p*-AC; K) P29 TEA-Oleato 30% + *p*-AC; L) P29 TEA-Oleato 100% + *p*-AC.

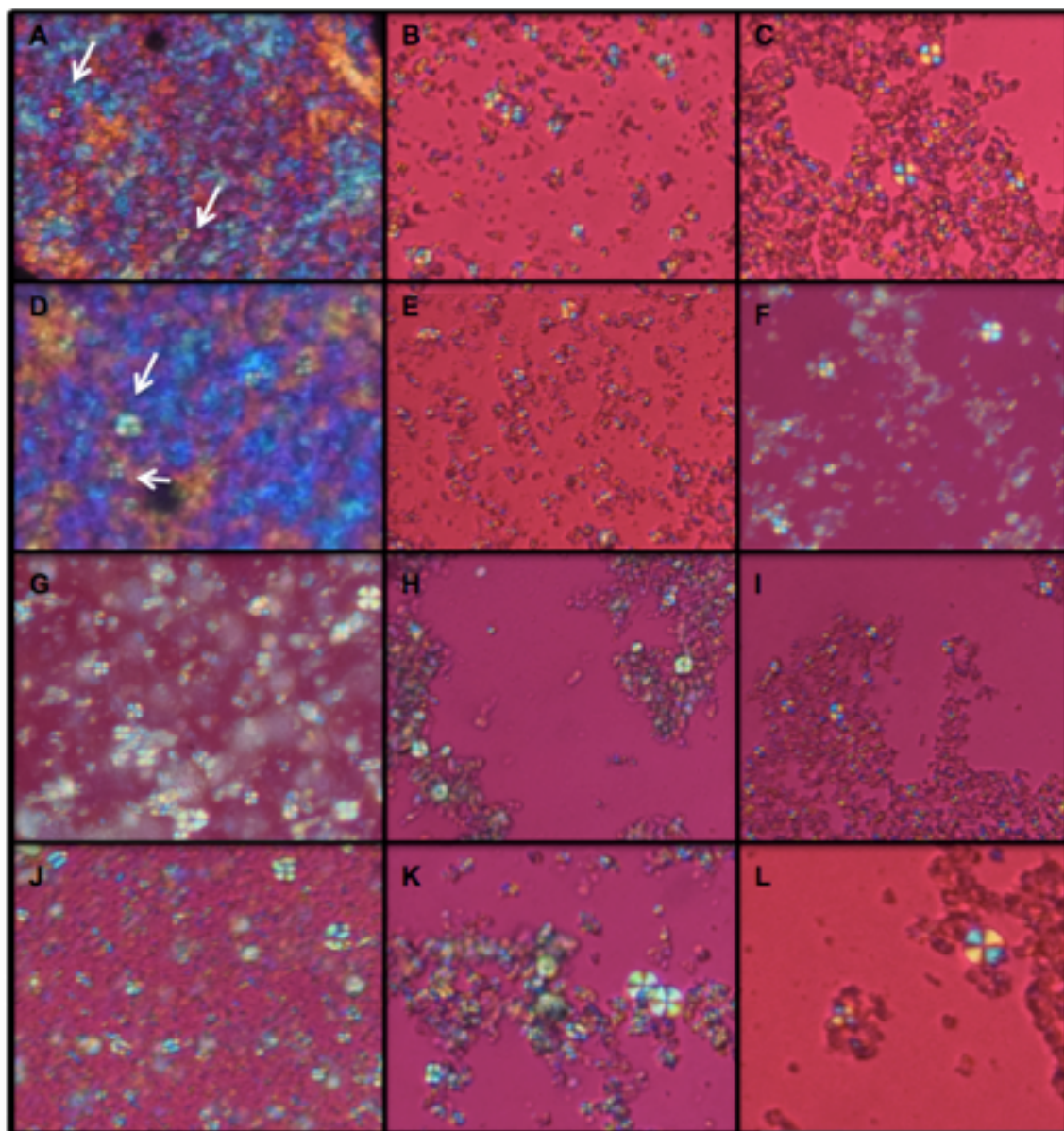


Fig. 14. Fotomicrografias obtidas por MLP das formulações compostas por TEA como tensoativo. Comparação entre os sistemas com e sem adição do muco, não-incorporados e incorporados com *p*-AC. As setas brancas indicam a presença de cruzeiros de Malta. A) P24 TEA; B) P24 TEA 30%; C) P24 TEA 100%; D) P24 TEA+ *p*-AC; E) P24 TEA 30% + *p*-AC; F) P24 TEA 100% + *p*-AC; G) P29 TEA; H) P29 TEA 30%; I) P29 TEA 100%; J) P29 TEA + *p*-AC; K) P29 TEA 30% + *p*-AC; L) P29 TEA 100% + *p*-AC.

5.5. Comportamento reológico

A reologia é um estudo que descreve o escoamento ou a deformação de um material quando este é submetido à uma tensão (SCHRAMM, 2006). A natureza desta deformação e o comportamento que o fluido apresenta sob tensão dependem das substâncias que compõem este material, e das interações que ocorrem entre elas. A partir de análises reológicas pode-se obter informações importantes sobre as características de sistemas líquidos, semi-sólidos e sólidos, como a viscosidade do sistema, sua organização estrutural e comportamento viscoelástico (NAE, 2016). Desta maneira,

analisar o comportamento reológico das formulações selecionadas mostra-se interessante, visto que estas foram desenvolvidas para aplicação tópica, logo serão submetidas à tensões durante a aplicação na mucosa vaginal.

Antes de apresentar os resultados obtidos no ensaio reológico, é relevante esclarecer que apenas as formulações do diagrama TEA-Oleato foram representados graficamente. Todas as 12 formulações tiveram seu comportamento reológico analisado quando incorporadas ou não com o ácido *p*-cumárico, contudo ao verificar os resultados obtidos, decidiu-se selecionar apenas 6 para dar continuidade à caracterização e avaliação dos sistemas líquido-cristalinos como potencial sistema de liberação de fármacos. Entre os sistemas escolhidos estão apenas aqueles compostos por TEA-Oleato como tensoativo, adicionados ou não de MVA, visto que estes apresentaram características mais favoráveis à aplicação vaginal, como alta viscosidade, maior organização estrutural e pseudoplasticidade acompanhada de tixotropia.

O diagrama composto por TEA já havia apresentado algumas desvantagens na MLP e na viscosidade após a adição de muco artificial, consequentemente esta situação também foi demonstrada na reologia. Os sistemas P24 e P29 TEA, sem a adição de muco, apresentaram comportamento oscilatório elástico, o qual representa estruturas altamente organizadas, com comportamento semelhante a géis (YARIV *et al.*, 2010). Contudo, ao adicionar 30% e 100% de MVA, os sistemas sofreram uma inversão nos valores de G' e G'' , tornando-se mais viscosos, o que indica o caráter líquido do material (BERNEGOSSI, 2014). Essa mudança de comportamento já foi descrita na literatura por Chang e colaboradores (2002) em géis vaginais termossensíveis e mucoadesivos compostos por diferentes concentrações de poloxamer. A fim de mimetizar as condições fisiológicas do ambiente natural vaginal, o grupo adicionou MVA nos géis de poloxamer e observou que nas formulações onde ele foi adicionado, ocorreu uma diluição que reduziu o módulo de elasticidade (G'). Os autores sugerem que a presença de sais e proteínas existentes no fluido vaginal pode ter provocado essa inversão no comportamento viscoelástico.

Deste modo, apenas os sistemas P24 TEA-Oleato e P29 TEA-Oleato e suas respectivas diluições foram selecionadas e estão apresentadas nos itens seguintes.

5.5.1. Análise reológica contínua

A análise de fluxo de uma formulação é obtida através da correlação entre a tensão e a taxa de cisalhamento, a qual pode ser representada em diagramas denominados curvas de fluxo. Estes diagramas são formados por uma curva ascendente (reflexo do comportamento da amostra sob um aumento da taxa de cisalhamento) e por uma curva descendente (reflexo do comportamento da amostra com a diminuição da taxa de cisalhamento) (SCHRAMM, 2006; BERNEGOSSI, 2014). Ao

analisar o perfil destas curvas, torna-se possível classificar o material em análise de acordo com o seu comportamento reológico. Ex: newtoniano, não-newtoniano, pseudoplástico, plástico, dilatante, tixotrópico ou reopético (CALIXTO, 2013).

De acordo com Chang *et al.* (2002), as propriedades de fluxo de formulações desenvolvidas para aplicação vaginal podem ser úteis para prever o espalhamento e revestimento destes sistemas sobre os epitélios vaginais.

Os resultados estão dispostos de modo a comparar o comportamento de uma formulação frente às temperaturas diferentes e à incorporação ou não-incorporação do *p*-AC.

A partir dos reogramas obtidos (Figuras 15 à 19) é possível observar que todas as formulações comportam-se como fluidos não-newtonianos, uma vez que não apresentaram linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, o que resultou em mudanças na viscosidade aparente das formulações tanto à $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ quanto à $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ (SCHRAMM, 2006). Também pode-se verificar que em ambas as temperaturas, após ultrapassarem uma tensão inicial de cisalhamento mínima, todas as formulações se comportaram como fluidos pseudoplásticos. Essa tensão limite de escoamento pode ser explicada devido à estrutura do poloxamer, um polímero de alto peso molecular com muitas ligações C-C, as quais se reorganizam conforme a tensão é aplicada. Esse rearranjo pode causar o empacotamento de agregados micelares, o que gera mais ligações cruzadas e consequentemente maior resistência ao fluxo dessas formulações (KLOUDA, 2015; BRADY *et al.*, 2016).

Em fluidos pseudoplásticos, com o aumento da tensão de cisalhamento, ocorre a diminuição da viscosidade dos sistemas (AULTON, 2005). Esta característica é adequada para formulações indicadas ao uso tópico, pois ao administrá-las será aplicada uma tensão, a qual diminuirá a viscosidade do sistema, consequentemente facilitando sua fluidez e espalhabilidade na superfície alvo (AGUIAR, 2016).

Além da pseudoplasticidade, P24 TEA-Oleato, P24 TEA-Oleato 30%, P29 TEA-Oleato e P29 TEA-Oleato 30% (Figuras 15, 16, 18 e 19, respectivamente) também apresentaram tixotropia. A tixotropia é a propriedade de alguns fluidos pseudoplásticos não-newtonianos em sofrer uma mudança na viscosidade que é dependente do tempo, ou seja, quanto mais tempo o fluido sofre tensão de cisalhamento, menor é sua viscosidade, porém quando a velocidade de cisalhamento é removida e as tensões de cisalhamento são relaxadas, o sistema tende a readquirir sua estrutura inicial (AULTON, 2005; NAE, 2016; ALMEIDA; BAHIA, 2003). Quando o material se reestrutura, as curvas ascendentes e descendentes do reograma ficam deslocadas, resultando em uma área de histerese. Dessa forma, pode-se afirmar que a tixotropia é diretamente proporcional à área de histerese, ou seja quanto maior a histerese, maior a tixotropia do sistema (CHORILLI, 2007; NAE, 2016).

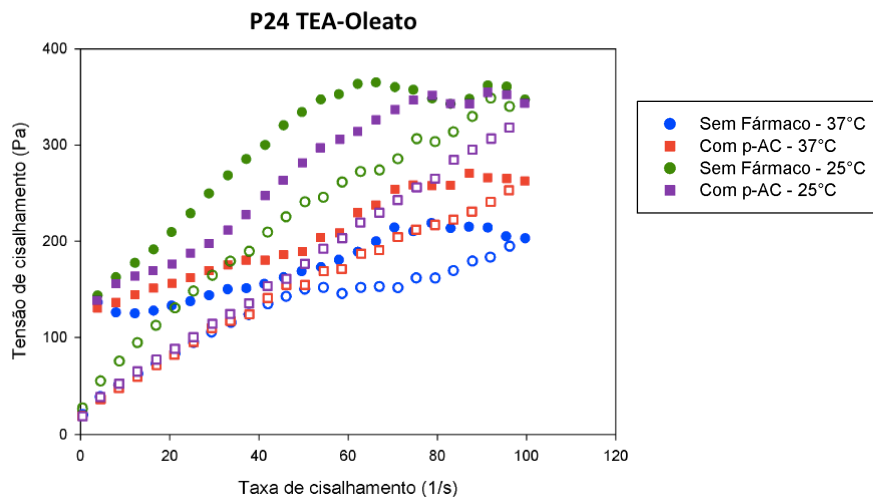


Fig. 15. Reograma da formulação P24 TEA-Oleato à 25°C e 37°C, quando incorporada ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

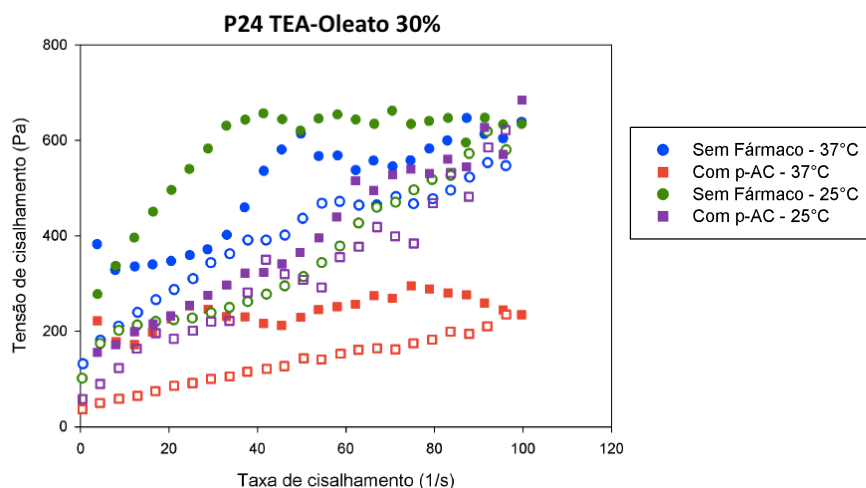


Fig. 16. Reograma da formulação P24 TEA-Oleato com adição de 30% de MVA, à 25°C e 37°C, quando incorporada ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

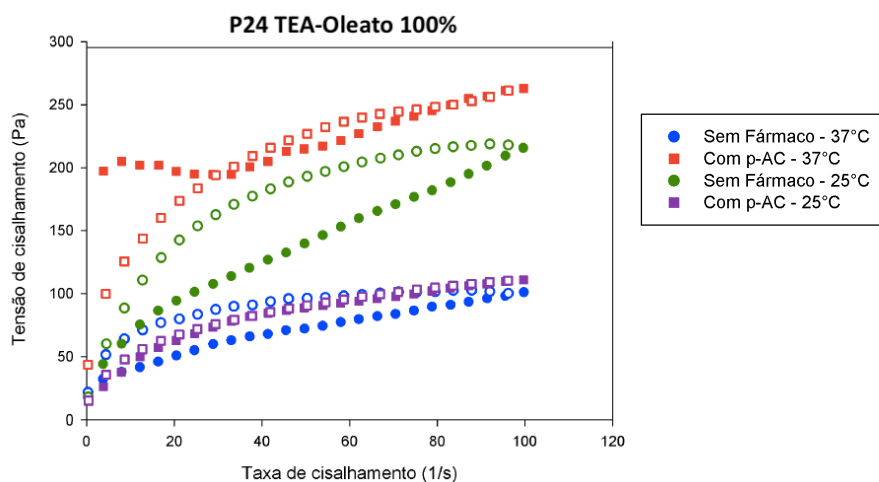


Fig. 17. Reograma da formulação P24 TEA-Oleato com adição de 100% de MVA, à 25°C e 37°C, quando incorporada ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

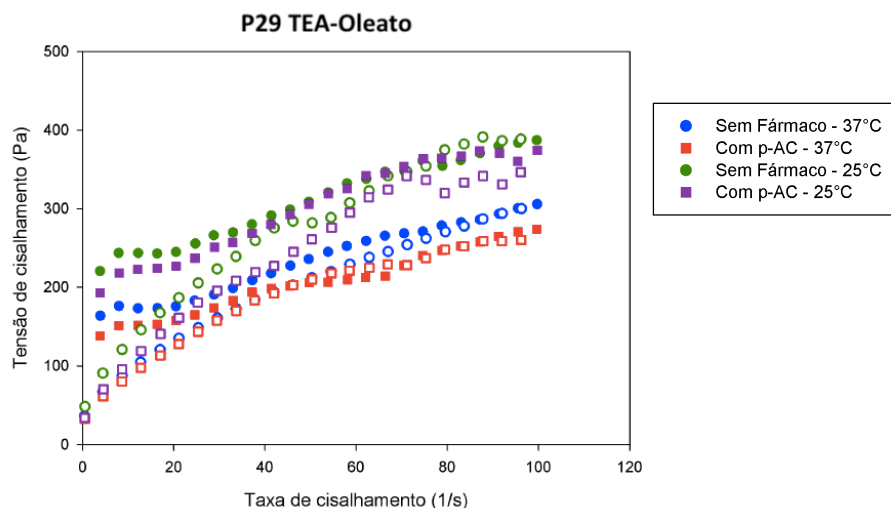


Fig. 18. Reograma da formulação P29 TEA-Oleato à 25°C e 37°C, quando incorporado ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

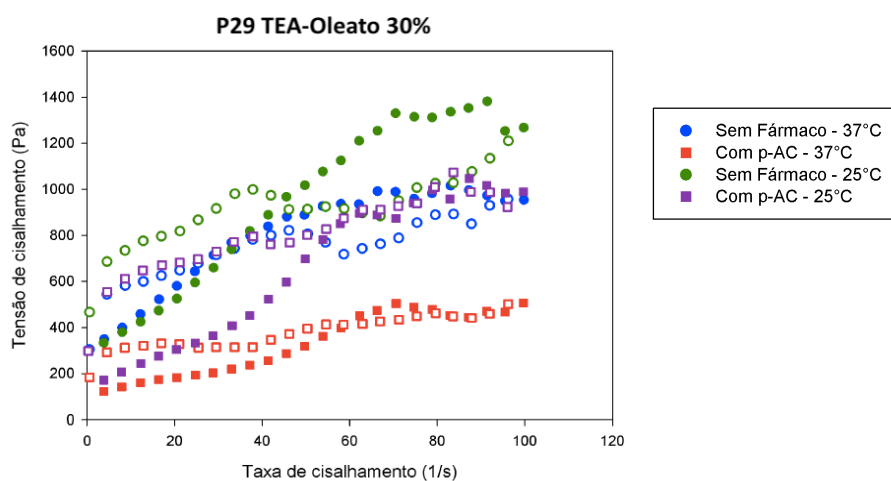


Fig. 19. Reograma da formulação P29 TEA-Oleato com adição de 30% de MVA, à 25°C e 37°C, quando incorporada ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

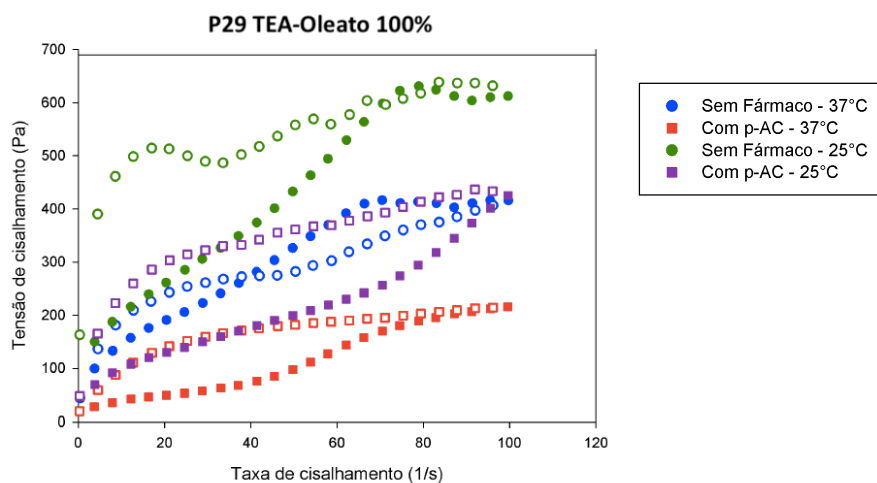


Fig. 20. Reograma da formulação P29 TEA-Oleato com adição de 100% de MVA, à 25°C e 37°C, quando incorporada ou não com *p*-AC. Os símbolos cheios representam as curvas ascendentes e os vazios, as curvas descendentes.

A presença de tixotropia também é desejável em formulações tópicas para liberação controlada de fármacos na mucosa vaginal. Dessa forma, após a diminuição da viscosidade devido à aplicação da formulação, o sistema retomaria sua viscosidade inicial com uma rápida reestruturação (ALMEIDA; BAHIA, 2003; BERNEGOSI, 2014).

De maneira oposta, as duas formulações contendo 100% de muco artificial (Figuras 17 e 20) apresentaram comportamento reopético ou anti-tixotrópico, ou seja, conforme a tensão de cisalhamento aumenta, a viscosidade aumenta também, de maneira irreversível (ALMEIDA; BAHIA, 2003). Neste fenômeno, a curva descendente volta acima da curva ascendente, no sentido anti-horário da curva (SCHRAMM, 2006). O comportamento reológico dessas formulações revela que elas são dependentes de uma ação de cisalhamento para formar arranjos mais organizados.

Este resultado é bastante relevante, pois as duas formulações adicionadas com 100% de MVA tendem a simular o possível comportamento do sistema líquido-cristalino no ambiente vaginal, quando em contato com a mucosa. Dessa forma, ao entrarem em contato com o epitélio, a viscosidade dos sistemas aumentaria, promovendo um aumento na mucoadesão, o que dificultaria o escoamento das formulações e consequentemente, a perda da ação terapêutica. O perfil anti-tixotrópico também é interessante para aplicação tópica, pois demonstra que após aplicada no sítio alvo, a formulação permaneceria mais estruturalmente estável.

Tabela 8. Valores de índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Análise de fluxo - Sem fármaco				
Formulações	k (25°C)	η (25°C)	k (37°C)	η (37°C)
P24 TEA-Oleato	87,356	0,322	68,087	0,246
P24 TEA-Oleato 30%	265,106	0,208	176,849	0,276
P24 TEA-Oleato 100%	18,999	0,519	15,549	0,400
P29 TEA-Oleato	134,92	0,221	85,972	0,265
P29 TEA-Oleato 30%	115,619	0,549	226,555	0,335
P29 TEA-Oleato 100%	49,896	0,5662	45,420	0,499
Análise de fluxo - com p-AC				
Formulações	k (25°C)	η (25°C)	k (37°C)	η (37°C)
P24 TEA-Oleato	57,794	0,401	61,887	0,315
P24 TEA-Oleato 30%	35,509	0,623	152,646	0,122
P24 TEA-Oleato 100%	19,967	0,376	146,458	0,111
P29 TEA-Oleato	109,16	0,268	74,988	0,267
P29 TEA-Oleato 30%	36,471	0,742	29,119	0,628
P29 TEA-Oleato 100%	10,867	0,767	1,855	1,045

Na Tabela 8 estão dispostos os valores de k e η das formulações à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O valor de k é o índice de consistência e η é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa fluido pseudoplástico, e $n = 1$ fluido newtoniano (BERNEGOS-SI, 2014). Conforme apresentado na Tabela 8, os valores de k e η foram influenciados pela incorporação de MVA e p -AC, mas não pela temperatura. Com exceção do P29 TEA-Oleato 100% à 37°C , todos os sistemas apresentaram $\eta < 1$, caracterizando pseudoplasticidade. Houve uma diminuição no valor k e um aumento no valor η para a maioria das formulações, com exceção do P24 TEA-Oleato 100% à 37°C . Sabendo-se que o k aumenta com a viscosidade da formulação, este resultado sugere que a incorporação de muco e p -AC pode ter desestabilizado a estrutura líquido-cristalina por afetar as ligações moleculares entre os componentes das formulações (CHANG *et al.*, 2002 ; ZHAO *et al.*, 2011; CALIXTO *et al.*, 2015). Além disso, é possível notar que nos sistemas sem o p -AC, aqueles que possuíam 30% de MVA apresentaram maior viscosidade, enquanto que as formulações com 100% de muco demonstraram ser menos viscosas.

5.5.2. Análise oscilatória

A análise reológica oscilatória investiga as propriedades viscoelásticas e materiais das formulações, o que traz informações quanto à natureza estrutural do sistema, implicando diretamente no desempenho da formulação (SCHRAMM, 2006). O comportamento viscoelástico de um fluido significa que ele apresenta características semelhantes às de um líquido e de um sólido concomitantemente e este pode ser analisado através de dois parâmetros denominados módulo elástico ou de armazenamento (G') e módulo viscoso (ou de perda) (CHORILLI, 2007). Ambos possuem estas denominações, pois o G' representa a energia estocada durante a deformação à tensão crescente e liberada na contração quando a tensão é relaxada, enquanto que o G'' está relacionado ao material que não pode armazenar energia, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível (BERNEGOS-SI, 2014).

Nas figuras 21 a 26 observa-se a evolução temporal dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') das formulações selecionadas. A partir da análise dos reogramas obtidos todas as formulações submetidas ao ensaio oscilatório apresentaram caráter mais elástico do que viscoso ($G' > G''$), tanto à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ quanto à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Esse comportamento é típico de formulações altamente estruturadas e organizadas, as quais possuem fortes interações entre as moléculas.

Chang *et al.* (2002) e Yun Chang *et al.* (2002) investigaram o comportamento viscoelástico de géis de poloxamer e verificaram que sua viscosidade aumenta em função do aumento de temperatura, devido a transição sol-gel que este polímero sofre. Dessa forma, há também o aumento do módulo elástico, e o surgimento das propriedades mucoadesivas (FONSECA-SANTOS, 2015).

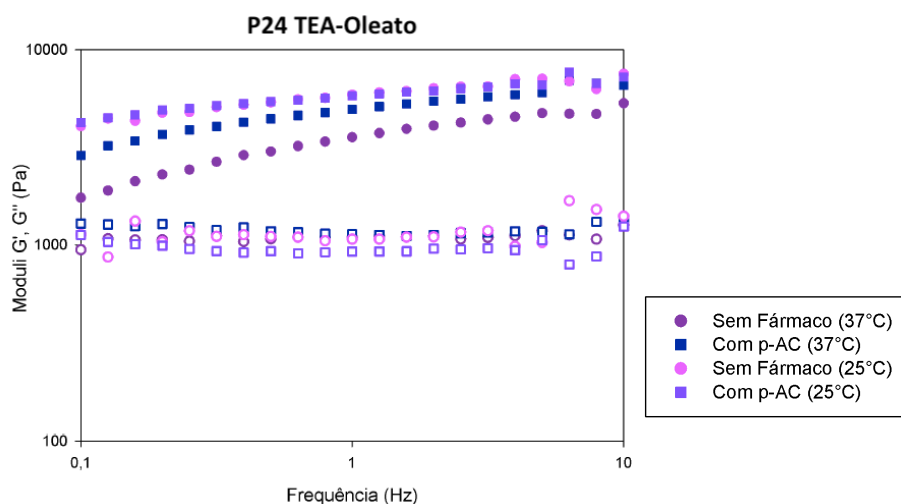


Fig. 21. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P24 TEA-Oleato.

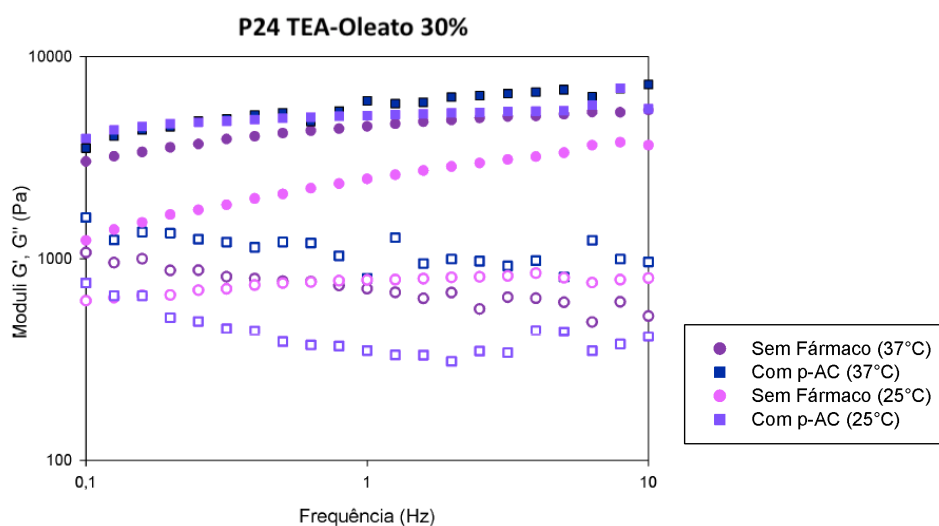


Fig. 22. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P24 TEA-Oleato com adição de 30% de MVA.

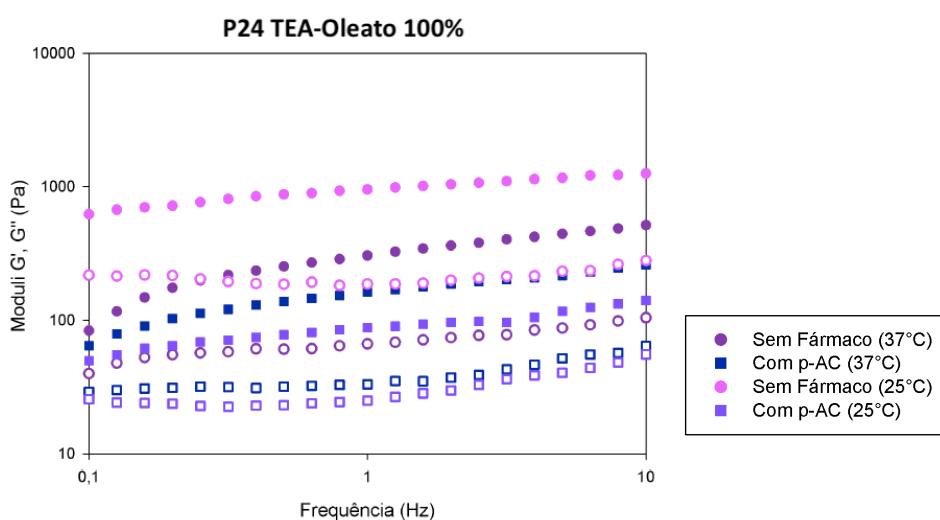


Fig. 23. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P24 TEA-Oleato com adição de 100% de MVA.

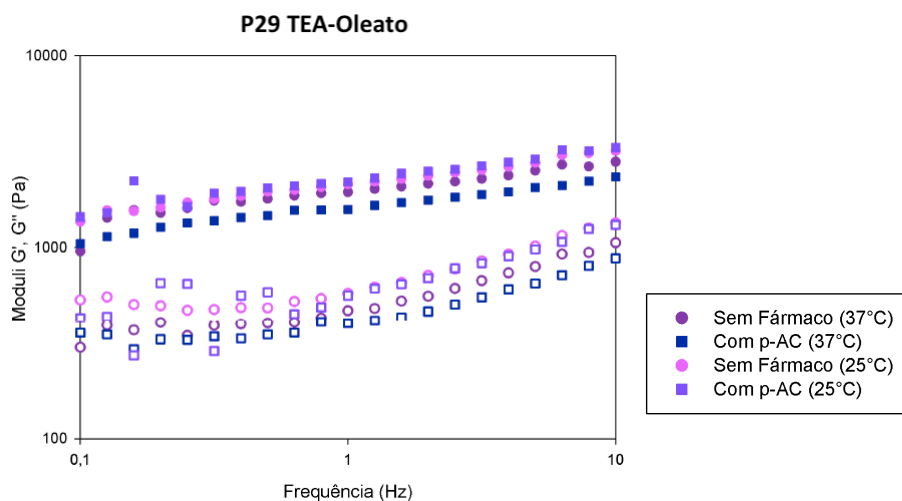


Fig. 24. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P29 TEA-Oleato.

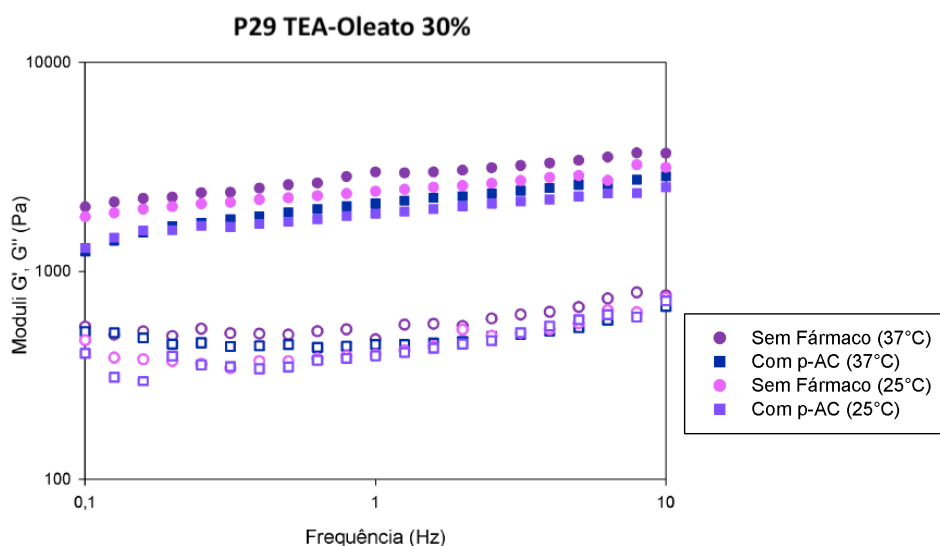


Fig. 25. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P29 TEA-Oleato com adição de 30% de MVA.

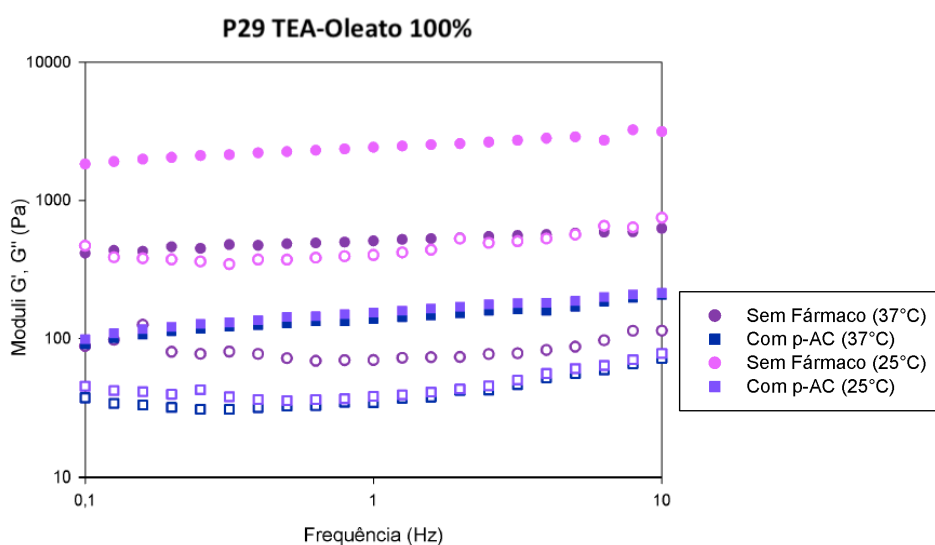


Fig. 26. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência da formulação P29 TEA-Oleato com adição de 100% de MVA.

De acordo com Saxena e colaboradores (2011), os parâmetros S e η são indicativos da densidade de reticulação no interior da amostra (Tabela 9). A relação entre esses dois parâmetros é inversamente proporcional, ou seja, sistemas mais estruturados, com maior densidade de reticulação apresentam um alto valor de S e baixo valor de η . Dessa forma, formulações com estruturas mais fracas possuem altos valores para o parâmetro η e baixos valores de S .

Tabela 9. Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (η) para as formulações analisadas.

Análise oscilatória - Sem fármaco				
Formulações	S (25°C)	η (25°C)	S (37°C)	η (37°C)
P24 TEA-Oleato	5726,283	0,113	3376,157	0,203
P24 TEA-Oleato 30%	2391,069	0,215	4370,378	0,113
P24 TEA-Oleato 100%	935,293	0,139	286,500	0,274
P29 TEA-Oleato	2136,292	0,171	1945,178	0,158
P29 TEA-Oleato 30%	2411,216	0,109	2813,168	0,123
P29 TEA-Oleato 100%	2411,216	0,109	508,289	0,080

Análise oscilatória - com p-AC				
Formulações	S (25°C)	η (25°C)	S (37°C)	η (37°C)
P24 TEA-Oleato	5751,835	0,106	4812,033	0,163
P24 TEA-Oleato 30%	5088,479	0,071	5534,839	0,124
P24 TEA-Oleato 100%	85,984	0,194	153,737	0,233
P29 TEA-Oleato	2267,117	0,16	1604,807	0,152
P29 TEA-Oleato 30%	1881,815	0,121	2053,157	0,145
P29 TEA-Oleato 100%	152,465	0,145	139,159	0,150

Analisando a Tabela 9, verifica-se que o sistema P24 TEA-Oleato (formulação que possui na sua composição uma maior quantidade de água e menor quantidade de TEA-Oleato) apresentou altos valores de S em ambas temperaturas, incorporado ou não com p -AC. Esse resultado sugere que talvez a proporção entre seus componentes interferiu positivamente na estruturação destes sistemas. Além disso, esses valores também coincidem com os dados obtidos na MLP, uma vez que mesofases hexagonais (P24 TEA-Oleato) apresentam maiores valores de G' que mesofases lamelares (P29 TEA-Oleato), devido à formação de uma rede estrutural elástica mais forte, alta estabilidade interna e alta densidade de pontos de conexão das micelas cilíndricas (CORDOBÉS *et al.*, 2005; BARUAH *et al.*, 2015; OYAFUSO *et al.*, 2017). Este fenômeno pode ser observado comparando a fluidez das fases lamelares com a alta rigidez das fases hexagonais. Também é possível verificar que a partir de todas as condições analisadas (aumento de temperatura, incorporação e não incorporação de p -AC), os sistemas com MVA foram aqueles que apresentaram maiores mudanças nos valores obtidos em cada parâmetro.

Em relação ao aumento de temperatura, apenas as formulações com 30% de MVA apresentaram um aumento na densidade de reticulação à $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$. A incorporação do ácido *p*-cumárico também interferiu na estruturação dos sistemas, principalmente naqueles com adição de MVA. Os sistemas P24 TEA-Oleato, P24 TEA-Oleato 30% e P29 TEA-Oleato apresentaram um aumento na reticulação dos sistemas, enquanto que as formulações com 100% de MVA e a P29 TEA-Oleato 30% sofreram uma diminuição nos seus valores de S e aumento nos valores η , característico de estruturas mais fracas.

A partir dos valores obtidos para as formulações sem fármaco, é possível verificar que o muco artificial pode desestruturar os sistemas dependendo da quantidade em contato com eles, visto que as formulações com 30% de MVA apresentaram o maior valor de S enquanto que aquelas com 100% apresentaram o menor valor. Este fenômeno pode ocorrer graças a diluição sofrida pela amostra, o que reduziria seu módulo de elasticidade e consequentemente, sua organização estrutural (CHANG *et al.*, 2002). A adição de mais água (na forma de muco) nas mesofases lamelares influencia na organização dos sistemas pois aumenta a distância entre as lamelas, provocando a formação de uma rede menos compactada e um distúrbio no arranjo das micelas, desestabilizando a estrutura dos CLs (ZHAO *et al.*, 2011; FONSECA -SANTOS *et al.*, 2017; ARAUJO *et al.*, 2020).

Os sistemas analisados possuem alta consistência e alta aderência a espátula (Figura 27), além de apresentarem elevada viscosidade aparente. Desse modo, a consistência percebida empiricamente também foi observada nas avaliações das propriedades viscoelásticas.

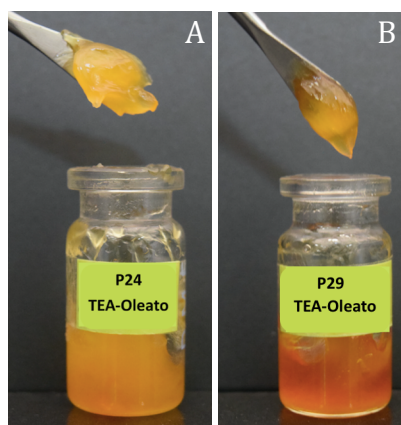


Fig. 27. Viscosidade aparente das formulações P24 TEA-Oleato (a) e P29 TEA-Oleato (b) sem fármaco.

5.6. Análise de perfil de textura (TPA)

No desenvolvimento de formulações para uso tópico, certas características são desejáveis, como a boa espalhabilidade do sistema, adesividade, resistência à fricção, capacidade de aumentar a liberação do fármaco e, quando necessário, a habilidade de facilitar a permeação do fármaco na área de aplicação (HURLEY *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, a análise de perfil de

textura (TPA) é amplamente utilizada para a caracterização de produtos em indústrias cosméticas e farmacêuticas. A partir do TPA, é possível analisar parâmetros como dureza, compressibilidade, coesão e adesividade (TAI; BIANCHINI; JACHOWICZ, 2014). Dureza e compressibilidade indicam a facilidade de aplicação e a espalhabilidade no sítio alvo, respectivamente. A adesividade é um parâmetro comparativo à capacidade da formulação de aderir no sítio de aplicação, pois consiste no trabalho (área negativa) realizado para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda, com a qual a amostra entra em contato. Finalmente, a coesão está relacionada à recuperação estrutural da formulação após sua aplicação no sítio de aplicação (JONES *et al.*, 2009). Essas características mecânicas fornecem informações sobre as interações entre os componentes do sistema, fator importante no desenvolvimento de formulações tópicas bioadesivas.

Na figura 28 estão reproduzidos os resultados obtidos da análise do perfil de textura das formulações incorporadas e não-incorporadas com *p*-AC. No gráficos apresentados, as barras de coloração cinza escura representam as formulações com ácido *p*-cumárico, enquanto que as cinzas claras, os sistemas sem fármaco.

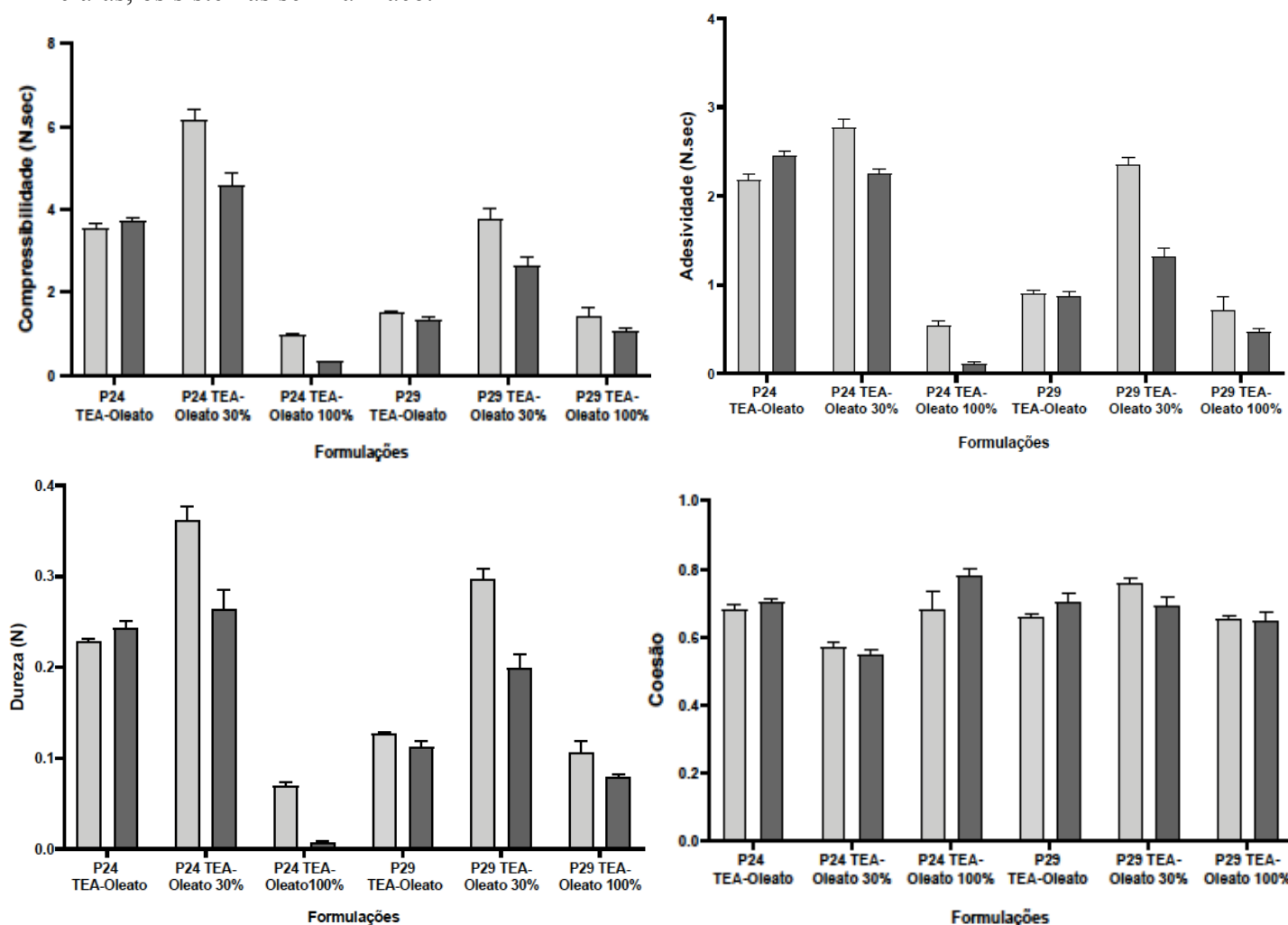


Fig. 28. Perfil de textura dos sistemas P24 e P29 TEA-Oleato. As barras de coloração cinza escura são referentes aos sistemas incorporados com *p*-AC, e as de coloração cinza clara são as formulações sem fármaco.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que, com exceção da P24 TEA-Oleato, em todas as outras formulações a adição do fármaco diminuiu a dureza, a adesividade e a compressibilidade do sistema, provavelmente devido à interferência do *p*-AC no empacotamento dos sistemas, ampliando a distância entre as estruturas líquido-cristalinas (ZHAO *et al.* 2011; FONSECA-SANTOS *et al.*, 2017). Entretanto, a redução nestes parâmetros demonstrou-se significativa apenas nas formulações que possuíam a adição de MVA ($p < 0,05$). As amostras com 30% de muco foram as que apresentaram maior diferença de valores, assim como também foram as que apresentaram maior organização do sistema nos ensaios reológicos oscilatórios. Este resultado sugere novamente que a diluição parcial do sistema provocada pela adição de apenas 30% de muco artificial interfere não apenas na sua estruturação e organização, mas também nas propriedades mecânicas das formulações, gerando um aumento da viscosidade que consequentemente também aumenta os valores de dureza e compressibilidade.

Assim como a adição de MVA na proporção 1:1 diminuiu o comportamento elástico dos sistemas e sua viscosidade, os CLs diluídos com 100% de muco artificial também apresentaram valores inferiores para as propriedades mecânicas avaliadas. Ademais, os resultados revelaram que todos os sistemas analisados foram bastante coesos, ou seja, apresentaram ligações fortes entre as moléculas com uma posterior recuperação estrutural das formulações após a deformação (JONES *et al.*, 2009). Ademais, não houve diferença significativa na coesão das formulações incorporadas com as não-incorporadas, com exceção de P24 TEA-Oleato 100% e P29 TEA-Oleato 30%.

5.7. Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

Para desenvolver sistemas líquido-cristalinos direcionados à aplicação tópica em mucosas, é necessária a realização de ensaios que possam avaliar se as propriedades mucoadesivas destes CLs são satisfatórias. A mucoadesão é a capacidade dos materiais de aderir às membranas mucosas do corpo humano e proporcionar uma retenção temporária (KHUTORYANSKIY, 2010). Sistemas mucoadesivos são vantajosos, pois são capazes de prolongar o tempo de permanência do fármaco no local da aplicação. Esse contato prolongado diminui a frequência de aplicação do produto e aumenta a biodisponibilidade do medicamento (FONSECA-SANTOS *et al.*, 2017; WOODLEY, 2001). Em sistemas líquido-cristalinos, excelentes propriedades mucoadesivas são encontradas em polímeros hidrofílicos que possuem grupos carregados e / ou grupos funcionais não iônicos, pois estes são capazes de formar pontes de hidrogênio com a superfície das mucosas. A performance mucoadesiva de formulações compostas por polímeros não iônicos pode ser alcançada predominantemente através da difusão de macromoléculas do sistema e formação de uma camada de interpenetração com o muco biológico (KHUTORYANSKIY, 2010).

O ensaio de mucoadesão *in vitro* consiste no destacamento da amostra da superfície mucoadesiva. A formulação é trazida em contato com o tecido mucoso e a força (ou o trabalho) necessária para quebrar a ligação adesiva entre os dois, é medida. Os dados apresentados na figura 28 sugerem que o *p*-AC agiu de maneira distinta na mucoadesividade das formulações.

Inesperadamente, o comportamento mucoadesivo não seguiu o comportamento reológico e ou de textura. Não houve relação entre a mesofase, adição de MVA ou incorporação de *p*-AC e a força de mucoadesão. Esse dados podem sugerir que a composição dos CLs apresentam maior influência na mucoadesividade dos sistemas do que a rede mesofásica ou a presença de MVA / *p*-AC.

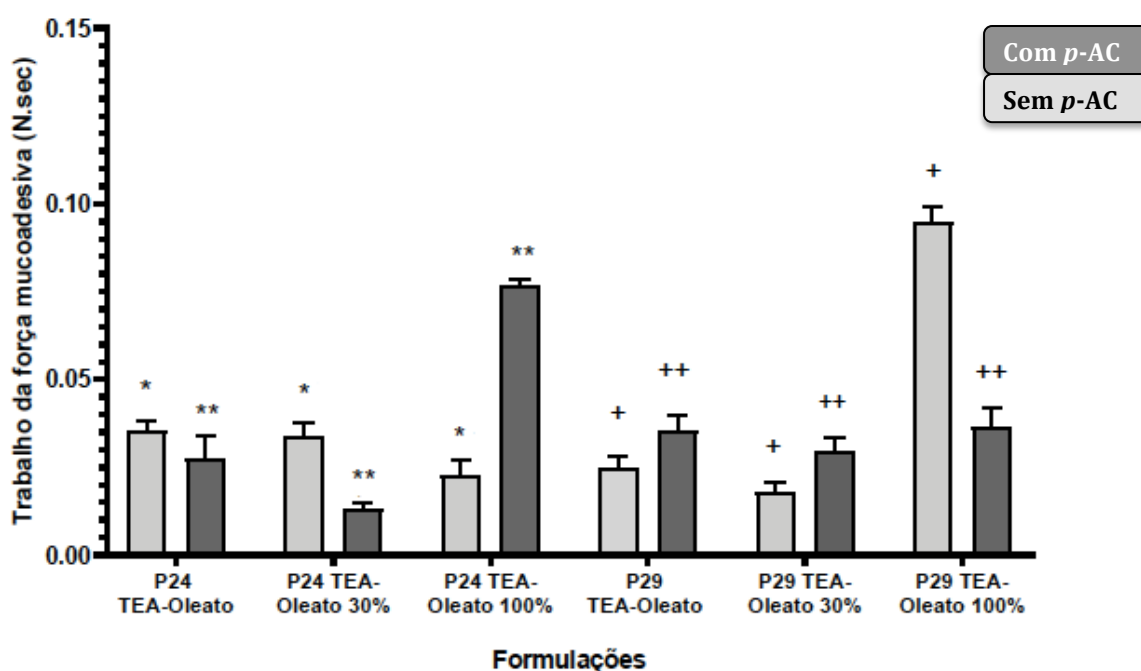


Fig. 29. Gráficos de barra para as medidas de trabalho da força mucoadesiva dos sistemas incorporados ou não com *p*-AC, na temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Análise Two-way ANOVA e pós teste Tukey com $\alpha = 0,05$, sendo * $p < 0,05$ para os sistemas P24 e + $p < 0,05$ para os sistemas P29. Análise estatística entre resultados do mesmo sistema com e sem *p*-AC. Símbolos iguais indicam valores médios sem diferenças estatisticamente significativas.

Enquanto que os sistemas P24 TEA-Oleato e P24 TEA-Oleato 30% apresentaram um maior propriedade mucoadesiva sem a presença do fármaco, o P24 TEA-Oleato 100% demonstrou um comportamento totalmente oposto. O mesmo ocorreu em relação ao P29 e suas diluições. Neste caso, os sistemas P29 TEA-Oleato e P29 TEA-Oleato 30% apresentaram maior trabalho para destacar da mucosa quando o *p*-AC estava incorporado nas formulações, diferentemente do resultado obtido com o P29 TEA-Oleato 100%. Conforme relatado anteriormente, tanto a incorporação de *p*-AC quanto a adição de muco diminuíram levemente as propriedades mecânicas, bem como alteraram a organização estrutural e o arranjo molecular das mesofases. Apesar disso, os maiores valores de força de mucoadesão foram obtidos nos sistemas diluídos com 100% de MVA. Esses dados vão em direção

oposta a muitos estudos encontrados na literatura, que relatam que sistemas mais rígidos e viscosos também são mais mucoadesivos (NARAYANA *et al.*, 2009; RUELA *et al.*, 2016; VICTORELLI *et al.*, 2018; RENÇBER *et al.*, 2019; ARAUJO *et al.*, 2020).

Os dados obtidos sugerem que as interações entre as cadeias poliméricas e as glicoproteínas da mucina podem influenciar positivamente a mucoadesividade do sistema quando em contato com a mucosa vaginal (ARAUJO *et al.*, 2020).

Há na literatura a descrição de géis e sistemas nanoestruturados compostos por dispersões de poloxamer que apresentaram maior bioadesividade/mucoadesividade conforme a concentração de água nos sistemas aumentava (BERNEGOSSE, 2014; CHANG *et al.*, 2002). Esse fenômeno talvez explique o motivo das formulações com 100% MVA terem apresentado os valores mais altos de força mucoadesiva.

5.8. Desenvolvimento do método analítico por CLAE para determinação do ácido *p*-cumárico

Um método analítico foi desenvolvido para análise quantitativa do ácido *p*-cumárico, o qual apresentou boa resolução a partir de um método isocrático. Foram desenvolvidas duas curvas analítica do *p*-AC:

- I. Em uma solução receptora, a fim de analisar os resultados provenientes dos ensaios de liberação e permeação do *p*-AC incorporado nas formulações;
- II. Em metanol, a fim de analisar os resultados provenientes do ensaio de retenção, além de ser o solvente orgânico escolhido para diluição do fármaco.

5.8.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do *p*-AC no espectro ultravioleta-visível (UV-Vis)

De acordo com a literatura, para quantificação do ácido *p*-cumárico por cromatografia, as amostras são frequentemente monitoradas em uma faixa espectral de 200-400nm, sendo 280nm, 310nm e 320nm os valores mais utilizados (FERREIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, antes do desenvolvimento do método analítico, foram realizadas duas varreduras (de 250-350nm) para determinar qual o comprimento de onda mais adequado, uma em metanol, pois é o solvente orgânico utilizado para diluição do fármaco, e outra na fase móvel.

A varredura traçada em vermelho mostra o espectro de absorção do *p*-AC em metanol, onde nota-se um pico ligeiramente maior a 290nm. Já a varredura traçada em verde, referente à fase móvel, apresentou uma absorbância diferente para o fármaco, próximo a 320nm.

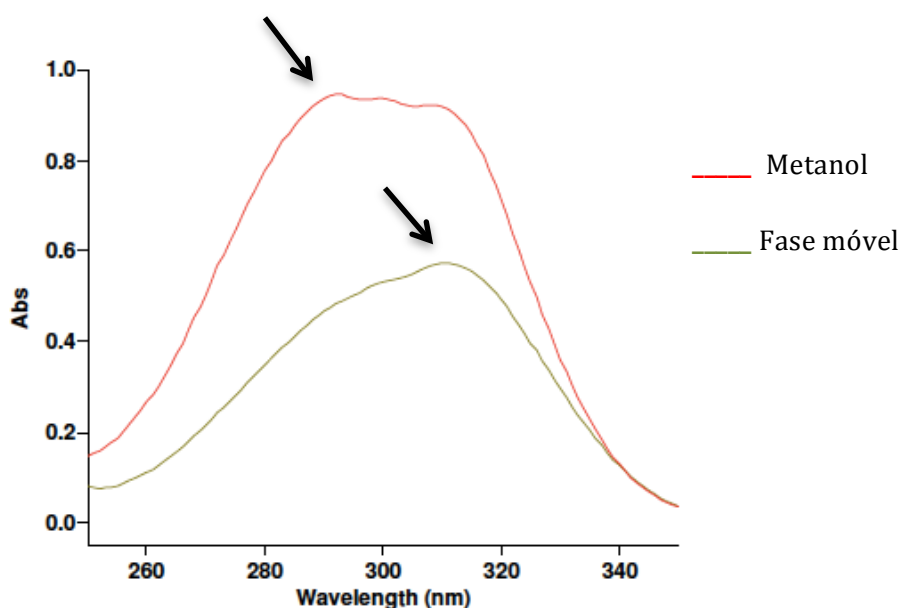


Fig. 30. Varredura de espectro de *p*-AC quando diluído em metanol e na fase móvel.

Devido aos valores distintos obtidos na varredura de espectro do *p*-AC, o comprimento de 310nm foi escolhido para ser utilizado na detecção do fármaco no método analítico, visto que ao desenvolver a curva analítica de solução receptora, o *p*-AC não estará diluído em metanol, estará em contato com a fase móvel durante a validação de todos os parâmetros da metodologia analítica.

5.8.2. Adequabilidade

Para um método analítico ser considerável adequado, alguns parâmetros precisam ser analisados, a fim de se garantir a eficiência da coluna, a capacidade de distribuição dos solutos na fase móvel e a boa resolução da amostra analisada. A partir da injeção de 6 replicatas na concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *p*-AC em metanol e meio receptor, a adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada por meio dos cálculos da média e desvio padrão relativo (DPR%) dos seguintes parâmetros: tempo de retenção (*k*), área do pico de *p*-AC, fator de retenção, fator de cauda e número de pratos da coluna (*N*). Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Parâmetros analisados para avaliar a adequabilidade do sistema cromatográfico na análise de *p*-AC em metanol.

Injeções	Área	Fator de cauda (T)	Tempo de retenção (Rt)	Número de pratos (N)	Fator de retenção (k)
1	774,70	1,43	8,38	3263	2,25
2	778,90	1,42	8,37	3245	2,24
3	765,70	1,33	8,37	3028	2,24
4	767,30	1,41	8,38	3295	2,25
5	761,40	1,4	8,37	3240	2,24
6	770,20	1,39	8,37	3163	2,24

Média	769,70	1,40	8,37	3205,66	2,25
DP	7,07	0,03	0,005	97,34	0,002
DPR %	0,92	2,54	0,062	3,04	0,09

Tabela 11. Parâmetros analisados para avaliar a adequabilidade do sistema cromatográfico na análise de *p*-AC em meio receptor.

Injeções	Área	Fator de cauda (T)	Tempo de retenção (Rt)	Número de pratos (N)	Fator de retenção (k)
1	1484,90	1,54	8,25	5897	3,28
2	1490,90	1,53	8,24	5814	3,32
3	1482,80	1,53	8,25	5750	3,33
4	1481,40	1,52	8,25	5797	3,33
5	1485,70	1,53	8,25	5828	3,34
6	14870	1,52	8,25	5826	3,34
Média	1485,45	1,53	8,25	5818,67	3,32
DP	3,34	0,008	0,004	47,92	0,02
DPR %	0,22	0,5	0,05	0,82	0,66

A partir dos resultados é possível verificar que o método analítico desenvolvido e o sistema cromatográfico utilizado são adequados, o que garante a confiabilidade dos resultados. Isso pode ser afirmado devido os valores obtidos nas análises, os quais estão todos dentro do requerido: o fator de cauda está abaixo de 2, o número de pratos teóricos superou 2000 e o fator e retenção é maior do que 2 (ICH, 2005 e FDA, 1994).

5.8.3. Linearidade

As curvas analíticas em metanol e meio receptor foram realizadas nas concentrações de 0,5 a 70µg de *p*-AC /mL. Nos cromatogramas obtidos (Figura 31) é possível verificar que os picos apresentaram tempo de retenção de 8,3min, sem interferências. O metanol não apresentou nenhum pico, enquanto que a solução receptora está representada no cromatogramas com um tempo de retenção de 2 - 2,3min.

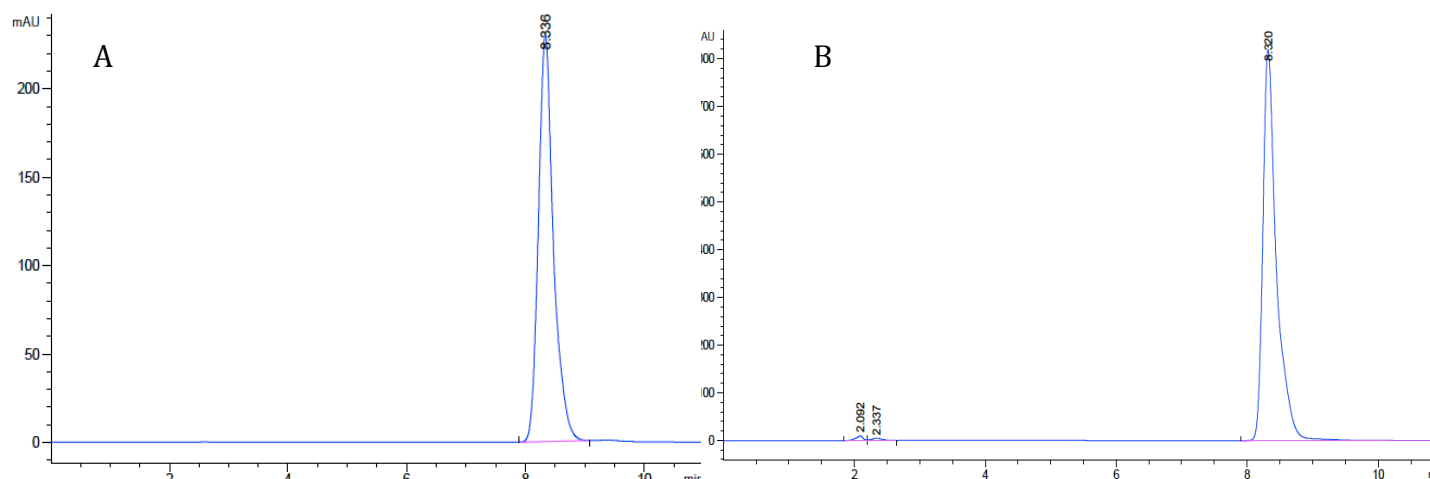


Fig. 31. Cromatogramas do ácido *p*-cumárico na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtidos pelo método proposto em metanol (A) e em meio receptor (B).

As curvas de calibração para o ácido *p*-cumárico provaram ser lineares ao longo do intervalo proposto ($0,5\text{-}70\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o composto estudado, como mostrado pelos coeficientes de regressão linear (r^2) de 0.99985 em metanol e 0.99993 em meio receptor, conforme representado nas figuras 32 e 33.

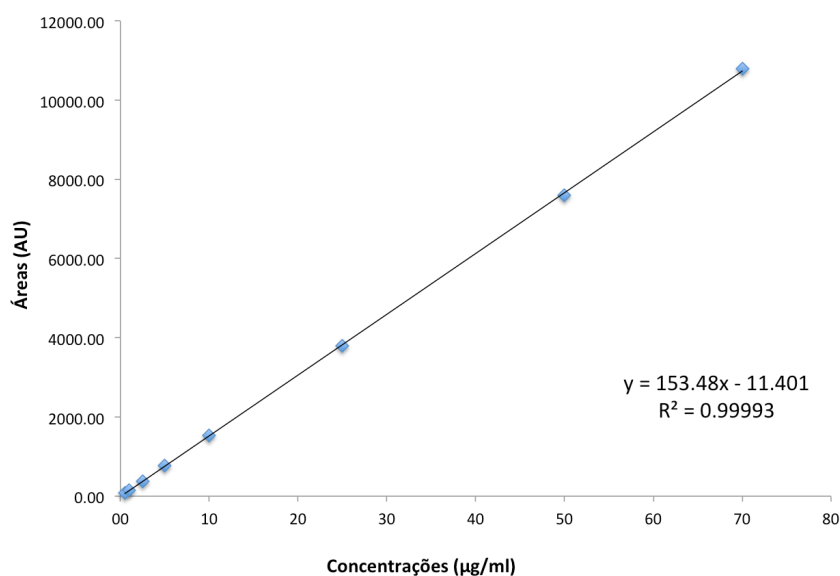


Fig. 32. Curvas padrão de ácido *p*-cumárico em meio receptor com intervalo de concentração de $0,5 - 7,0\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida por CLAE.

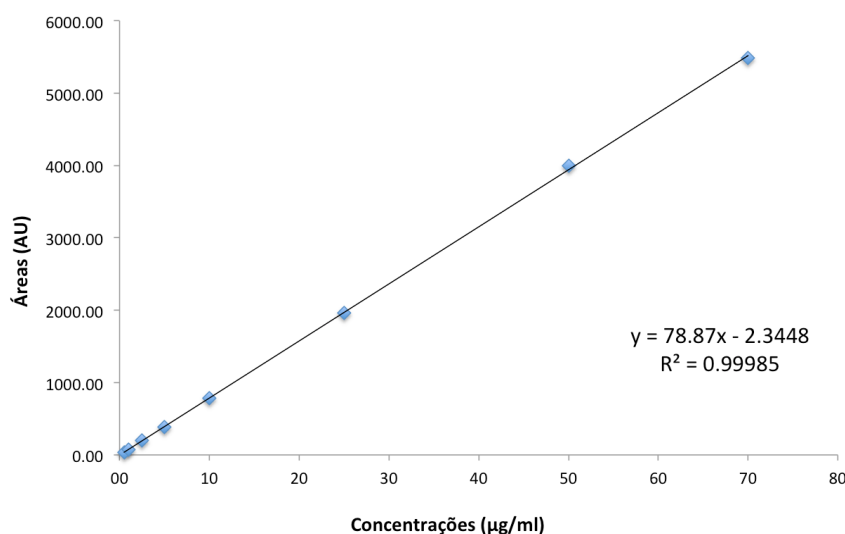


Fig. 33. Curvas padrão de ácido *p*-cumárico em metanol com intervalo de concentração de 0,5-7,0 µg.mL⁻¹ obtida por CLAE.

Através da análise estatística da regressão linear pôde-se testar a validação do método e a significância estatística da curva ajustada (Tabela 12). A análise de variância ANOVA comprovou que a regressão linear é significativa em ambas as curvas construídas, visto que apresentaram o valor do *F* de significação inferior ao valor *F* do nível de significância. Considerando-se que a análise foi realizada para um nível de significância 5%, as regressões encontradas são significativas e podem ser aceitas.

Tabela 12. Resultado do tratamento estatístico por ANOVA fator único para a regressão linear das curvas construídas.

(Em metanol)	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F</i> de significação
Regressão	1	89490132,98	89490132,98	27192,85242	1,62084 ⁻³⁵
Resíduo	22	72400,75058	3290,943208		
Total	23	89562533,73			

(Em meio receptor)	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F</i> de significação
Regressão	1	14384,98257	14384,98257	08556,5408	3,02 ⁻⁴⁵
Resíduo	22	1,517428393	0,068974018		
Total	23	14386,5			

5.8.4. Especificidade e Seletividade

As especificidade e seletividade do método foram avaliadas através da injeção de todo componente que durante os ensaios analisados por CLAE (liberação, permeação e retenção) esteve em contato com o fármaco, além de 5 µg mL⁻¹ de *p*-AC, para fins de comparação. Dessa forma foram avaliados:

- As formulações estudadas não contendo o fármaco;
- Os componentes da fase móvel (metanol e solução de ácido fórmico 1%);

- iii. O metanol e a solução receptora, por serem os solventes utilizados para diluição do fármaco;
- iv. Muco vaginal artificial, utilizado nas formulações;
- v. Solução metabólica da mucosa vaginal triturada, para avaliar se as substancias biológicas que compõem a mucosa influenciariam nas análises.

A figura 34 representa uma sobreposição de todos os cromatogramas obtidos da seletividade, onde pode-se observar que nenhum dos componentes interferiram na análise do *p*-AC, uma vez que não apresentaram picos cromatográficos coincidentes com o tempo de retenção específico do mesmo.

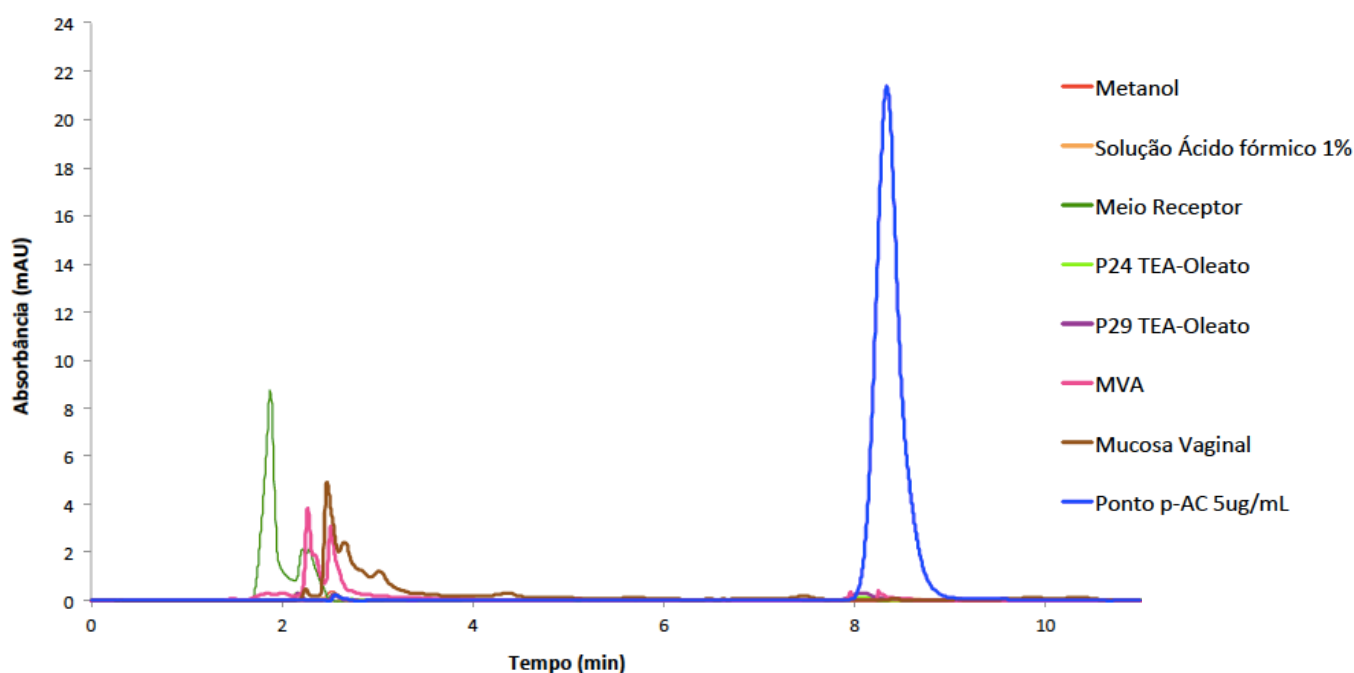


Fig. 34. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da análise de seletividade dos métodos analíticos desenvolvidos para o ácido *p*-cumárico.

5.8.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um mesmo ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). A RDC nº166 de 2017 admite variações na faixa de trabalho entre 80-120%, porém valores próximos a 100% são desejáveis (BRASIL, 2017). Conforme representado nas Tabelas 13-16 os valores obtidos encontram-se dentro dos limites preconizados, indicando que o método utilizado é exato.

Tabela 13. Exatidão do método analítico para análise de *p*-AC no sistema P24 TEA-Oleato diluído em metanol.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
2,5	2,46	98,7
25	25,24	100,9
50	51,72	103,4

Tabela 14. Exatidão do método analítico para análise de *p*-AC no sistema P29 TEA-Oleato diluído em metanol.

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração média experimental (µg.mL ⁻¹)	Exatidão (%)
2,5	2,40	96,04
25	24,79	99,16
50	52,68	105,36

Tabela 15. Exatidão do método analítico para análise de *p*-AC no sistema P24 TEA-Oleato diluído em solução receptora.

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração média experimental (µg.mL ⁻¹)	Exatidão (%)
2,5	2,56	102,52
25	26,36	105,44
50	51,11	102,22

Tabela 16. Exatidão do método analítico para análise de *p*-AC no sistema P24 TEA-Oleato diluído em solução receptora.

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração média experimental (µg.mL ⁻¹)	Exatidão (%)
2,5	2,63	105,58
25	23,59	94,38
50	47,64	95,28

5.8.6. Precisão

Para garantir a confiabilidade das análises do fármaco, o método deve ser preciso, ou seja, os resultados de uma série de leituras de uma mesma amostra devem ser próximos um dos outros (BRASIL, 2017). Diferentemente da exatidão, a precisão foi realizada com o *p*-AC diluído apenas em metanol. Os resultados apresentados nas Tabelas 17 e 18 indicam que o método é preciso, pois o valor de DPR% para todas as determinações nos ensaios de precisão intra-corrida e inter-corrida foi inferior à 5%, como preconizado pela legislação vigente. Desta maneira, pode-se atribuir ao método analítico alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo (BRASIL, 2016).

Tabela 17. Resultados da avaliação da precisão intra-dia ou reprodutibilidade.

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Média	Precisão (DPR): (SD/Média) *100
2,5	197,30	0,75
25,0	1964,53	4,02
50,0	3995,47	1,42

Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Média	Precisão (DPR): (SD/Média) *100
2,5	197,13	0,46
25,0	1937,27	1,00
50,0	3869,33	0,86

Tabela 18. Resultados da avaliação da precisão inter-dia ou intermediária.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Dia 1	Dia 2	Média	Precisão (DPR): (SD/Média) *100
2,5	197,30	197,13	197,22	0,06
25	1964,53	937,27	1950,90	0,99
50	3995,47	3869,33	3932,40	2,27

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Analista 1	Analista 2	Média	Precisão (DPR): (SD/Média) *100
2,5	187,87	186,00	186,93	0,71
25	1906,73	1920,50	1913,62	0,51
50	3977,23	3919,23	3948,23	1,04

5.8.7. Robustez

Os resultados obtidos para robustez, conforme mostram as Tabelas 19 e 20 revelaram que o método analítico proposto mostrou-se robusto frente à pequenas alterações na vazão (mL/min), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e comprimento de onda para detecção no UV (nm), tanto para a curva em metanol quanto para a curva em meio receptor, uma vez que em todas as condições testadas o método manteve-se preciso e exato.

Tabela 19. Robustez do método analítico de *p*-AC em metanol.

Condições cromatográficas	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vazão (mL/min)			
1,00	9,91	2,10	99,15
0,950	10,01	3,13	100,12
1,50	9,50	3,27	95,86
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			
35 $^{\circ}\text{C}$	9,91	2,10	99,15
32 $^{\circ}\text{C}$	9,89	1,37	98,97
37 $^{\circ}\text{C}$	9,95	1,86	99,57
Deteção no UV			
310nm	9,91	2,10	99,15
300nm	9,46	3,47	94,66
320nm	8,36	2,28	83,68

Tabela 20. Robustez do método analítico de *p*-AC em meio receptor.

Condições cromatográficas	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Vazão (mL/min)			
1,00	10,00	0,88	100,05
0,950	10,16	0,04	101,61

1,50	9,62	0,10	96,23
Temperatura (°C)			
35°C	10,00	0,88	100,05
32°C	10,09	0,06	100,96
37°C	10,10	0,06	101,08
Deteção no UV			
310nm	10,00	0,88	100,05
300nm	9,54	0,42	95,49
320nm	8,38	0,08	83,88

5.8.8. Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) indicam a sensibilidade do método analítico. Os valores de LD e de LQ foram calculados a partir das equações descritas nos item 4.4.5.7. e estão representados na Tabela 21. Os valores obtidos demonstram a alta sensibilidade e capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações de *p*-AC.

Tabela 21. Representação dos valores obtidos para LD e LQ.

Limites analisados	Curva em metanol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Curva em meio receptor ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
LD	0,1132	0,1101
LQ	0,3772	0,3670

5.8.9. Determinação do teor (%) de fármaco nos cristais líquidos

A partir do doseamento foi possível verificar se o valor teoricamente incorporado nas formulações correspondia ao valor real. A partir dos resultados obtidos e dos cálculos de precisão e exatidão (Tabelas 22 e 23), observou-se que os sistemas (P24 TEA-Oleato e P29 TEA-Oleato) não incorporam 100% do fármaco; dessa maneira, o valor considerado nos cálculos para os ensaios de liberação e permeação devem estar de acordo com a proporção verificada por CLAE.

Tabela 22. Teor de *p*-AC (%) obtido nos cristais líquidos da formulação 24 TEA-Oleato.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
50,0	40,68	0,40	81,37

Tabela 23. Teor de *p*-AC (%) obtido nos cristais líquidos da formulação 29 TEA-Oleato.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
50,0	42,32	0,94	84,64

5.9. Perfil de liberação in vitro do ácido *p*-cumárico

Com o estudo do perfil de liberação do ácido *p*-cumárico a partir dos sistemas líquido cristalinos, foi possível verificar a quantidade de fármaco liberada em função do tempo, bem como o mecanismo envolvido nesse processo. A figura 35 demonstra o perfil de liberação do *p*-AC em solução receptora (fármaco livre) e incorporado nas diferentes formulações, respectivamente. Verifica-se que as formulações conseguiram controlar a liberação do *p*-AC, visto que a concentração liberada aumentou gradativamente com o passar das horas, diferentemente do que foi observado para o fármaco livre. Na tabela 24 estão apresentadas as porcentagens de fármaco liberadas a partir de cada sistema, onde é possível constatar que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as formulações com e sem muco artificial. Desta forma, sugere-se que a possível mudança estrutural sofrida pelos CLs quando em contato com o ambiente vaginal não alteraria a liberação controlada destes sistemas.

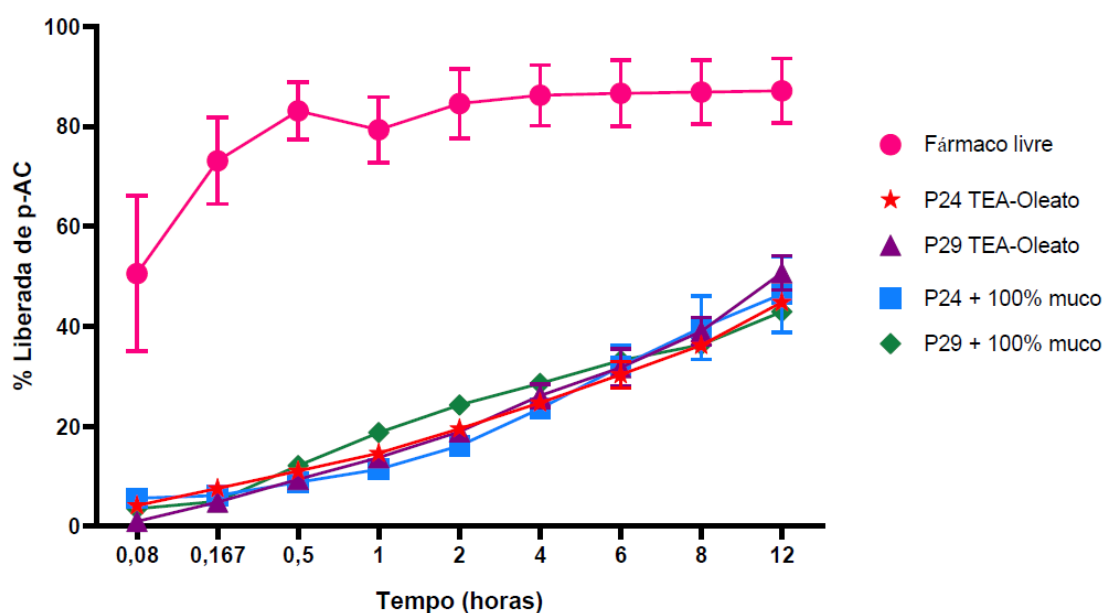


Fig. 35. Perfil de liberação do *p*-AC (%) dos diferentes sistemas avaliados durante um ensaio de 12h.

Tabela 24. Percentual de *p*-AC liberado a partir das formulações após 12 horas de ensaio.

Formulações	% Liberada do <i>p</i> -AC em 12 horas
Fármaco livre	87,13 ± 6,49 ^a
P24 TEA-Oleato	44,83 ± 1,09 ^b
P24 + 100% muco	46,45 ± 7,58 ^b
P29 TEA-Oleato	50,70 ± 3,43 ^b
P29 + 100% muco	42,94 ± 1,89 ^b

Obs: Símbolos iguais indicam valores médios sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A liberação proporcionada pelo sistema P29 TEA-Oleato foi ligeiramente maior que aquela proporcionada pelo P24 TEA-Oleato, possivelmente porque a similaridade da estrutura lamelar líquido-cristalina com a membrana das células leva à uma maior interação sistema-mucosa, promo-

vendo assim a liberação no tecido alvo. Essa capacidade de estruturas lamelares auxiliarem na liberação controlada de um fármaco já foi observada na literatura por outros autores. De Araújo *et al.* (2019) avaliaram o perfil de liberação de sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar incorporados com hipericina. De maneira semelhante aos sistemas P24 e P29, os CLs foram constituídos por uma dispersão de poloxamer 16% em sua fase aquosa e ácido oleico + colesterol na fase oleosa. Ao fim do ensaio de liberação, os resultados obtidos mostraram que os sistemas incorporados apresentaram perfis de liberação controlados e sustentados, quando comparados à hipericina na sua forma livre. Segundo os autores, esse comportamento pode ter sido influenciado pela alta atração do fármaco pelo colesterol, causando um atraso significativo na liberação do mesmo. Barradas e colaboradores (2013), ao desenvolverem quatro sistemas micelares com diferentes concentrações de poloxamer, água e N,N-dimetil-meta-toluamida (DEET), observaram que aqueles com alta presença de cruze de malta apresentaram liberação mais lenta e sustentada por um período de 7 horas. Uma possível explicação seria que a estrutura lamelar observada nas amostras pode ter representado uma barreira à difusão, exercendo um efeito de reservatório, controlando efetivamente a liberação do fármaco.

Diferentes modelos matemáticos foram utilizados para analisar e descrever a cinética de liberação do fármaco a partir da matriz em que ele está incorporado, dentre eles: Baker & Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixon & Crowell, Higuchi, Primeira Ordem e Weibull (Tabela 25). Os modelos que apresentaram valores de R^2 mais próximos de 1,00 foram considerados como mais adequados para descrever a cinética de liberação dos componentes avaliados.

Tabela 25. Valores de R^2 referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação *in vitro* do *p*-AC a partir das formulações selecionadas

Modelos matemáticos	Valores de R quadrado (R^2)				
	<i>p</i> -AC Livre	P24 TEA-Oleato	P24 + 100% muco	P29 TEA-Oleato	P29 + 100% muco
Baker & Lonsdale	0,0000	0,9909	0,9744	0,9795	0,9657
Korsmeyer-Peppas	0,6773	0,9937 k= 14,1198 n= 0,4522	0,9876	0,9940 k= 12,3815 n= 0,5573	0,9802
Hixon & Crowell	0,0000	0,7515	0,8860	0,8989	0,5759
Higuchi	0,0000	0,9886	0,9836	0,9891	0,9464
Primeira Ordem	0,0000	0,7833	0,9071	0,9180	0,6263
Weibull	0,9822 k= 88,4780 b=0,1764	0,9936	0,9977 k= 53,3713 b= 1,3965	0,9915	0,9926 k= 68,9042 b= 0,4634

Enquanto que o *p*-AC em solução e as formulações com muco apresentaram perfil de liberação que segue o modelo matemático de Weibull, o perfil de liberação dos sistemas P24 e P29 correlacionaram com o modelo de Korsmeyer-Peppas.

O modelo de Korsmeyer-Peppas estuda a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos, quando o mecanismo de liberação não é conhecido ou quando mais de um tipo de fenômeno de liberação de fármaco está envolvido, por exemplo: uma combinação da difusão do fármaco e um transporte controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas da matriz (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Ao avaliar o perfil de liberação por esse modelo, obtêm-se dois parâmetros (*k* e *n*), os quais dão informações sobre como o fármaco é liberado da matriz polimérica. Dependendo do valor de *n* obtido, é possível estabelecer uma classificação de acordo com o tipo de comportamento observado no perfil de liberação de um agente ativo em um sistema matricial (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Dessa maneira, são denominados:

- I. Modelo de difusão Fickiana, quando o valor de *n* é igual à 0,45 ou 0,5;
- II. Modelo não-Fickiano de transporte anômalo, quando o valor de *n* é $0,5 < n < 1,0$;
- III. Modelo não-Fickiano Caso II, quando $n=1$;
- IV. Modelo não-Fickiano Super caso II, quando $n > 1$

A partir dos parâmetros obtidos nos perfis de liberação, o valor de $n = 0,45$ referente à formulação P24 TEA-Oleato sugere que a liberação ocorre por difusão fickiana, enquanto que o valor de *n* para o sistema P29 TEA-Oleato está entre 0,5 e 1, caracterizando um perfil de transporte anômalo.

A difusão Fickiana é caracterizada pela alta velocidade de difusão do solvente para o interior da matriz e baixa velocidade de relaxamento polimérico. Este comportamento induz a formação de um gradiente de penetração do solvente. A concentração de solvente diminui exponencialmente da região totalmente intumescida do sistema polimérico para o centro da matriz. Já no modelo de transporte anômalo, há uma combinação do mecanismo de difusão com o do Caso II (fenômeno de intumescimento do polímero, com relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão), pois a velocidade de difusão do solvente e o relaxamento polimérico possuem magnitudes similares (RATHBONE *et al.*, 2008; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

O modelo de Weibull pode ser utilizado com sucesso em praticamente todos os tipos de curva de liberação, porém é considerado mais útil para comparar os perfis de liberação de fármacos incorporados à sistemas matriciais (RATHBONE *et al.*, 2008; LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Embora este modelo seja frequentemente aplicado à análise de estudos de dissolução e liberação, seu uso empírico tem sido criticado, pois não há uma base cinética para seu uso e nem uma natureza física que explique seus parâmetros (RATHBONE *et al.*, 2008). Entretanto, Papadopoulou e

colaboradores (2006) observaram uma correlação matemática entre o parâmetro b de Weibull e o expoente n da equação de Peppas e concluíram que o parâmetro de forma b também está relacionado ao mecanismo de transporte do fármaco e às propriedades físicas da matriz de liberação. Assim, estimaram que $b \leq 0,75$ indica difusão Fickiana, b na faixa de $0,75 < b < 1$ está relacionado com um mecanismo combinado (difusão Fickiana e transporte Case II) e $b > 1$ determina que o transporte do fármaco na matriz segue um mecanismo complexo de liberação.

A partir destas informações, pode-se verificar que o valor de b para o fármaco livre e a formulação P29 + 100% muco sugere um perfil de difusão Fickiana, enquanto que o b obtido para o sistema P24 + 100% muco sugere que o transporte do fármaco ocorreu por um mecanismo complexo que pode envolver simultaneamente o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão do polímero.

Há na literatura estudos referentes ao perfil de liberação do *p*-AC presente em extratos vegetais. Žilius, Ramanauskienė e Briedis (2013) desenvolveram 3 sistemas semissólidos de aplicação tópica (pomada, emulsão A/O e gel hidrofílico) para incorporação de própolis, e assim determinar o perfil de liberação de cinco compostos fenólicos presentes no extrato: Ácido vanílico, ácido cafeico, vanilina, ácido cumárico e ácido ferúlico. A partir dos resultados obtidos, observou-se que após 8h de ensaio o gel liberou quase toda a quantidade de compostos fenólicos, enquanto que apenas 5% e 22% das substâncias foram liberadas da pomada e da emulsão, respectivamente. Segundo os autores, a alta taxa de liberação dos ácidos fenólicos e vanilina a partir do gel hidrofílico pode ser atribuída a uma possível dissolução do mesmo após a penetração do meio receptor. Além disso, os perfis de liberação observados podem estar relacionados à lipofilicidade de cada substância testada, como também do veículo semissólido. Como os ácidos fenólicos são compostos parcialmente lipofílicos por natureza, quando incorporados no gel hidrofílico, sua pouca afinidade com o veículo aceleraria a liberação dos mesmos. Este cenário também pode ser verificado nos outros sistemas tópicos, visto que a emulsão liberou os compostos fenólicos mais intensamente, especialmente os mais hidrofílicos, quando comparada à pomada (a qual possui um maior teor de substâncias lipofílicas). As pomadas, por sua vez, restringiram a liberação de mais compostos lipofílicos no meio receptor.

Situação semelhante foi verificada por Marquele *et al.* (2006) ao incorporar *p*-AC em emulsões de baixo e alto teor lipofílico. Após 6h de ensaio, a formulação com menor teor de lipofilicidade apresentou uma taxa de liberação maior, demonstrando que formulações tópicas hidrofílicas talvez funcionem melhor na entrega de compostos fenólicos.

Ao analisar os resultados obtidos com o *p*-AC nos sistemas P24 e P29, é possível relacioná-los com os estudos supracitados e sugerir que o P29 TEA-Oleato, por possuir uma maior quantidade de tensoativo em sua constituição, auxiliou mais na liberação do fármaco do que o P24. Provavelmente, isso ocorreu devido à característica anfifílica do TEA-Oleato, que juntamente com o caráter

hidrofílico da fase aquosa, intensificaram a liberação do ácido *p*-cumárico graças à essa diferença de afinidade fármaco-veículo.

5.10. Avaliação da permeação e retenção *in vitro* do ácido *p*-cumárico

No ensaio de permeação emprega-se a mucosa vaginal suína com o intuito de analisar a permeabilidade de fármacos na vagina humana, visto que ambas apresentam similaridades na morfologia, pH, secreções e resposta do sistema imune (LORENZEN, 2015). Alguns fatores que podem afetar a passagem do fármaco para as células vaginais são a lipofilicidade, peso molecular, grau de ionização da molécula e a quantidade e composição do fluido vaginal (MACHADO, 2015).

A figura 36 apresenta o percentual permeado do *p*-AC de acordo com as matrizes analisadas, na qual observa-se que em todos os casos a permeação do fármaco ocorreu a partir de 2h do ensaio e aumentou gradativamente até completar as 12h. Novamente verifica-se um valor discrepante obtido entre o fármaco livre e as formulações, o que sugere que os sistemas líquido cristalinos não só controlaram a liberação do ácido *p*-cumárico, como também auxiliaram na diminuição da permeabilidade do mesmo. Ao submeter os dados obtidos à análise estatística Two-way ANOVA, constatou-se que durante às 2h primeiras horas do ensaio, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as formulações de CLs e o *p*-AC na forma livre, porém, a partir das 4h, houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o fármaco livre e todos os sistemas analisados (Tabela 26).

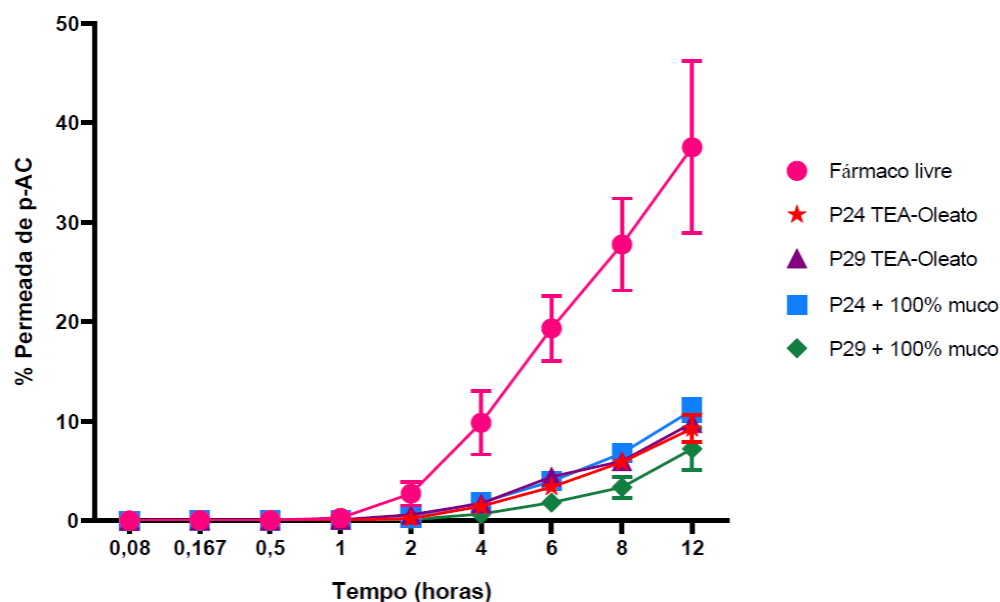


Fig. 36. Perfil de permeação ex-vivo (%) do *p*-AC, em mucosa vaginal suína, quando incorporado em diferentes matrizes, durante um ensaio de 12h.

Tabela 26. Percentual de *p*-AC permeado a partir das formulações após 12 horas de ensaio.

Formulações	% Permeada do <i>p</i> -AC em 12 horas
Fármaco livre	37,54 ± 8,66 ^a
P24 TEA-Oleato	9,27 ± 1,34 ^b
P24 + 100% muco	11,12 ± 1,12 ^b
P29 TEA-Oleato	9,82 ± 0,09 ^b
P29 + 100% muco	7,22 ± 2,10 ^b

Obs: Símbolos iguais indicam valores médios sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Assim como no ensaio de liberação, os resultados obtidos da permeação não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as formulações com e sem muco artificial. Entretanto, é relevante notar que a adição de 100% do fluido vaginal no sistema P24 TEA-Oleato, além de aumentar a porcentagem de fármaco liberada, consequentemente também aumentou a taxa de fármaco permeada. Entretanto, na formulação P29 TEA-Oleato, a adição de muco diminuiu a liberação e a permeação do *p*-AC. Isso sugere que o aumento do tensoativo e diminuição da fase aquosa, além de influenciar nas propriedades reológicas e mecânicas das formulações, também alterou a ação dos sistemas na liberação controlada do ácido *p*-cumárico.

Em relação à retenção do *p*-AC na mucosa suína, verificou-se que o composto não apenas permeou na membrana biológica, mas também ficou retido na mesma (Figura 37). De maneira correspondente aos dados previamente apresentados, a retenção do composto fenólico na mucosa suína foi maior para os sistemas P24 (entre 2 - 2,5%) do que para os sistemas P29 (entre 0,70 – 1,8%). Já o fármaco livre apresentou uma retenção de 4,9%. A retenção do fármaco pode contribuir para uma maior ação local no tratamento da candidíase vulvovaginal e minimização de eventuais efeitos adversos sistêmicos. Tanto as formulações P24 quanto P29 adicionados de 100% não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) quanto à proporção retida de *p*-AC, contudo ao comparar as formulações, o sistema P29 TEA-Oleato sem muco demonstrou uma diminuição significativa ao percentual retido, quando comparado ao P24 TEA-Oleato.

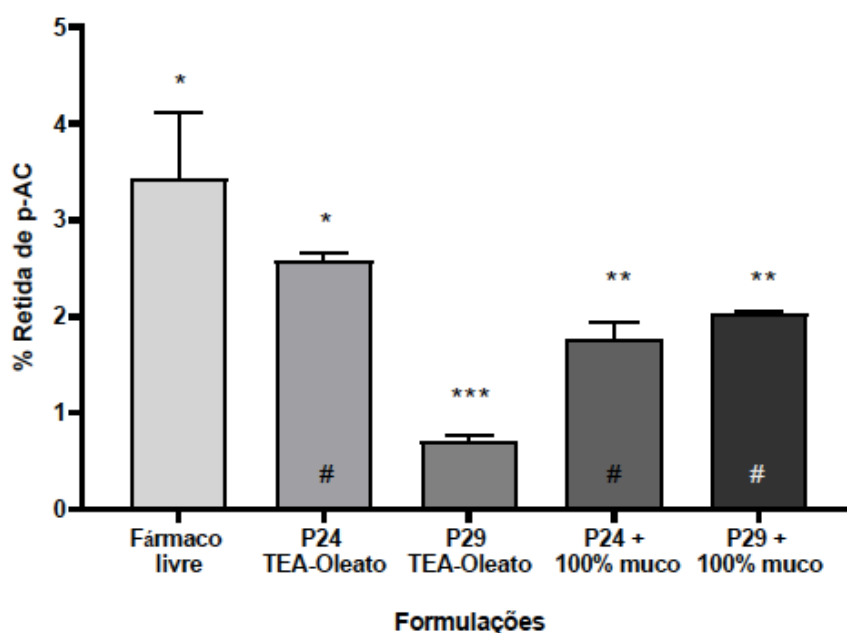


Fig. 37. Retenção do *p*-AC (%) na mucosa suína após 12 horas de experimento. Análise One-way ANOVA e pós teste Tukey com $\alpha = 0,05$, sendo símbolos iguais indicam valores médios sem diferenças estatisticamente significativas.

6. Ensaios biológicos

Após a caracterização das formulações selecionadas, P24 TEA-Oleato e P29 TEA-Oleato foram utilizados nos ensaios biológicos para avaliar a atividade antifúngica do *p*-AC quando incorporado nos CLs, e também o sistema desenvolvido no geral, sua facilidade de aplicação e desempenho como SLF.

6.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias e fungicidas

A partir deste ensaio, observou-se que o ácido *p*-cumárico apresentou um valor de CIM de $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as três espécies de *Candida* analisadas. Essa alta quantidade de composto necessária está de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura. Zabka e Pavela (2013) avaliaram a eficácia antifúngica de alguns compostos fenólicos (incluindo *p*-AC) contra fungos filamentosos e patogênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e descobriram que a concentração mínima desse ácido para inibir o crescimento de 100% dos fungos era maior do que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Faria *et al.* (2011) descobriram que o *p*-AC, na concentração de 5 mmol/L, não foi capaz de inibir o crescimento de 100% de diferentes espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo necessário aumentar a concentração do ácido fenólico. Por outro lado, a anfotericina apresentou CIM de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. glabrata* e $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e *C. krusei*. O fluconazol não apresentou CIM para nenhuma das cepas, pois não inibiu o crescimento de leveduras nas concentrações testadas.

Em relação às formulações, sabe-se que os sistemas cristalinos líquidos podem diminuir o valor

da CIM de compostos naturais ou fármacos comerciais (VICTORELLI, 2016; RODERO *et al.*, 2018), no entanto, não foi o caso de *p*-AC ou fluconazol. As CIMs para fluconazol e *p*-AC incorporados foram as mesmas observadas para os fármacos livres. As concentrações fungicidas mínimas determinaram as concentrações mais baixas que mataram completamente as leveduras após 24 horas de incubação à 37°C. Depois de encontrar as CIMs de 5000µg.mL⁻¹, o ensaio para determinar a CFM indicou que a atividade do *p*-AC era fungistática nas cepas. Todas as espécies apresentaram CFM de 6000µg.mL⁻¹. Cantón *et al.* (2003) observaram resultado semelhante ao avaliar a CFM da anfotericina B para *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Com exceção da *C. tropicalis*, todas as outras espécies chegaram a apresentar um valor de CMF 16x maior que a concentração de CIM. Shokri *et al.* (2011), ao avaliar a eficácia antifúngica do própolis (substância natural composta principalmente de ácidos fenólicos) em espécies de *Candida*, constataram que os valores de CIM e CFM encontrados eram altos (> 1mg.mL⁻¹) e que todas as concentrações fungicidas mínimas eram maiores que as inibitórias mínimas.

6.2. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes de *Candida* spp.

A atividade antifúngica apresentada por *p*-AC livre contra biofilmes de três espécies de *Candida* spp. está apresentada na figura 38.

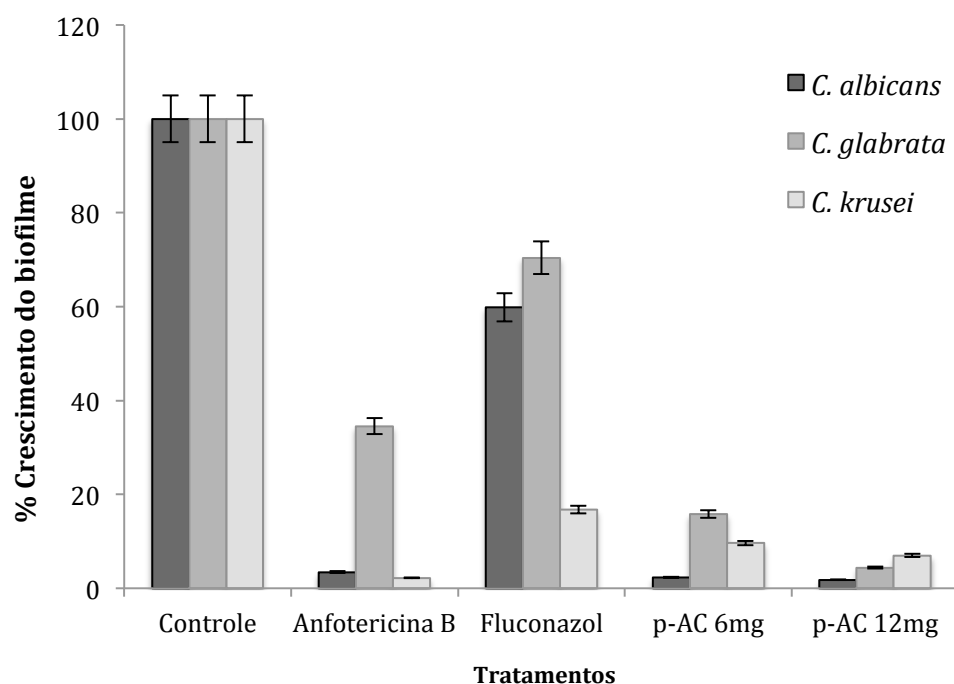


Fig. 38. Leitura da porcentagem de células viáveis nos biofilmes de *Candida* spp tratados com *p*-AC livre, Anfotericina B e Fluconazol, a partir da quantificação por XTT.

Para os antifúngicos convencionais fluconazol e anfotericina B, a concentração utilizada foi de 1mg.mL^{-1} , pois é sabido que os biofilmes das espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, podem ser até 1.000x mais resistentes a esses agentes que as células planctônicas (TOBUDIC *et al.*, 2011; BOJSEN *et al.*, 2014; HACIOGLU *et al.*, 2018). Assim, como a CIM mais alta encontrada foi de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B contra *C. glabrata* e fluconazol não apresentou CIM, a concentração testada nas três cepas para ambos os agentes antifúngicos foi de 1000x CIM. Para o *p*-AC, visto que seu valor de CIM apresentou efeito fungistático, a concentração utilizada do fármaco neste e nos ensaios seguintes foi referente ao encontrado no ensaio CFM. Nos ensaios *in vitro*, o objetivo foi avaliar qual valor de *p*-AC (sua CFM ou 2x CFM) apresentaria um melhor efeito antifúngico do que os fármacos convencionais em uma concentração 1000x maior que suas CIMs.

Observou-se que o fluconazol e a anfotericina B exibiram efeitos diferentes para cada cepa. O biofilme de *C. albicans* foi suscetível à anfotericina B, uma vez que apenas 3,4% das células viáveis puderam ser quantificadas ao final do experimento. Diferentemente do fluconazol, no qual quase 60% do biofilme sobreviveu após o tratamento. *C. glabrata* foi a cepa mais resistente para ambos os fármacos: 34,5% do biofilme sobreviveu à atividade antifúngica da anfotericina B e mais de 70% ao fluconazol. Por outro lado, *C. krusei* foi a espécie mais suscetível, com apenas 2,23% de células viáveis após o tratamento com anfotericina B e 16,8% após a atividade do fluconazol.

Enquanto isso, ambos os tratamentos com *p*-AC mostraram uma diminuição maior no crescimento de fungos em todos os biofilmes. A maior porcentagem de células viáveis (15,8%) entre as espécies foi observada com 6mg.mL^{-1} de *p*-AC contra *C. glabrata*. Ainda assim, foi metade do menor valor alcançado pelos antifúngicos convencionais para essa cepa. O *p*-AC (em ambas as concentrações) apresentou melhores resultados que o fluconazol e anfotericina B para *C. albicans* e *C. glabrata*. Somente o tratamento de *C. krusei* com anfotericina B apresentou maior atividade antifúngica que o *p*-AC.

A partir da análise estatística por Two-way ANOVA e pós teste Tukey com $\alpha = 0,05$, os resultados apresentados na figura 38 foram significantes de acordo com o tratamento analisado. Para anfotericina B, apenas *C. albicans* e *C. krusei* não apresentaram diferença significativa entre seus valores de células viáveis. Quanto ao fluconazol, as três espécies apresentaram diferença estatística significativa em relação à porcentagem de crescimento do biofilme. Já os tratamentos com *p*-AC, em ambas as concentrações, não demonstraram diferença significativa entre as espécies, com exceção da *C. albicans* e *C. glabrata* à 6mg.mL^{-1} .

Ao incorporar *p*-AC e fluconazol nos sistemas líquidos cristalinos, suas atividades antifúngicas foram aumentadas. A Tabela 5 mostra como as formulações funcionaram como um sistema interessante de administração de medicamentos, pois além de melhorarem o efeito do *p*-AC, também

aumentaram a ação do fluconazol nos biofilmes, matando 100% das células de levedura das três espécies de *Candida*. Além disso, os CLs não incorporados com os fármacos (P24 S/F e P29 S/F) não apresentaram toxicidade. Rodero *et al.* (2018) também apresentaram um resultado semelhante ao tratar biofilmes de duas cepas clínicas de CVVR com curcumina incorporada em CLs. Os sistemas incorporados com curcumina apresentaram atividade antifúngica maior que aqueles incorporados com fluconazol. Ademais, seus sistemas líquido-cristalinos sem fármaco também não foram tóxicos às células fúngicas.

Tabela 27. Avaliação da toxicidade dos sistemas incorporados com *p*-AC e fluconazol contra biofilmes de *Candida*. Os valores representam a porcentagem de biofilme erradicada após os tratamentos.

Sistemas	Toxicidade dos sistemas contra biofilme de <i>Candida</i>		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
P24 S/F	Não tóxico	Não tóxico	Não tóxico
P29 S/F	Não tóxico	Não tóxico	Não tóxico
P24 + 6mg/g de <i>p</i> -AC	94%	90%	99%
P29 + 6mg/g de <i>p</i> -AC	95,50%	95%	99%
P24 + 12mg/g de <i>p</i> -AC	99%	97,50%	100%
P29 + 12mg/g de <i>p</i> -AC	99,80%	99,50%	100%
P24 + 1mg/g Fluconazol	100%	100%	100%
P29 + 1mg/g Fluconazol	100%	100%	100%

6.3. Avaliação dos resultados dos ensaios terapêuticos *in vivo*

Um modelo experimental *in vivo* de candidíase vulvovaginal usando camundongos foi realizado para avaliar a eficácia do *p*-AC como composto com potencial terapêutico, e também estudar a resposta da mucosa do hospedeiro contra duas espécies de *Candida*. O protocolo utilizado neste projeto se mostrou um método eficaz para obter a quantificação da carga de fungos de *C. albicans* e a coleta de amostras vaginais. O estudo experimental de candidíase utilizando modelos murinos pode envolver tanto camundongos heterogênicos (outbred) quando isogênicos (inbred). Dentre as linhagens inbred, BALB/c e C57BL/6 são as mais utilizadas para estudos com espécies de *Candida spp*, enquanto que ICR, CD-1 e Swiss são as linhagens outbred mais utilizadas (YANO; FIDEL, 2011; SEGAL; FRENKEL, 2018; VAN DIJCK *et al.*, 2018). Segundo a literatura, o uso de camundongos outbred é preferível em estudos que envolvam modelos de infecção fúngica, triagem de compostos antifúngicos, testes toxicológicos e avaliação da resposta de uma população à uma

vacina ou terapia medicamentosa, devido ao fato destes animais serem geneticamente heterogênicos, o que mimetiza a população humana (ZULUAGA *et al.*, 2006; COLBY *et al.*, 2017; SEGAL; FRENKEL, 2018; VAN DIJCK *et al.*, 2018; CARRERAS *et al.*, 2019).

Essas linhagens de camundongo são usadas como modelo para diferentes tipos de candidíase, como candidíase oral, intestinal e vaginal. No entanto, como as espécies de *Candida* não são encontradas na microbiota natural de camundongos, é necessário otimizar a infecção fúngica vaginal aplicando estradiol, mantendo os animais em constante estado de pseudoestro (ZAK SANDE, 1999; CARRARA *et al.*, 2010; RODERO *et al.*, 2018). O pseudoestro corresponde à fase do estro que normalmente ocorre nas fêmeas de camundongo, na qual os níveis estrogênicos encontram-se altos e por isso haveria uma maior susceptibilidade de desenvolvimento da candidíase vaginal. Essa susceptibilidade se dá pelo fato do estrogênio converter o tecido epitelial colunar para um epitélio escamoso estratificado espesso, devido o aumento do teor de glicogênio e substratos de crescimento, os quais aumentam a avidéz da levedura pelo tecido e promove o crescimento fúngico (KINSMAN; COLLARD, 1986).

Este tratamento hormonal deve ser feito previamente à inoculação do fungo e durante todo o período experimental, pois, na ausência do pseudoestro, pode até ocorrer o estabelecimento da infecção, porém ela irá declinar totalmente em cerca de uma à duas semanas. Para o estabelecimento de uma infecção persistente é necessária a injeção semanal do hormônio (FIDEL *et al.*, 2000; RAHMAN *et al.*, 2007). Dessa forma, à cada lavagem, os camundongos receberam 0,1ml da solução de estradiol injetados por via subcutânea, para manter o estado de pseudoestro até o final do experimento.

Para verificar se as fêmeas realmente estavam na fase de pseudoestro e infectadas, observou-se a presença de alterações visíveis na região vaginal (BYERS *et al.*, 2012; MACHADO-DE-SENA *et al.*, 2014). A figura 39 compara as regiões genitais de animais saudáveis e infectados, na qual pode-se observar alguns sinais característicos da vaginite humana, como: edema, eritema e secreções.

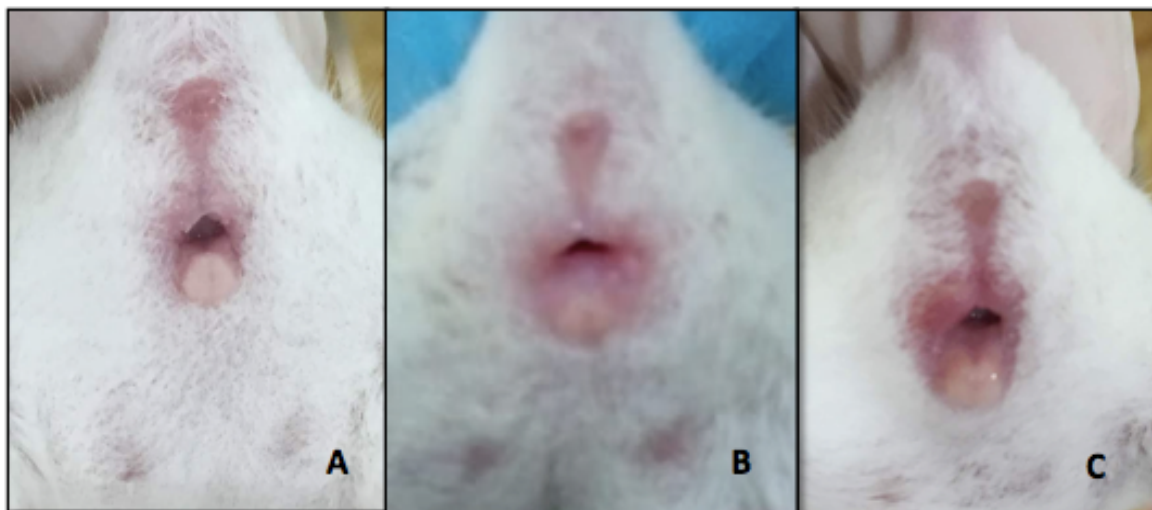


Fig. 39. Regiões vaginais de fêmeas de Swiss para visualização do estado de pseudoestro e de sinais de infecção. A imagem A mostra a região genital com aspecto normal, em Swiss sadia. A imagem B mostra a região genital de um animal infectado em fase de estro, no início do tratamento, onde ainda é possível observar edema e ligeiro eritema. Já a imagem C mostra um animal infectado não tratado, com região eritematosa e com secreção vinda do canal vaginal (Conforme apresentado por Byers *et al.*, 2012 e Sena, 2013).

Duas espécies foram avaliadas a partir do ensaio *in vivo*: *C. albicans* (SC5314) e *C. glabrata* (ATCC 2001), porém apenas a infecção por *C. albicans* mostrou-se satisfatória. Há na literatura estudos que mostram a infecção de camundongos por *C. glabrata* para o estudo de candidíase oral e vaginal (FIDEL *et al.*, 1996; NASH *et al.*, 2016; ROSSONI *et al.*, 2017; PERSYN *et al.*, 2018). Em todos eles, foram desenvolvidas estratégias para superar os obstáculos envolvendo a infecção *in vivo* dessa espécie, já que ela não produz formas filamentosas e por isso sua capacidade invasiva no epitélio e em mucosas é menor quando comparada às outras espécies (SILVA *et al.*, 2011). Dentre estas estratégias estão: a reinfecção dos animais após o início do experimento, a formação dos biofilmes em cateteres implantados por via subcutânea no dorso de murinos ou a utilização de animais imunossuprimidos/ou diabéticos. Nash e colaboradores também observaram problemas ao tentar desenvolver uma metodologia *in vivo* para infecção de CVV por *C. glabrata* em camundongos BALB/c e C57BL/6. Após testar diversos fatores, concluíram que altos níveis de colonização vaginal em camundongos podem ser alcançados utilizando camundongos com diabetes tipo 1 em estado de pseudoestro e inoculados com uma alta concentração de leveduras (1×10^7 UFC. mL⁻¹).

Uma vez que não utilizaríamos camundongos imunossuprimidos ou diabéticos, tentamos manter a CVV nos camundongos através da reinfecção e manutenção do pseudoestro, como demonstrado por Rossoni *et al.*, (2017). Entretanto, após o terceiro dia, observamos em todos os grupos um declínio na contagem de colônias provenientes dos lavados, ao passo que no quinto dia não havia mais animais infectados. Dessa forma, como o protocolo não se mostrou viável para o

desenvolvimento de CVV por *C. glabrata* em fêmeas saudáveis de Swiss, apenas os resultados referentes à infecção por *C. albicans* foram analisados e discutidos neste trabalho.

C. albicans é o microrganismo com maior frequência nos casos de CVV, representando um grande desafio de saúde pública, pois sua importância médica e econômica cresce cada vez mais devido às altas taxas de mortalidade e aumento de gastos com cuidados e hospitalização (LAI *et al.*, 2012). O biofilme de *C. albicans* é resistente à maioria dos medicamentos antifúngicos conhecidos e utilizados, por isso torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas com eficácia contra esse tipo de fator de virulência das leveduras (GULATI; NOBILE, 2016).

Para o ensaio *in vivo*, os CLs foram incorporados com 6mg/g de *p*-AC e 1mg/g de fluconazol, e o fármaco livre utilizado na concentração de 6mg.mL⁻¹. De acordo com os valores apresentados na tabela 28, observa-se que todos os grupos de CLs incorporados com compostos antifúngicos ajudaram a diminuir a carga de infecção.

Tabela 28. Log UFC.mL⁻¹ dos lavados vaginais do primeiro dia de tratamento ao último dia de tratamento de animais infectados com $2,5 \times 10^8$ células .mL⁻¹ de *Candida albicans* SC5314, n = 5. Os resultados estão descritos como média dos valores de CFU obtidos por grupo $\pm$ desvios padrões das médias.

Grupos experimentais	Valores de Log UFC.mL ⁻¹		
	1° dia de tratamento	2° dia de tratamento	3° dia de tratamento
Controle (+)	3,44 $\pm$ 0,09	3,46 $\pm$ 0,02	3,47 $\pm$ 0,01
P24 S/F	3,47 $\pm$ 0,01	3,41 $\pm$ 0,05	3,47 $\pm$ 0,01
P29 S/F	3,47 $\pm$ 0,01	3,37 $\pm$ 0,05	3,34 $\pm$ 0,15
P24 + Fluco	3,39 $\pm$ 0,13	2,31 $\pm$ 0,25*	1,90 $\pm$ 0,19*
P29 + Fluco	3,21 $\pm$ 0,24	3,21 $\pm$ 0,01*	2,54 $\pm$ 0,35*
P24 + <i>p</i> -AC	3,37 $\pm$ 0,09	3,10 $\pm$ 0,22*	2,25 $\pm$ 0,40*
P29 + <i>p</i> -AC	3,47 $\pm$ 0,01	3,11 $\pm$ 0,12*	2,70 $\pm$ 0,29*
<i>p</i> -AC livre	3,47 $\pm$ 0,01	3,46 $\pm$ 0,02	3,37 $\pm$ 0,09
DMSO	3,42 $\pm$ 0,10	3,47 $\pm$ 0,01	3,47 $\pm$ 0,01

Obs: Valores com * apresentaram $p < 0,05$ comparado ao grupo controle do mesmo dia de tratamento.

Assim como foi demonstrado no experimento *in vitro*, os sistemas sem fármaco e o DMSO novamente não apresentaram nenhuma toxicidade contra *C. albicans*, indicando que nem os sistemas de liberação de fármaco nem o solvente utilizado possuem atividade antifúngica. Já o *p*-AC livre, de maneira oposto ao ensaio *in vitro*, não proporcionou uma diminuição significativa entre o primeiro dia de tratamento e o último quando em contato com a mucosa vaginal. A partir do ensaio *in vivo*,

fica evidente que a incorporação do fluconazol nos sistemas aumentou a eficácia desse agente antifúngico, quando comparado aos resultados obtidos da sua forma livre nos ensaios *in vitro*. O sistema P24 + Fluco foi o que apresentou uma maior diminuição de Log UFC.mL⁻¹, caindo de 3,39 para 1,90. O mesmo ocorreu com os CLs incorporados com *p*-AC: no último dia de tratamento, P24 + *p*-AC apresentou uma maior diminuição de cepas (log 2,25) do que P29 + *p*-AC (log 2,70).

As diferenças de composição e de mesofases entre as formulações não só proporcionaram valores ligeiramente distintos para os perfis liberação e permeação, como também para a atividade antifúngica. Ao contrário dos resultados citados anteriormente, em que a fase lamelar do sistema P29 apresentou maior taxa de liberação e permeação do *p*-AC, em relação à eficácia antifúngica, essa formulação demonstrou uma ação menor nos biofilmes do que o sistema P24. Este melhor desempenho *in vivo* dos sistemas P24 coincide com os resultados obtidos durante a caracterização dos CLs. O P24 TEA-Oleato apresentou uma estrutura de rede mais bem organizada e maior estabilidade interna, além de que, ao incorporar de MVA e *p*-AC, sua propriedade mucoadesiva aumentou. Ademais, quando diluído com MVA, o sistema P24 exibiu um aumento na concentração de *p*-AC liberado e permeado na mucosa vaginal, ao contrário dos resultados obtidos para os sistemas P29. Esses dados sugerem que o contato com a mucosa vaginal dos animais influenciou positivamente o efeito terapêutico antifúngico dos CLs P24 e seu desempenho como sistemas mucoadesivos tópicos para liberação de *p*-AC.

Durante o experimento, também notou-se que todos os grupos tratados com os CLs (incorporados ou não) apresentaram uma melhora do edema e eritema presentes nas regiões vaginais dos animais. Para a realização do tratamento, as formulações foram aplicadas com o auxílio de uma seringa de 1mL. Na figura 40 observa-se que todos os sistemas apresentaram a viscosidade e mucoadesividade necessárias para formulações tópicas, pois a pressão aplicada no êmbolo fazia com que elas fluíssem com facilidade pela seringa e, em contato com a mucosa vaginal, os CLs permaneciam aderidos, sem ocorrer o escorrimento para fora da vagina.

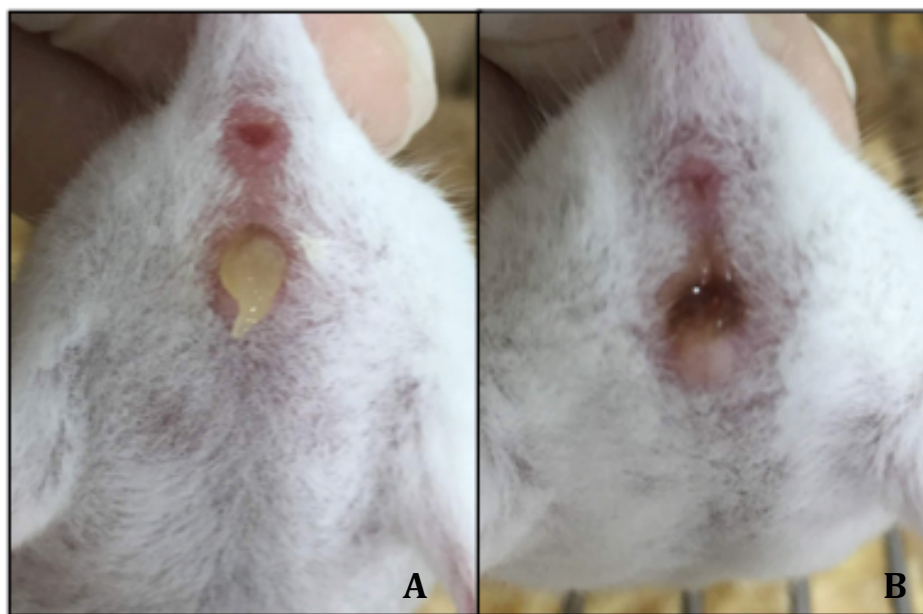


Fig. 40. Formulações P24 (A) e P29 (B) incorporadas com *p*-AC, nos canais vaginais de fêmeas Swiss.

6.5. Análise citológica do conteúdo vaginal

A análise citológica permite observar microscopicamente o conteúdo dos lavados obtidos no ensaio *in vivo* e verificar se houve descamação do epitélio vaginal, se há presença de células de *Candida albicans* e em qual morfologia elas se encontram. Para isso, realizou-se o esfregaço de cada lavado em lâminas de vidro, para depois fixá-los passando a lâmina próxima à chama do bico de Bunsen, com a face que contém o material biológico voltada para cima. Após a fixação, as lâminas foram imersas em solução de Giemsa 20% por 7min, posteriormente lavadas com água destilada, deixadas à temperatura ambiente para secagem e então examinadas em microscópio óptico com a objetiva de 40x.

Em seguida estão dispostas comparações entre as imagens referentes aos esfregaços da primeira lavagem após o 1º dia de tratamento (imagem da esquerda) e da última lavagem, após o último dia de tratamento (imagem da direita). Com exceção do controle negativo, onde visualiza-se apenas células epiteliais, as setas pretas mostram as diversas formas morfológicas da levedura, desde blastosporos, até pseudo-hifas e hifas. A partir das imagens, é possível observar uma grande diferença morfológica entre as leveduras obtidas do controle positivo, de solvente e do fármaco livre e aquelas observadas nas lavagens finais dos tratamentos com cristais líquidos.

Controle negativo (Grupo 1)

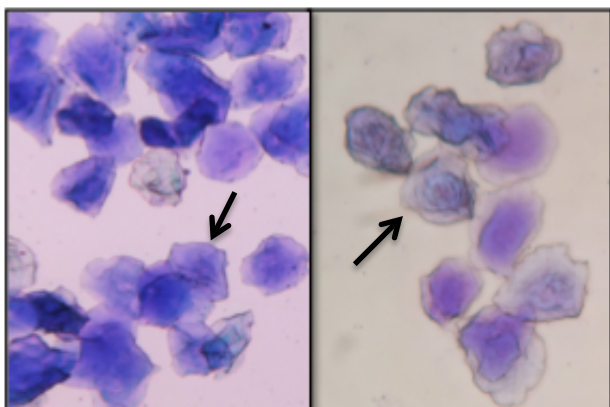


Fig. 41. Leitura microscópica dos lavados do controle negativo, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Controle positivo (Grupo 2)

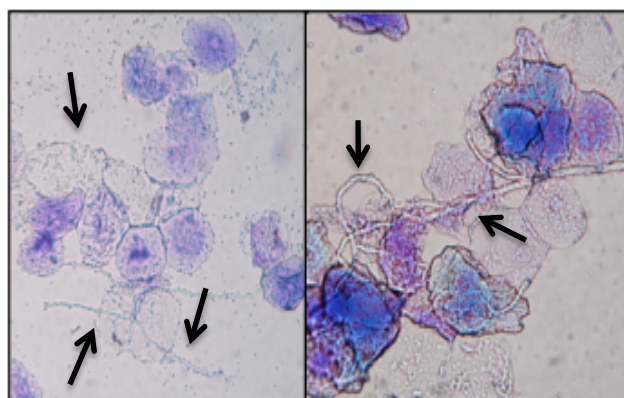


Fig. 42. Leitura microscópica dos lavados do controle positivo, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Tratamento P24+ Fluconazol (Grupo 3)

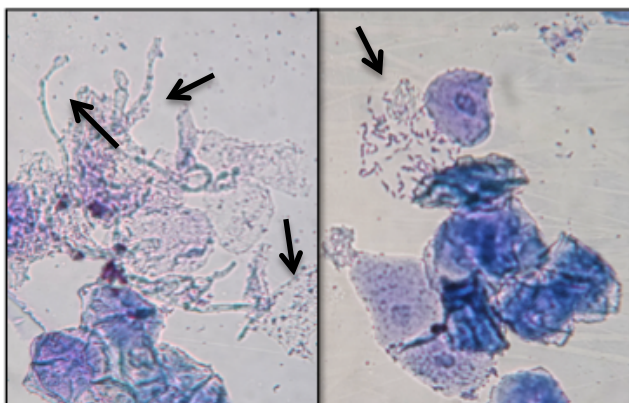


Fig. 43. Leitura microscópica dos lavados do tratamento P24+ Fluco, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Tratamento P29+ Fluconazol (Grupo 4)

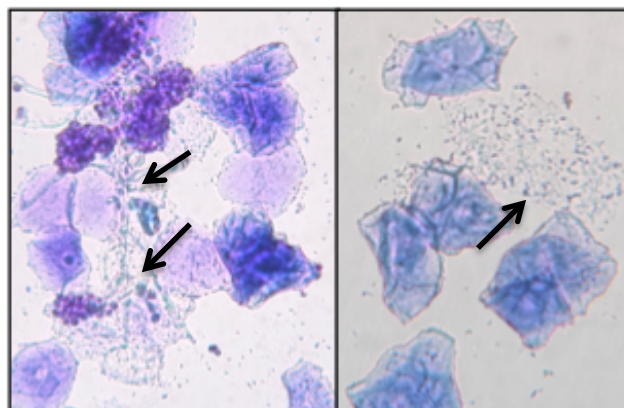


Fig. 44. Leitura microscópica dos lavados do tratamento P29+ Fluco, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Controle P24 Sem Fármaco (Grupo 5)

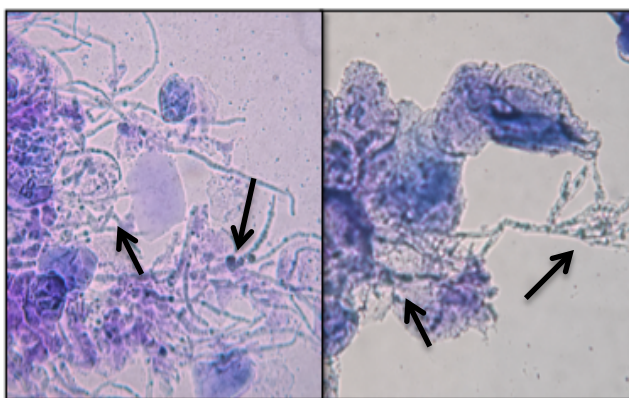


Fig. 45. Leitura microscópica dos lavados do controle P24, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Controle P29 Sem Fármaco (Grupo 6)

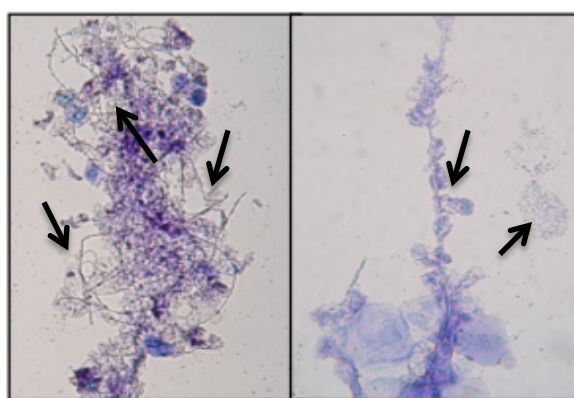
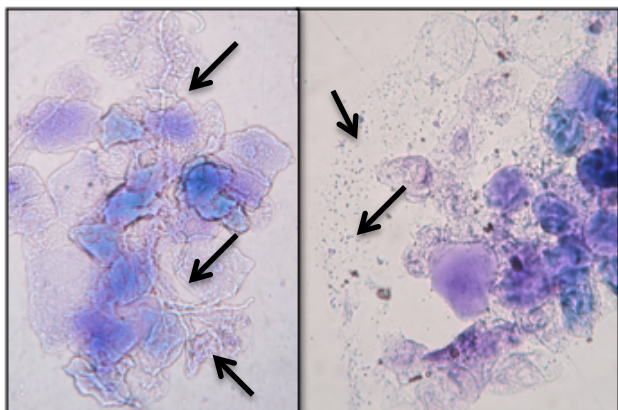
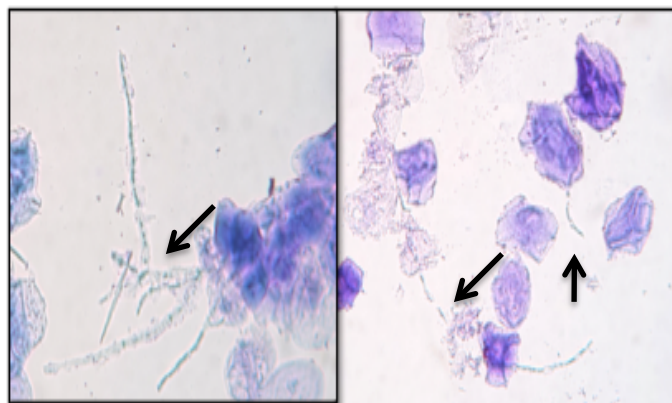
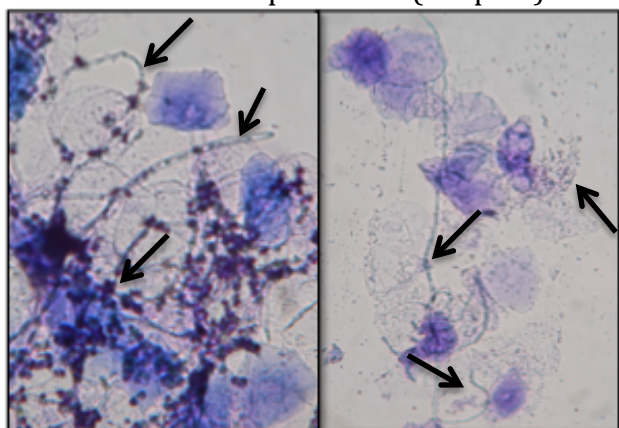
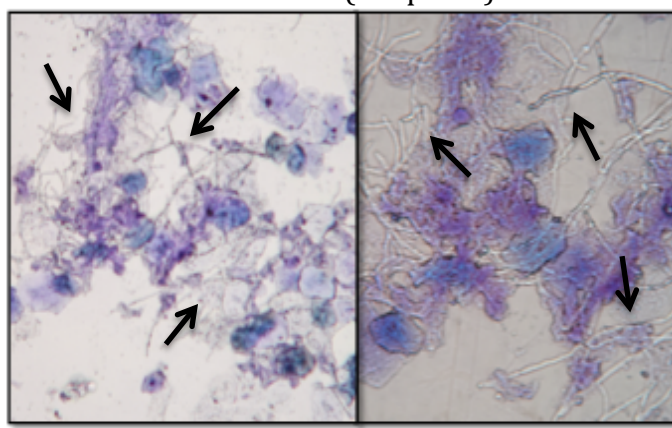


Fig. 46. Leitura microscópica dos lavados do controle P29, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Tratamento P24 + *p*-AC (Grupo 7)**Fig. 47.** Leitura microscópica dos lavados do tratamento P24+ *p*-AC, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.Tratamento P29 + *p*-AC (Grupo 8)**Fig. 48.** Leitura microscópica dos lavados do tratamento P29+ *p*-AC, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.Tratamento *p*-AC livre (Grupo 9)**Fig. 49.** Leitura microscópica dos lavados do controle *p*-AC livre, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

Controle DMSO (Grupo 10)

**Fig. 50.** Leitura microscópica dos lavados do controle do solvente DMSO, em coloração de Giemsa, sob objetiva de 40x.

A partir das análises microscópicas dos lavados, nota-se que os CLs incorporados tanto com *p*-AC quanto com fluconazol diminuíram não só a carga fúngica da infecção, mas também a presença de formas filamentosas, as quais atuam como fatores de virulência e são essenciais para a invasão do epitélio. Surpreendentemente, mesmo sem reduzir o número de cepas, os lavados dos grupos controles dos sistemas P24 e P29 também exibiram uma redução na presença de hifas e pseudo-hifas quando visualizados microscopicamente. Entretanto, as amostras obtidas do tratamento com *p*-AC livre e do controle de DMSO apresentaram perfis similares ao do controle positivo. No geral, observou-se que apesar da alta presença de hifas no primeiro dia de tratamento, as análises citológicas dos grupos 3,4,7 e 8 apresentaram apenas formas leveduriforme ao final do experimento.

7. CONCLUSÕES

Os sistemas desenvolvidos com TEA-Oleato demonstraram propriedades de viscosidade, mucoadesão e características líquido-cristalinas (como a visualização de estrias e cruzeiros de malta) interessantes para aplicação tópica na mucosa vaginal. A utilização do MVA em diferentes proporções nos sistemas forneceu um *insight* de como o ambiente vaginal pode alterar as propriedades e as mesofases dos CLs. Ademais, ambos P24 e P29 TEA-Oleato apresentaram perfis de liberação controlada do fármaco, diminuindo sua permeabilidade na mucosa e propiciando sua retenção pela mesma.

O ácido *p*-cumárico apresentou atividade fungicida e fungistática contra cepas de referência (ATCC) de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* foram promissores porque observou-se uma redução quase total dos biofilmes, tanto no tratamento utilizando o fármaco livre quanto ele incorporado nos sistemas. Em relação ao ensaio *in vivo*, as formulações P24 e P29 TEA-Oleato incorporadas com *p*-AC mostraram um desempenho positivo no tratamento da CVV, visto que reduziram significativamente a carga de fungos, diminuíram a presença de formas filamentosas e consequentemente proporcionaram uma melhora no edema e eritema presentes nas regiões vaginais dos animais. A partir dos resultados obtidos com o fluconazol incorporado nos CLs em comparação com sua forma livre (em solução), as formulações desenvolvidas também aumentaram a sua eficácia. Já o *p*-AC incorporado, apenas com seu valor de CFM, apresentou um resultado semelhante ao do fluconazol (1000x CIM) no último dia de tratamento para ambos os sistemas. Este resultado mostra o potencial deste composto fenólico em ser utilizado no tratamento de CVV. De maneira geral os sistemas desenvolvidos demonstram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento de candidíase vulvovaginal.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 5, p.461-465, 2003.
- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, 23:253–73, 2010.
- ADISAKWATTANA, S. et al. Structure–Activity Relationships of Trans-Cinnamic Acid Derivatives on α -Glucosidase Inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 11, p. 2893–2896, 2004.
- ALVES, C. T. et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against Candida species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p.139-146, 2014.

- AGUIAR, M. M. G. B. de. **Obtenção de gel mucoadesivo de nistatina para o tratamento de candidíase oral. Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nistatina.** 2016. 231 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - Usp, São Paulo, 2016.
- ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicação na área cosmetic farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.
- ALVES, C.T.; WEI, X.Q.; SILVA, S. et al. Candida albicans promotes invasion and colonization of Candida glabrata in a reconstituted human vaginal epithelium. **Journal of Infection**, v. 69, p. 396–407, 2014.
- AKDEMIR, F. E.; ALBAYRAK, M.; ,CALIK, M.; et al. The Protective Effects of p-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p.18-29, 2017.
- AMALAN, V.; NATESAN, V.; DHANANJAYAN, I.; et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 230–236, 2016.
- AMOURI, I.; SELLAMI, H.; BORJI, N. et al. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. **Mycoses**, v. 54, p. 499–505, 2011.
- ANDERSON, M. R.; KLINK, K.; COHRSEN, A. Evaluation of vaginal complaints. **Journal of the American Medical Association**, v. 291, p. 1368-79, 2004.
- ARAUJO, 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 the Vaginal Administration of Drugs. **AAPS Pharmscitech**, v. 20, p. 1-12, 2019.
- ASCIOGLU, S.; REX, J. H.; DE PAUW, B. 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, p. 7–14, 2002.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 64, 65, 344, 345, 346.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 46, pg. 397-403, 2000.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p.71-79, 2016.

- BAMRUNGSAP, S. et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p.1253-1271, 2012.
- BARRADAS, T. N. et al. Development and characterization of micellar systems for application as insect repellents. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p.633-640, 2013.
- BARRAL, B. et al. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. **Fungal Biology**, v. 121, n. 12, p.1045-1053, 2017.
- BARUAH, A.; PATHAK, A.K.; OJHA, K. Phase behavior and thermodynamic properties of lamellar liquid crystal developed for viscoelastic surfactant based fracturing fluid. **Chemical Engineering Sciences**, 131, 146–154, 2015.
- BATES, D. W. et al. Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p.686-693, 2001.
- BEER, D. de et al. Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Role as In Vivo Antioxidants of Wine. **South African Journal Of Enology & Viticulture**, v. 23, n. 2, p.48-61, 2017.
- BENEDICT, K. et al. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, Volume 68, Issue 11, pages 1791–1797, 2019.
- BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1773–1777, 2004.
- BENTLEY, M. V. L. B. et al. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 49-55, 1999.
- BERNEGOSSI, Jéssica. **Desenvolvimento, caracterização e ação anti-biofilme oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o peptídeo KSL-W**. 2014. p. 107. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara, 2014.
- BHARGAVA, A. et al. Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 2, n. 3, p.188-193, 2011.
- BHESANIA, A. H.; NARAYANKHEDKAR, A. Vulvovaginal Candidosis. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p.240-250, 2017.
- BITEW, A.; ABEBAW, Y. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. **Bmc Women's Health**, v. 18, n. 1, p.1-10, 2018.
- BLOSTEIN, F.; LEVIN-SPARENBERG, E.; WAGNER, J.; FOXMAN, B. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Annals Of Epidemiology**, v. 27, n. 9, p. 575-582, 2017.

- BODDUPALLI, B. et al. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p.381-387, 2010.
- BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. Saccharomyces cerevisiae biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p.1-10, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4>.
- BRADY, J. et al. Polymer properties and characterization. In: YIHONG, Qiu (Editor). **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2^a. Ed. Amsterdam: Academic Press, 2016. p. 181–223.
- BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.
- CAFAGGI, S. et al. Preparation and evaluation of a chitosan salt–poloxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 159-169, 2005.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of Candida albicans. **Trends In Microbiology**, v. 9, n. 7, p.327-335, 2001.
- CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. **International Journal of Nanomedicine**, p.3719-3735, 2014.
- CALIXTO, G. et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, p.4815-4824, 2015.
- CALIXTO, G. M. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do Streptococcus mutans**. 2013. p. 105. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo – Brasil).
- CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream Candida species. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p.203-206, 2003.
- CAPOBIANCO, J. O.; LERNER, C. G.; GOLDMAN, R. C. Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of Candida albicans aspartic proteinase. **Analytical Biochemistry**, v. 204, p. 96-102, 1992.
- CAMELLA, C. M. et al. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p.39-52, 2015.
- CARRARA, M.A. et al. A New Model of Vaginal Infection by Candida albicans in Rats. **Mycopathologia**, v. 170, p. 331–338, 2010.
- CASSONE, A. et al. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 777–83, 1987.

- CDC - Center For Disease Control And Prevention. **Vulvovaginal Candidiasis: 2015 STD Treatment Guidelines**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/tg2015/candidiasis.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2020.
- CETIN, M.; OCAK, S.; GUNGOREN, A.; HAKVERDI, A.U. Distribution of Candida species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 584–8, 2007.
- CEUA-FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais**. FIOCRUZ – Rio de Janeiro, 2008. Disponível em http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camarastecnicas/Manual_procedimentos.pdf (pág. 39) acesso em: 07/11/2019.
- CHAFFIN, W. L. Candida albicans cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, p. 495–544, 2008.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5385–5394, 2001.
- CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p.457-465, 14 dez. 2010.
- CHANG, J. Y. et al. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n. 1, p.155-163, 2002.
- CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. In vitro proteinase production by Candida species. **Mycopathologia**, v. 114, p. 163–8, 1992.
- CHENG, G. et al. Comparison between Candida albicans agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1656–1663, 2005.
- CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.1036-1040, 2009.
- CHORILLI, M. et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p.182-188, 2011.
- CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo**. 2007, p. 196. Tese (Doutorado) –Curso de

Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara-SP.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards**. CLSI document (M27-A3). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral Azole Drugs as Systemic Antifungal Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 4, p.263-272,1994.
- CORDOBÉS B.F., FRANCO J.M., GALLEGOS C. Rheology of the lamellar liquid-crystalline phase in polyethoxylated alcohol/water/heptane systems. **Grasas Aceites**. 56:96–105, 2005.
- CORMACK, B. P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v. 285, p. 578–82, 1999.
- DE LAS PENAS, A.; PAN, S.J.; CASTANO, I.; ALDER, J.; CREGG, R.; CORMACK, B. P. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. **Genes & Development**, v. 17, p. 2245–2258, 2003.
- DE OLIVEIRA SANTOS, G. C. et al. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.
- DEL-CURA, I. G.; GARCÍA-DE-BLAS, F. G.; CUESTA, T. S., *et al.* Patient preferences and treatment safety for uncomplicated vulvovaginal candidiasis in primary health care. **BMC Public Health**, vol. 11: 63, 2011.
- 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.
- DIEKEMA, D. et al. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 45–48, 2012.
- DIGNANI, M.; SOLOMKIN, J.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie E., McGinnis M., Pfaller M. **Clinical mycology**. USA: Elsevier, 197–231, 2009.
- DOMERGUE, R. et al. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. **Science**, v. 308, p. 866–870, 2005.
- DOVNIK, A. et al. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica Et Adriatica**, v. 24, n. 1, p.5-7, 2015.
- ELOFF, J. N. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p.1-8, 22, 2019.

- ESPINOSA, R. R. et al. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chemistry**, v. 182, p.95-104, 2015.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p.3204-3208, 2002.
- EL-SEEDI, H. R. et al. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p.10877-10895, 7, 2012.
- FARIA, N. C. G. et al. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters In Applied Microbiology**, v. 52, n. 5, p.506-513, 2011.
- FERREIRA, S. B. et al. Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2015, p. 55:164–178.
- FERREIRA, P. S. et al. A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, p.1-11, 2018.
- FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 71, p. 21–7, 2000.
- FIDEL P. L. Jr. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. **Med. Mycol.** 40(4):359-75. 2002.
- FIDEL, P.; CUTRIGHT, J.; TAIT, L.; SOBEL, J. A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 2, p. 425-431, 1996.
- FIDEL JR, P. L.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of Reproductive Hormones on Experimental Vaginal Candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 8, n. 2, p. 651- 657, 2000.
- FIDEL, P. L. JR; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, 1999.
- FIUME, M. M. et al. Safety Assessment of Triethanolamine and Triethanolamine-Containing Ingredients as Used in Cosmetics. **International Journal Of Toxicology**, v. 32, n. 3, p.59-83, 2013.
- FONSECA-SANTOS, Bruno. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal**. 2015. p.117. Dissertação

(Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara-SP.

- FONSECA-SANTOS, B. et al. Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6883-6893, 2017.
- FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2005, vol.41, n.3, pp.301-313. ISSN 1516-9332.
- FOTI, M. et al. Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure–Activity Relationship. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p.497-501, 1996.
- FOX, E. P.; NOBILE, C. J. The role of Candida albicans biofilms in human disease. In: Dietrich LA, Friedmann TS, editors. Candida albicans symptoms, causes and treatment options. **Nova Science Publishers**; p. 1 - 24, 2013.
- FRIBERG, S. E.; LIANG, Y.; LOCKWOOD, F. E. Non-Aqueous Lyotropic Liquid Crystals From Amphiphiles. **Journal of Dispersion Science And Technology**, v. 8, n. 4, p.407-422, 1987.
- GALAN-LADERO, M.A. et al. Enzymatic activities of Candida tropicalis isolated from hospitalized patients. **Medical Mycology**, v. 48, p. 207–210, 2010.
- GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122-143, 2000.
- GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.
- GOODBY, J. W. et al., An introduction to Materials Discussion No. 4: Molecular topology in liquid crystals. Grasmere. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 2631-2636, 2001.
- GREEN, C.B. et al. RT-PCR detection of Candida albicans ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology**, v. 150, p. 267–275, 2004.
- GROOT, P. W. J. et al. The cell wall of the human pathogen Candida glabrata: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 7, p. 1951–1964, 2008.
- GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 2013.

- GULATI, M.; NOBILE, C. J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes And Infection**, v. 18, n. 5, p.310-321, 2016.
- GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p.1032-1040, 2010.
- HACIOGLU, M. et al. In vitro activities of antifungals alone and in combination with tigecycline against Candida albicans biofilms. **Peerj**, v. 6, p.1-17, 25, 2018.
- HACHEM, R. et al. The changing epidemiology of invasive candidiasis: Candida glabrata and Candida krusei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v. 112, p. 2493–2499, 2008.
- HAMAD, M. et al. Utility of the oestrogen-dependent vaginal candidosis murine model in evaluating the efficacy of various therapies against vaginal Candida albicans infection. **Mycoses**. v. 49, n. 2, p.104, 2006.
- HAZEN, K. C.; PLOTKIN, B. J.; KLIMAS, D. M. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of Candida albicans and Candida glabrata. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 269–271, 1986.
- HENRIQUES, M. et al. Experimental methodology to quantify Candida albicans cell surface hydrophobicity. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1111–1115, 2002.
- HOLANDA, A. A. R. de et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p.1-9, 2007.
- HUBE, B. et al. Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 5, p.362-374, 2000.
- HYDE, S. T. Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: Wiley, v.2, 2002. p.299-332.
- HURLER, J.; ENGESLAND, A.; KERMANY, B. P.; SKALKO-BASNET, N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 1, p. 180–188.67, 2012.
- IBRAHIM, A. S. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of Candida albicans. **Infection and immunity**, v. 63, p. 1993–1998, 1995.
- 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.

- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- JONES, D. S. et al. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p.49-58, 2009.
- JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 2, p. 223–233, 1997.
- KANTARCIOLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p.160–165, 2002.
- KARTHIKEYAN, R.; DEVADASU, C.; BABU, P. S. Isolation, Characterization, and RP-HPLC Estimation of P-Coumaric Acid from Methanolic Extract of Durva Grass (*Cynodon dactylon* Linn.) (Pers.). **International Journal Of Analytical Chemistry**, v. 2015, p.1-7, 2015.
- KENNEDY, M. A.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans Candida Species: new insights. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 6, p. 465-470, 2010.
- KLOTZ, S. A.; DRUTZ, D. J.; ZAJIC, J. E. Factors governing adherence of Candida species to plastic surfaces. **Infection and immunity**, v. 50, n. 1, p. 97–101, 1985.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M.; ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, n. 3, p.2328-2375, 2013.
- KINSMAN, O.S.; COLLARD A.E., Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. **Infection and immunity**, v.53, p. 498-504, 1986.
- KIM, J. H. et al. Identification of Phenolics for Control of *Aspergillus flavus* Using *Saccharomyces cerevisiae* in a Model Target-Gene Bioassay. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p.7814-7821, 2004.
- KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p.748-764, 2010.
- KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, n.1, p. 338–349, 2015.
- KOFFI, A. A. et al. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p.328-335, 2006.

- KOLENYAK-SANTOS, F. et al. Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the In Vitro Schistosomiasis Activity of Praziquantel. **Journal of Nanoscience And Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p.761-772, 2015.
- KONG, C. et al. Antiangiogenic Effects of P-Coumaric Acid in Human Endothelial Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p.317-323, 2012.
- KOT, B. et al. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic Escherichia coli. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, p.919-924, 2015.
- KRAELING, M. E. K.; BRONAUGH, Robert L. In Vitro Absorption of Triethanolamine Through Human Skin. **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 22, n. 3, p.137-145, 2003.
- KUHN, D. M.; VYAS, V. K. The Candida glabrata adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. **FEMS Yeast Research**. v. 12, p. 398 – 414, 2012.
- KUMAR, V.G. et al. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of Candida spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 19, p. 3–10, 2009.
- KUMAMOTO, C.A. Candida biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 608–611, 2002.
- KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hyphaco- regulated genes to Candida albicans virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1546–54, 2005.
- LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p.301-311, 2007.
- LAI, C.-C. et al. Time to positivity of blood cultures of different Candida species causing fungaemia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 5, p.701-704, 2012.
- LEE, I. S.; BOYCE, M. C.; BREADMORE, M. C. A rapid quantitative determination of phenolic acids in Brassica oleracea by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p.797-801, 2011.
- LEE, I. et al. Risk factors for fluconazole-resistant Candida glabrata bloodstream infections. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, p. 379–383, 2009.
- LEYVA-GÓMEZ, G. et al. Modifications in Vaginal Microbiota and Their Influence on Drug Release: Challenges and Opportunities. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 217, 2019.
- LIAO, H.; LIU, S.; WANG, H.; SU, H.; LIU, Z. Enhanced antifungal activity of bovine lactoferrin-producing probiotic Lactobacillus casei in the murine model of vulvovaginal candidiasis. **BMC Microbiology**, v.19, n. 7, p 1-13, 2019.

- LIAO, X. et al. Risk factors for fluconazole-resistant invasive candidiasis in intensive care unit patients: An analysis from the China Survey of Candidiasis study. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 4, p.862.e1-862.e5, 2015.
- LOU, Z. et al. P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p.550-554, 2012.
- LORENZEN, E. et al. A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using mini pigs as a model of human genital Chlamydia infection. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p.1-13, 28, 2015.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p.143-154, 2005.
- LUCERI, C. et al. P-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **British Journal Of Nutrition**, v. 97, n. 03, p.458-463, 2007.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2971–4, 2001.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; CHEUNG, B.P.; TANG, G. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in Candida glabrata and its possible role in in vitro haemolysin production. **APMIS**, v. 112, p. 283–90, 2004.
- MA, B. et al. Assimilation of NAD⁺ precursors in Candida glabrata. **Molecular Microbiology**, 66, 14–25, 2007.
- MACHADO, R. M. et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p.14-26, 2015.
- MAHMOUDI, R.M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, p. 199–203, 2011.
- MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p.365-373, 2011.
- MARQUELE, F. D. et al. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p.461-468, 2006.
- MAZZARINO, L. et al. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 781-791, 2015.

- MEZZENGA, Raffaele et al. Shear Rheology of Lyotropic Liquid Crystals: A Case Study. **Langmuir**, v. 21, n. 8, p.3322-3333, abr. 2005.
- MINAGI, S.; MIYAKE, Y.; FUJIOKA, Y.; TSURU, H.; SUGINAKA, H. Cell-surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods. **Journal of general microbiology**; v. 132, p. 1111-1 115, 1986.
- MINOOEIANHAGHIGHI, M.H.; SEPEHRIAN, L.; SHOKRI, H. Antifungal effects of *Lavandula binaludensis* and *Cuminum cyminum* essential oils against *Candida albicans* strains isolated from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p.65-71, 2017.
- MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of global infectious diseases**, v. 3, p. 4–8, 2011.
- MONOD, M., G. TOGNI, B. HUBE, and D. Sanglard. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357-368, 1994.
- MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist Update**, v. 7, p. 301-309, 2004.
- NAE, H. Rheological Properties of Topical Formulations. In: DAYAN, Nava. **Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide**. Somerset: John Wiley & Sons, 2016. p. 287-348.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiology and molecular biology reviews: **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, 2003.
- NAGLIK, J. R.; FIDEL, P. L.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 2, p.129-139, 2008.
- NAGLIK, J. R. et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B Genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **The Journal of Infectious Diseases**,188:469–79, 2003.
- NARAYANA, R. C.; HARISH, N. M.; GULZAR A, M.; PRABHAKARA, P.; SINGH, A. K.; SUBRAHMANYAM, E. V. S. Formulation and in Vitro Evaluation of in Situ Gels Containing Secnidazole for Vaginitis. **Yakugaku Zasshi**, 129 (5), 569– 574, 2009.
- NASH, E. E. et al. A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis Shows No Evidence of an Inflammatory Immunopathogenic Response. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2016.

- NAVANEETHAN, D.; RASOOL, M. An experimental study to investigate the impact of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol, on cadmium chloride-induced renal toxicity. **Food & Function**, v. 5, n. 10, p.2438-2445, 2014.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics Of North America**, v. 30, n. 1, p.51-83, 2016.
- NISHINARI, K. et al. Parameters of Texture Profile Analysis. **Food Science And Technology Research**, v. 19, n. 3, p.519-521, 2013.
- NYIRJESY, P.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. **Obstetrics And Gynecology Clinics Of North America**, v. 30, n. 4, p.671-684, 2003.
- NYIRJESY, P. Chronic vulvovaginal candidiasis. **American Family Physician**, v. 63, n. 4, p. 697-702, 2001.
- ODDS, F. C. et al. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends In Microbiology**, v. 11, n. 6, p.272-279, 2003.
- OKADA, H.; HILLERY, A. M. Vaginal Drug Delivery. In: HILLERY, A. M.; LOYD, A. W.; SWARBRICK, J. **Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. New York: Taylor & Francis, 2001.
- OXMAN, D. A. et al. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is Candida speciation predictive of the susceptibility pattern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1460–1465, 2010.
- OYAFUSO, M.H.; CARVALHO, F.C.; TAKESHITA, T.M.; DE SOUZA, A.L.R.; ARAÚJO, D.R.; MERINO, V. et al. Development and in vitro evaluation of lyotropic liquid crystals for the controlled release of dexamethasone. **Polymers (Basel)**. 9(8):1–16, 2017.
- OZKORUCUKLU, S. P. et al. Determination of Dissociation Constants of Some Hydroxylated Benzoic and Cinnamic Acids in Water from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by CE-DAD. **Journal Of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 3, p.807-811, mar. 2009.
- PANAGODA, G. J. et al. Adhesion of Candida parapsilosis to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v. 44, p. 29–35, 2001.
- PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p.44-50, 2006.
- PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 48:503–35, 2009.
- PATEL, R.; PATEL, T. Liquid Crystals and Their Application in the Field of Drug Delivery. **Colloids In Drug Delivery**, p.311-336, 2010.

- PAULITSCH, A. et al. A 5-year (2000–2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. **Mycoses**, v. 49, p. 471–5, 2006.
- PAZ-CRISTOBAL, M. P.; ROYO, D.; REZUSTA, A.; ANDRÉS-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, 2013.
- PEI, K. et al. P-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of The Science Of Food And Agriculture**, v. 96, n. 9, p.2952-2962, 2016.
- PELEG, A.Y.; HOGAN, D.A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 340-9, 2010.
- PEREIRA, R. R. A.; BRUSCHI, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 6, p.643-652, 2011.
- PERSYN, A. et al. Monitoring of Fluconazole and Caspofungin Activity against In Vivo *Candida glabrata* Biofilms by Bioluminescence Imaging. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p.1-18, 2018.
- PFALLER, M. A. et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **Journal of Clinical microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5729–5731, 2003.
- PFALLER, M. A. et al. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3807–3810, 2005.
- PFALLER M. A.; DIEKEMA D.J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133–163, 2007.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1366–1377, 2010.
- PFALLER, M. A. et al. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p.1199-1203, 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analy-

sis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cut off values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, p. 303–313, 2015.

- PICHOVA, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 2669–2677, 2001.
- PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p.1494-1500, 2008.
- PHILLIPS, A. J. Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotericin B vaginal suppositories. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 2009-13, 2005.
- PRAGASAM, S. J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory And Anti-Inflammatory Effect Of p-Coumaric Acid, A Common Dietary Polyphenol On Experimental Inflammation In Rats. **Inflammation**. 2013, 36, 169–176.
- PURKAYASTHA, S; DAHIYA, P. Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 5, p.443-450, 2012.
- RAHMAN, D. et al. Murine Model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 615 - 622, 2007.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.755-760, 2006.
- RAMOS, M. et al. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p. 7455-7466, 2015.
- RATHBONE, M. J. et al. **Modified-Release Drug Delivery Technology**. 2ª Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. 528 p.
- RENÇBER, S.; KARAVANA, S.Y.; YILMAZ, F.F.; ERAÇ, B.; NENNI, M.; GURER-ORHAN, H. et al. Formulation and evaluation of fluconazole loaded oral strips for local treatment of oral candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science Technology**; 49:615–21, 2019.
- REZUSTA, A. et al. In Vitro Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species. **Photochemistry And Photobiology**, v. 88, n. 3, p.613-619, 2011.
- RICHTER, S. S. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2155–62, 2005.

- RODERO, C.F.; CALIXTO, G.; SANTOS, K.C.; SATO, M.R.; RAMOS, M.A.S.; MIRO, M.S. et al. Curcumin-loaded liquid-crystalline systems for controlled drug release and improved treatment of vulvovaginal candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, 15:4491–504, 2018.
- RODRIGUES, J. A. de O. et al. Evaluation of biochemical and serological methods to identify and clustering yeast cells of oral *Candida* species by CHROMagar test, SDS-PAGE and ELISA. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 2, p. 317-326, 2004.
- ROSSONI, R. D. et al. Study of Microbial Interaction Formed by "*Candida krusei*" and "*Candida glabrata*": "*In Vitro*" and "*In Vivo*" Studies. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 6, p. 669-674, 2017.
- RUELA, A.L.M.; CARVALHO, F.C.; PEREIRA, G.R. Exploring the phase behavior of monoolein/oleic acid/water systems for enhanced donezepil administration for Alzheimer disease treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 105(1):71–7, 2016.
- SALAMEH, D. et al. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p.1661-1667, 2008.
- SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia**, v. 22, p. 201–207, 1984.
- SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, n. 5, p.295-310, 1994.
- SAMARANAYAKE, Y. H.; WU, P. C.; SAMARANAYAKE, L. P.; SO, M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. **APMIS**, v. 103, n. 7-8, p.707-713, 1995.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p.10-24, 2013.
- SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein–polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.
- SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365–77, 2005.
- SEQUEIROS, R. C. P. **Aplicação De Novas Metodologias Analíticas No Estudo De Compostos Fenólicos Em Matrizes Alimentares**. 2009. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

- SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2ª Ed. São Paulo: Artliber, 2006, 240 p.
- SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental in Vivo Models of Candidiasis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018.
- SENA, R. M. M. **Efeitos da Terapia Fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por "Candida albicans"**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto De Pesquisas Energéticas E Nucleares - Autarquia Associada À Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- SHAH, J. C. et al. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.
- SHAZLY, G. A.; IBRAHIM, M. A.; BADRAN, M. M and ZOHEIR, K. M. A. Utilizing Pluronic F-127 and Gelucire 50/13 Solid Dispersions for Enhanced Skin Delivery of Flufenamic Acid. **Drug Development Research**, p. 1-9, 2012.
- SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R.; YALFANI, R. Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant candida glabrata isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **International Journal Of Gynecology & Obstetrics**, v. 114, n. 2, p.158-159, 12, 2011.
- SIDRIM J, ROCHA M. (2004). **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- SINGH, S.; SOBEL, J.D.; BHARGAVA, P.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Vaginitis due to Candida krusei: epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical Infectious Diseases**; v. 35, p. 1066– 70, 2002.
- SILVA, S. et al. Characterization of Candida parapsilosis infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. **European Journal Of Oral Sciences**, v. 117, p. 669–675, 2009a.
- SILVA, S. et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p.681-689, 2009b.
- SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. **Trends In Microbiology**, v. 19, n. 5, p.241-247, 2011.
- SILVA, S. et al. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p.288-305, 2012.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v. 369, n. 9577, p.1961-1971, 2007.
- SOBEL, J. D. et al. Treatment of vaginitis caused by Candida glabrata: use of topical boric acid and flucytosine. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, p. 1297–300, 2003.

- SOBEL, J. D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 203–1, 1998.
- SOBEL, J. D. et al. Treatment of complicated, *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, p. 363–9, 2001.
- SOUZA, A. C. O.; AMARAL, A. C. Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: improving efficacy, biodistribution and toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 336, 2017.
- SPAGNOL, C. M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. 2014. p. 146. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara-SP.
- STEHR, F. et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. **FEMS Yeast Research** v. 4, p. 401–8, 2004.
- STEVENSON, C. L.; BENNETT, D. B.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Pharmaceutical Liquid Crystals: The Relevance of Partially Ordered Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 9, p.1861-1880, 2005.
- STOJKOVIĆ, D. et al. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of The Science of Food And Agriculture**, v. 93, n. 13, p.3205-3208, 2013.
- TAI, A.; BIANCHINI, R.; JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 4, p.291-304, 2014.
- TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C.J.; KOGA-ITO, C.Y. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1420, 2015.
- THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p.1173-1182, 2011.
- TOBUDIC, S. et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p.199-204, 2011.
- TÓTH, R. et al. Different *Candida* parapsilosis clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. **Frontiers In Microbiology**, v. 6, p.1-11, 2015.
- UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. **Dissemination of IT for the Promotion of Materials Science, Liquid Crystals** – Disponível em:

<https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/liquid_crystals/printall.php>. Acessado em: 06 de outubro de 2017.

- VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J. P.E. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. **Archives of Biochemistry And Biophysics**, v. 501, n. 1, p.106-111, 2010.
- VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, 60:5–15, 2006.
- VICTORELLI, F. D. **Sistemas líquidos cristalinos a base de quitosana e Polietilenoimina para a administração cutânea de metronidazol**. 2016. p. 77. TCC (Graduação) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara –SP.
- WOODLEY, J. Bioadhesion. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p.77-84, 2001.
- VICTORELLI, F. D.; CALIXTO, G. M. F.; RAMOS, M. A. dos S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Metronidazole-Loaded Polyethyleneimine and Chitosan-Based Liquid Crystalline System for Treatment of Staphylococcal Skin Infections. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 227-237, 2018.
- YANO, J. et al. Epithelial Cell-Derived S100 Calcium-Binding Proteins as Key Mediators in the Hallmark Acute Neutrophil Response during Candida Vaginitis. **Infection And Immunity**, v. 78, n. 12, p.5126-5137, 2010.
- YANO, J.; FIDEL, P. L. Jr. Protocols for Vaginal Inoculation and Sample Collection in the Experimental Mouse Model of Candida vaginitis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p.1-7, 2011.
- YING, Y. et al. Fluconazole susceptibility of 3,056 clinical isolates of Candida species from 2005 to 2009 in a tertiary-care hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, p. 413–415, 2015.
- YUN CHANG, J. et al. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 1, p. 39-50, 2002.
- ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p.1051-1056, 2013.
- ZANG, L. et al. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on oxidation low-density lipoprotein cholesterol. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 279, p. C954–C960. 2000.
- ZHANG, X. et al. **Supramolecular Amphiphiles: Monographs in Supramolecular Chemistry**. Cambridge: Royal Society Of Chemistry, 2017. 180 p.

- ZARNOWSKI, R. et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**; 5. e01333 - 14, 2014.
- ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p.133-145, 2009.
- ZHAO, J, WANG, Z.N.; WEI, X.L., LIU, F.; ZHOU, W.; TANG, X.L.; et al. Phase behaviour and rheological properties of the lamellar liquid crystals formed in dodecyl polyoxyethylene polyoxypropylene ether/water system. **NISCAIR**. 50(5):641–9, 2011.
- ZHU, S. et al. Interaction of the Acid Soap of Triethanolamine Stearate and Stearic Acid with Water. **The Journal Of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 5, p.1016-1024, 2007.
- ŽILIUS, M.; RAMANAUSKIENĖ, K.; BRIEDIS, V. Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin In Vitro. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-7, 2013.