



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO  
PARASITO-HOSPEDEIRO**

**JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA**

---

**Fluconazol e Própolis Co-encapsulados em Nanopartículas  
Mucoadesivas para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal**

---

**Goiânia  
2020**



**UFG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

### **E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### **1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação       Tese

#### **2. Nome completo do autor**

**Jacqueline Teixeira Da Silva**

#### **3. Título do trabalho**

**Fluconazol e Própolis Co-encapsulados em Nanopartículas Mucoadesivas para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal**

#### **4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2020, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA, Discente**, em 29/06/2020, às 23:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1408573** e o código CRC **123B5COA**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.012781/2020-17

SEI nº 1408573

**JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA**

---

**Fluconazol e Própolis Co-encapsulados em Nanopartículas  
Mucoadesivas para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral  
Co-orientadora: Profª. Dra. Suzana Ferreira Alves

**Goiânia  
2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Teixeira da Silva, Jacqueline  
Fluconazol e Própolis Co-encapsulados em Nanopartículas Mucoadesivas para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal [manuscrito] / Jacqueline Teixeira da Silva. - 2020.  
C, 100 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêia Amaral; co-orientadora Dra. Suzana Ferreira Alves.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2020.  
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Candida; . 2. Fluconazol; . 3. Bioproduto; . 4. Nanotecnologia; .  
5. Co-encapsulação.. I. Corrêia Amaral, André , orient. II. Título.

CDU 582.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA** - Aos três dias do mês de abril do ano de 2020 (03/04/2020), às 09:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ANDRÉ CORRÊA AMARAL (IPTSP/UFG), CAROLINA RODRIGUES DA COSTA (IPTSP/UFG) E MARISTELA PEREIRA (ICB/UFG) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Fluconazol e Própolis Co-encapsulados em Nanopartículas Mucoadesivas para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal**", em nível de MESTRADO, de autoria de JACQUELINE TEIXEIRA DA SILVA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ANDRÉ CORRÊA AMARAL, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. André Corrêa Amaral	_____
Profª. Dra. Carolina Rodrigues da Costa	_____
Profª. Dra. Maristela Pereira	_____

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **HABILITADA, (Habilitada ou não Habilitada)**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h\_11min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Rodrigues Costa, Professor do Magistério Superior**, em 03/04/2020, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em

[https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=anvore\\_visualizar&id\\_documento=1351548&infra\\_sistema=1000...](https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=anvore_visualizar&id_documento=1351548&infra_sistema=1000...) 1/2



03/04/2020, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 03/04/2020, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1254655** e o código CRC **40EF12C1**.

**Referência:** Processo nº 23070.012781/2020-17

SEI nº 1254655

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da  
Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a): Jacqueline Teixeira da Silva**

---

**Orientador (a): Prof. Dr. André Corrêa Amaral**

---

**Co-orientador (a): Profa. Dra. Suzana Ferreira Alves**

---

**Membros:**

**1. Profa. Dra. Carolina Rodrigues da Costa**

**2. Profa. Dra. Maristela Pereira**

**3. Prof. Dr. André Corrêa Amaral**

**Data: 03/04/2020**

*Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Carlos e Heloisa, que sempre incentivaram e acreditaram em mim. Por me estimular a seguir em busca de meus sonhos e a nunca desistir.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho e me proporcionar momentos de felicidade e tranquilidade em meio às dificuldades cotidianas. Por sempre me guiar e cuidar, cruzando meu caminho com pessoas que foram fundamentais na construção do meu caráter e personalidade. Pela fé e resiliência no decorrer do meu trajeto.

Agradeço ao meu pai, Luiz Carlos, minha mãe, Heloisa, minha irmã Janaina, e meu sobrinho Luiz Otávio, por todas as vezes que me incentivaram a persistir, independente dos resultados, e a seguir em busca de meus sonhos superando juntos qualquer desafio que por ventura surgisse em meu caminho. Agradeço pelo colo, pela atenção, compreensão e ombro amigo em todos os momentos que precisei. Ao meu noivo Alex, agradeço pelo seu companheirismo, pelo ombro amigo, por se dedicar a mim nos dias cansativos e sem sucesso, pela sua ajuda nas horas de desespero e por seu tempo, sempre disponível em me ouvir. Agradeço ao Saimon, meu companheiro de noites em claro, por sempre estar ao meu lado com seu amor e carinho, independente do meu humor. Aos meus sogros Sandra e Sávio por sempre elevarem minha autoestima, me ouvirem e me estimular com as palavras que eram extremamente necessárias no momento.

Agradeço aos meus amigos Paulo Henrique, Adelaide, Ariadne, Raquel, Maicon, Fernando e Matheus pela ajuda, quer seja nos ensaios, na companhia, no ombro amigo, na preocupação, no cuidado, nos finais de semana e feriados que me acompanharam, agradeço por sempre estarem disponíveis e por terem sido tão prestativos.

Agradeço ao meu professor e orientador André, que mesmo sem conhecer minha trajetória me deu a oportunidade de crescer junto ao seu laboratório, abriu as portas para que eu pudesse assim realizar meu tão sonhado mestrado. Por me ajudar, por me ouvir, por ter sido amigo e professor nas horas necessárias.

Agradeço a minha co-orientadora Suzana, por me auxiliar, por seu carinho, pela sua ajuda nos dias difíceis, pela sua educação e respeito em cada forma de ensinar.

Agradeço a todos os integrantes do LANAB, principalmente a nossa técnica Viviane, que compartilhou e compartilha de todas as nossas dificuldades, e agradeço pelo ombro amigo de todas as vezes que precisei.

Agradeço ao laboratório LPPN, principalmente ao professor José Realino e ao seu aluno Matheus, por me acolher, por me ensinar e ajudar quando outras portas estavam fechadas.

Agradeço à professora Liliana, e sua aluna Angélica, por sempre estarem disponíveis a ensinar, por todas as vezes que me ajudou, por terem sido tão acolhedoras.

Agradeço ao senhor Flávio Pellegrini pela doação da própolis utilizada no trabalho, por sua confiança e segurança depositada em mim e no LANAB.

Agradeço ao professor José Daniel e todos os seus alunos, por nos acolher em seu laboratório.

Agradeço ao laboratório FARMATEC, LABMIC e CRTI pelo auxílio com serviços prestados, aos técnicos do IPTSP e UFG por terem contribuído de alguma forma.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todas as pessoas que tenham contribuído direta ou indiretamente para a construção desse trabalho, pois sem a ajuda de todos vocês eu não teria conseguido executar 1% do trabalho que foi concluído.

O meu sincero muito obrigada!

## SUMÁRIO

---

---

<b>1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>1</b>
1.1. CVV	3
1.2. <i>Candida albicans</i>	5
1.3. Resposta Imunológica na CVV	8
1.4. Tratamento para a CVV	10
1.4.1. Fluconazol	11
1.5. Bioprodutos de Derivados Vegetais	13
1.5.1. Própolis verde	13
1.6. Nanobiotecnologia	15
1.6.1. Quitosana	16
1.6.2. Nanopartículas Poliméricas	17
1.6.3. Nanopartículas e o Epitélio Vaginal	19
1.7. Suscetibilidade e Toxicidade das Nanopartículas Poliméricas	20
1.7.1. Concentração Inibitória Mínima	21
1.7.2. Teste de Toxicidade por Hemólise e Utilização de <i>Galleria mellonella</i>	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1. Ensaio de Atividade Antifúngica <i>In Vitro</i>	25
4.1.1. Micro-organismo e Condições de Crescimento	25
4.1.2. Obtenção do Inóculo	25
4.1.3. Teste de Suscetibilidade <i>In Vitro</i> do Fluconazol	25
4.1.4. Determinação do Efeito do Extrato de Própolis sobre o Fungo <i>C. albicans</i>	26
4.1.5. Teste de Sinergismo do Fluconazol e Extrato de Própolis verde	26
4.1.6. Teste de Suscetibilidade <i>In Vitro</i> das Nanopartículas no Fungo <i>C. albicans</i>	27
4.1.7. Teste Fungicida/ Fungistático dos Compostos	27
4.2. Preparo das Nanopartículas	27
4.2.1. Nanopartículas Co-encapsuladas (NCO)	27
4.3. Preparo das Nanopartículas Vazias (NV)	28
4.4. Caracterização das Nanopartículas	28
4.4.1. Diâmetro, PDI e Potencial Zeta	28
4.4.2. Morfologia das Nanopartículas	29
4.5. Eficiência de Associação dos Compostos na Nanopartícula	29
4.5.1. Análise Espectrofotométrica UV-Visível e Linearidade	29
4.5.2. Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação do Fluconazol e Própolis verde por CLAE	30

4.5.3. Eficiência de Encapsulação das Nanopartículas	34
<b>4.6. Teste de Liberação <i>In Vitro</i></b>	<b>34</b>
<b>4.7. Análise de Citotoxicidade</b>	<b>35</b>
4.7.1. Teste de Hemólise	35
4.7.2. Teste de Citotoxicidade usando como modelo <i>Galleria mellonella</i>	35
<b>4.8. Teste <i>In Vivo</i> em modelo Murino</b>	<b>36</b>
4.8.1. Análise de Carga Fúngica	37
4.8.2. Análise Histopatológica	37
<b>4.9. Análise Estatística</b>	<b>38</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>5.1. Ensaio de Atividade Antifúngica <i>In Vitro</i></b>	<b>39</b>
5.1.1. Teste de Suscetibilidade do Fluconazol, determinação do Efeito do Extrato de Própolis verde e Suscetibilidade de Nanopartículas no Fungo <i>Candida albicans</i>	39
<b>5.2. Caracterização das Nanopartículas</b>	<b>40</b>
<b>5.3. Morfologia das Nanopartículas Determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b>	<b>43</b>
<b>5.4. Determinação do Comprimento de Onda de Máxima Absorção para o Fluconazol e Própolis verde por Espectrofotometria UV-Vis</b>	<b>44</b>
5.4.1. Varredura Espectrofotométrica UV-Vis do Fluconazol	44
5.4.2. Varredura Espectrofotométrica UV-Vis do Extrato de Própolis verde	44
<b>5.5. Eficiência de Associação</b>	<b>45</b>
5.5.1. Curva de Linearidade por Espectrofotômetro UV-Vis	46
5.5.2. Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação do Fluconazol por CLAE 48	
<b>5.6. Teste de Liberação <i>In Vitro</i></b>	<b>56</b>
<b>5.7. Análise de Citotoxicidade</b>	<b>57</b>
5.7.1. Teste de Hemólise	57
5.7.2. Teste de Citotoxicidade usando como modelo <i>Galleria mellonella</i>	59
<b>5.8. Teste <i>In Vivo</i> em modelo Murino</b>	<b>61</b>
5.8.1. Análise de Carga Fúngica	61
5.8.2. Análise Histopatológica	62
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>72</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 2 – Publicação de Capítulo de Livro</b>	<b>80</b>

## FIGURAS, QUADROS, TABELAS E ANEXOS

---

<b>Figura 1</b> Morfologia de <i>Candida albicans</i> : Leveduras, Hifas e Pseudo-hifa. _____	6
<b>Figura 2</b> Estrutura Química do Fluconazol (MM: 306,27 Da). Fonte: Farmacopeia Brasileira, 6º Edição, 2019 _____	12
<b>Figura 3</b> Esquematização do Preparo de Nanopartículas. Fonte: Banco de imagens (thenounsproject.com). _____	28
<b>Figura 4</b> Diluição do padrão de Quercetina para construção da curva de linearidade padrão. _____	30
<b>Figura 5</b> Dispersão de Nanopartículas após preparo na proporção 2:1. NV e NCO. _____	42
<b>Figura 6</b> Fotomicrografias obtidas por MEV das NV e NCO _____	43
<b>Figura 7</b> Espectro de absorção em espectrofotometria UV Vis de uma solução de Fluconazol na concentração de 20 µg/mL diluído em metanol e água na proporção 1:1 _____	44
<b>Figura 8</b> Espectro de absorção em espectrofotometria UV Vis de uma solução de própolis verde na concentração de 50 µg/mL diluído em metanol. _____	45
<b>Figura 9</b> Perfis cromatográficos 2D a 261nm da própolis verde, Fluconazol e sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada _____	46
<b>Figura 10</b> Curva Analítica do Fluconazol em µg/mL. Equação 6: $y = 0,005x + 0,005$ . $R^2 = 0,998$ . _____	47
<b>Figura 11</b> Curva Analítica da Própolis verde em µg/mL. Equação 7: $y = 0,008x - 0,037$ . $R^2 = 0,990$ . _____	47
<b>Figura 12</b> Curva Analítica do Padrão de Quercetina em µg/mL. Equação 7: $y = 0,0767x - 0,0036$ . $R^2 = 0,996$ . _____	48
<b>Figura 13</b> Espectro de absorção máxima do fluconazol na nanopartícula (233,5nm). _____	49
<b>Figura 14</b> Perfis cromatográficos 2D a 261nm do padrão e da amostra _____	49
<b>Figura 15</b> Perfil cromatográfico 2D a 261nm do padrão de Fluconazol sobreposto ao cromatograma da nanopartícula co-encapsulada. _____	50
<b>Figura 16</b> Perfil cromatográfico 2D a 261nm do padrão de Fluconazol sobreposto ao cromatograma da NCO, e cromatograma do extrato de Própolis verde. _____	50
<b>Figura 17</b> Perfil cromatográfico 2D a 261nm do diluente Metanol e Água. _____	51
<b>Figura 18</b> Perfil cromatográfico 2D a 261nm do diluente Sobrenadante da NV. _____	51
<b>Figura 19</b> Curva de Linearidade do Padrão Fluconazol em µg/mL no CLAE. Equação 8: $y = 2276,7x - 197,72$ . $R^2 = 0,99912$ _____	51
<b>Figura 20</b> Gráfico do Teste de Paralelismo _____	56
<b>Figura 21</b> Placa de 96 poços do ensaio de hemólise após centrifugação da placa em V. _____	58

<b>Figura 22</b> Gráfico do Ensaio de Hemólise. _____	59
<b>Figura 23</b> Gráfico do Ensaio de Toxicidade por <i>Galleria mellonella</i> _____	60
<b>Figura 24</b> Larvas de <i>Galleria mellonella</i> _____	60
<b>Figura 25</b> Ensaio de Análise de Carga Fúngica _____	61
<b>Figura 26</b> Ensaio de Histopatológico de Tecido Vaginal _____	63
<b>Tabela 1</b> - Suscetibilidade antifúngica e efeito fungistático/fungicida _____	39
<b>Tabela 2</b> - Proporções das Soluções de Quitosana e TPP para Análise de Formação das Nanopartículas de Extrato de Própolis verde _____	41
<b>Tabela 3</b> - Proporções das Soluções de Quitosana e TPP para Análise de Formação das Nanopartículas de Fluconazol _____	41
<b>Tabela 4</b> - Valor correspondente ao Tamanho, PDI, Potencial Zeta e Eficiência de Associação da NV e NCOdos Compostos na Proporção escolhida de 2:1 de Quitosana e TPP, respectivamente. _____	42
<b>Tabela 5</b> - Condições de separação para o parâmetro de conformidade do sistema _____	48
<b>Tabela 6</b> - Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de repetibilidade _____	52
<b>Tabela 7</b> - Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de precisão intermediária _____	53
<b>Tabela 8</b> - Avaliação do parâmetro robustez considerando variação de fluxo da fase móvel, temperatura e coluna em relação ao método original desenvolvido. _____	54
<b>Tabela 9</b> - Valores referentes ao Parâmetro de Exatidão pelo Método de Recuperação do Padrão de Fluconazol _____	55
<b>Quadro 1</b> - Condições Cromatográficas Testadas para o Desenvolvimento do Método de Análise em CLAE para Quantificação de Fluconazol de Propolis Verde _____	31
<b>Quadro 2</b> - Parâmetros de Conformidade do Sistema Cromatográfico _____	31
<b>Anexo 1</b> – Parecer do Comitê de Ética, TCLE _____	Erro! Indicador não definido.
<b>Anexo 2</b> – Publicação de Capítulo de Livro _____	Erro! Indicador não definido.

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

ASC	Area Sobre a Curva
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O	Fórmula Molecular do Fluconazol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CVV	CVV
CVVR	CVV Recorrente
CYP51	Enzima Esterol 14 $\alpha$ -desmetilase
DAD	Detector Diode Array
DLS	Dispersão Dinâmica da Luz
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgE	Imunoglobulina E
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
INF $\gamma$	Interferon Gama
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Milli-Q	Sistema de Purificação de Água
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógeno (do Inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> )

PDI	Índice de Polidispersão
PRRs <i>Receptor</i> )	Receptores de Reconhecimento de Padrões (do Inglês <i>Pattern Recognition</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute meio</i>
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do Inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
TCD4 <i>differentiation 4</i> )	Grupamento de Diferenciação 4 de células T (do Inglês <i>T cells cluster of</i>
TH17	Linfócitos T <i>helper 17</i>
TPP	Tripolifosfato de Sódio

## RESUMO

---

A CVV (CVV) é a segunda infecção mais comum em mulheres em idade fértil, sendo que em 70 a 90% dos casos, o agente etiológico associado é *Candida albicans*. O aumento da incidência de espécies não-*albicans*, tem levado ao aparecimento de casos de resistência aos antifúngicos, por isso a importância de novas abordagens no tratamento. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e testar *in vivo* um sistema nanoestruturado contendo fluconazol e própolis verde para o tratamento de CVV. As nanopartículas contendo fluconazol e própolis verde foram preparadas seguindo a técnica de gelificação iônica e apresentaram características físicas satisfatórias para a finalidade pretendida. A eficiência de associação para os compostos complexados foi realizada utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrofotometria UV. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para o Fluconazol, Própolis verde e nanopartículas foram investigadas, apresentando eficácia como ação fungistática sobre *C. albicans* ATCC 10231. Análises de liberação de até 72 horas com estabilização até 96 horas foram verificadas nas nanopartículas. Os ensaios de toxicidade em hemácias e em *Galleria mellonella* demonstraram resultados positivos para a própolis e negativas para as nanopartículas, sugerindo segurança para o seu uso no modelo murino para a CVV. Ensaios *in vivo* foram realizados com indicação de eficácia para a formulação proposta.

**Palavras-chave:** Candida; Fluconazol; Bioproduto; Nanotecnologia; Co-encapsulação.

## ABSTRACT

---

Vulvovaginal Candidiasis is the second most common infection in women of childbearing age, in about 70 to 90% of cases; the associated etiologic agent is *C. albicans*. The increase in the incidence of non-albicans species has led to the emergence of cases of resistance to antifungals, which is why the importance of new approaches in treatment. The objective of the present work was to develop and test *in vivo* a nanostructured system containing fluconazole and Green Propolis for the treatment of Vulvovaginal Candidiasis. The nanoparticles containing Fluconazole and Green Propolis were prepared following the technique of ionic gelation and presented satisfactory physical characteristics for the intended purpose. The association efficiency for the complexed compounds was performed using the technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and UV spectrophotometry. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for Fluconazole, Green Propolis and nanoparticles were determined, showing efficacy for use and fungistatic action on *C. albicans* ATCC 10231. Release analyzes of up to 72 hours with stabilization up to 96 hours were verified in the nanoparticles. The toxicity tests by hemolysis and *Galleria mellonella*, demonstrated positive results for propolis and negative for nanoparticles, suggesting safety in their use in a method with a murine model. *In vivo* tests were performed with an indication of efficacy for the proposed formulation.

**Keywords:** Candida; Fluconazole; Bioproduct; Nanotechnology; Co-encapsulation.

# 1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA

---

As infecções fúngicas são consideradas como um importante problema de saúde pública e suas manifestações clínicas apresentam-se mais agressivas nos pacientes imunocomprometidos. Nestes, é aumentado o risco de infecções sistêmicas graves, e devido a incidência elevada da doença nas últimas décadas, têm tendência crescente de novos casos (Moyes e Naglik, 2011; Ludwig *et al*; 2018). Fungos comensais comumente encontrados no homem têm causado morbidades e gerado altos custos anuais em saúde, sendo reconhecidos como um desafio socioeconômico mundial (Moyes e Naglik, 2011, Naglik *et al*; 2011, Ludwig *et al*; 2018). Dentre os micro-organismos que vivem como comensal em humanos, os fungos pertencentes ao gênero *Candida*, podem causar infecções invasivas, sendo a espécie *Candida albicans* um importante causador de micoses profundas e infecções de mucosas como na CVV (CVV) (Zida *et al*; 2017).

A CVV é uma infecção fúngica causada por fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie prevalente (Sherry *et al*; 2017), mas que pode também ser causada por espécies não-*albicans*. O uso inapropriado de antifúngicos tem levado ao aumento de resistência dos micro-organismos, com novas espécies não-*albicans* sendo identificadas (Dota *et al*; 2011). Esta infecção é comum em todo o mundo, sendo um problema de nível global que afeta cerca de 70 a 75% de mulheres em idade fértil, e ainda que avanços nas terapias e tratamentos tenham reduzido muitos casos de doenças fúngicas, a probabilidade de recorrência ocorre em 40 a 50% dos casos (Rodríguez-Cerdeira *et al*; 2019) sendo que 138 milhões de mulheres apresentam quatro ou mais episódios de infecções anuais (Sherry *et al*; 2017).

*C. albicans* é um fungo comumente encontrado em seres humanos e apresenta morbidade aproximada de 100 milhões em episódios de vaginites recorrentes, e é o quarto organismo causador de infecções nosocomiais do sangue, com mortalidade de 37 a 44% em pacientes imunocomprometidos (Han *et al*; 2011), com relatos de 250 a 400 mil mortes por ano em todo o mundo (Dantas *et al*; 2016). Fungos do gênero *Candida* são identificados na microscopia nas formas hifal e levedura, com capacidade de apresentar o dimorfismo, ou seja apresentar ambas as formas, o qual é considerado um importante fator de virulência do fungo (Whiteway e Bachewich; 2007).

Para garantir a sobrevivência e persistência fúngica dentro do organismo são necessários vários fatores para que haja o processo de infecção, dentre eles podemos citar a aderência fúngica na superfície epitelial, o qual representa o primeiro passo para a infecção, o

dimorfismo de levedura para hifa na presença de pH vaginal elevado, interrupção da microbiota vaginal e aumento de estrogênio e do número de hifas com expressão de fatores de virulência como candidalinas e aspartil proteínases segregadas (Naglik *et al*; 2011). A mistura de fatores fúngicos com os fatores do hospedeiro, tais como idade, uso de alguns medicamentos, atividade sexual, diabetes e causas idiopáticas estão relacionadas à causa de CVV (Rodríguez-Cerdeira *et al*; 2019). As defesas do hospedeiro são compostas de barreiras mecânicas à penetração, fatores antimicrobianos e mecanismos imunes celulares inatos e adaptativos e nos indica a importância nas pequenas alterações do estado fisiológico associado ao potencial de virulência do fungo no hospedeiro que pode levar a patologias debilitantes (Naglik *et al*; 2011).

A presença de fatores de risco pode predispor ou não a infecção (Gonçalves *et al*; 2016) e uma vez estabelecida a doença, o tratamento de infecções fúngicas deve ser realizado com os antifúngicos disponíveis (Wiederhold; 2018). Novas estratégias são fundamentais para a terapia contra doenças infecciosas e o desenvolvimento de novas formulações necessita de uma melhor caracterização dos fatores de virulência identificados e compreensão dos detalhes da interação entre patógeno e hospedeiro (Zipfel *et al*; 2007).

O aparecimento de casos resistentes a antifúngicos é uma questão problemática que enfrentamos no período atual, surgindo assim a necessidade de tratamentos e estratégias precisas e eficazes para combater as infecções fúngicas.

Pesquisas revelam a importância do sinergismo de constituintes ativos de compostos naturais e o seu sinergismo com os antifúngicos convencionais para evitar a resistência de micro-organismos (Zida *et al*; 2017, Ludwig *et al*; 2018). O uso de produtos naturais, tais como a própolis verde (substância produzida pelas abelhas), são vistos como alternativas aos casos de resistência, tendo essas substâncias um nível de segurança aceitável, baixo custo e que apresentam atividade imunestimulante, anti-inflamatória e antifúngica (Shokri *et al*; 2011).

Sistemas nanoestruturados para o transporte de fármacos, tais como os lipossomais, filmes mucoadesivos e esferas poliméricas, também têm sido propostos como uma alternativa promissora, atuando na melhora da biodisponibilidade, efeitos adversos e liberação dos fármacos no alvo de ação (Kelidari *et al*; 2017). Os sistemas nanoestruturados poliméricos são os mais comumente utilizados e com inúmeras aplicações, e apresentam vantagens no seu uso, como mucoadesividade e rápida liberação (Rowe *et al*; 2009).

Diante deste cenário surge a necessidade de desenvolvimento de novos antifúngicos (Bernardis *et al*; 2015, Zida *et al*; 2016). O ideal é aquele que apresenta amplo espectro,

conseguindo erradicar o fungo e prevenir infecções recorrentes, que não apresenta efeitos colaterais, de fácil administração, curto período de tratamento e baixo custo (Sekhavat *et al*; 2011).

### 1.1. CVV

A CVV é uma doença do trato genital feminino, comum em mulheres de idade fértil (Barousse *et al*; 2004), a qual afeta cerca de 75% de mulheres saudáveis, e destas, 40 a 50% poderão apresentar recidivas da doença (Dota *et al*; 2011, Sekhavat *et al*; 2011, Bernardis *et al*; 2015). A CVV é um problema de saúde pública, que afeta a qualidade de vida de milhares de mulheres (Bernardis *et al*; 2015). Embora essa doença não seja associada à mortalidade, tem um grau de morbidade alta, causando desconforto e dor, ansiedade, diminuição na atividade de trabalho, atrapalhando nas relações afetivas e sexuais e gerando altos custos econômicos direta e indiretamente (Gonçalves *et al*; 2016). Aproximadamente dois terços das mulheres em todo o mundo experimentaram pelo menos um episódio da doença durante toda a vida e alguns apresentaram episódios recorrentes (Dota *et al*; 2011, Nejat *et al*; 2016).

As informações epidemiológicas de CVV não estão disponíveis em dados atualizados por órgãos e por não ser uma doença de notificação compulsória as informações epidemiológicas são baseadas em estudos e pesquisas. É a segunda causa de vaginite, depois de vaginose bacteriana. Cerca de 10 a 15% das mulheres assintomáticas são colonizadas pelo fungo *C. albicans*. Estudos fornecem dados de incidência em mulheres da idade fértil até a menopausa, no qual a estimativa de mulheres assintomáticas com a doença foi de 12,1 a 57,3%, e uma alta incidência de CVV foi visualizada em mulheres de países africanos com 57,3%. Dados com baixa incidência foram publicados em países europeus (Gonçalves *et al*; 2016).

Espécies de *Candida* são identificadas em 70 a 90% dos casos, sendo *C. albicans* a principal espécie envolvida (Sekhavat *et al*; 2011, Zida *et al*; 2017), mas a incidência causada por espécies não-*albicans* tem aumentado consideravelmente (Nejat *et al*; 2016). Além de *C. albicans* temos *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* como espécies não-*albicans* envolvidas nesta doença (Gonçalves *et al*; 2016, Nejat *et al*; 2016). Normalmente, uma única espécie fúngica é detectada, mas outras espécies podem ser identificadas e estarem associadas na mesma infecção (Gonçalves *et al*; 2016). Pesquisas destacam que *C. albicans* e *C. glabrata* são as espécies mais comumente isoladas de pacientes com CVV (Nejat *et al*; 2016), e o uso inapropriado de antifúngicos por automedicação, erro

de diagnóstico e terapia prolongada pode selecionar as espécies não-*albicans*, que são mais resistentes que a espécie *C. albicans* (Gonçalves *et al*; 2016).

Na vagina o ambiente normal é altamente dinâmico com uma microbiota local de *Lactobacillus sp* que mantêm o pH na faixa de 4,0 a 5,0 e libera a produção de substâncias, como ácido lático, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, reduzindo o crescimento de microorganismos. Entretanto, um desequilíbrio no ambiente vaginal, pode permitir o crescimento excessivo de *Candida*, permitindo um sítio favorável ao desenvolvimento de CVV (Johal *et al*; 2014, Gonçalves *et al*; 2016).

Os elementos fundamentais a esse desenvolvimento são a excessiva colonização vaginal e a mudança da forma assintomática para sintomática (Johal *et al*; 2014). Vários fatores podem desencadear CVV como o uso de contraceptivos orais, instrumentos intrauterinos, terapia de reposição hormonal e fatores não hormonais como uso de antibióticos, imunossupressão, glicocorticoides, uso de ducha vaginal e espermicidas, gravidez, fase do ciclo menstrual, e diabetes não controlada; alguns hábitos sexuais, higiênicos e a vestimenta, também contribuem para alteração na microbiota vaginal (Barousse *et al*; 2004, Johal *et al*; 2014, Gonçalves *et al*; 2016).

Sinais de inflamação, com presença de infecção por *Candida* são sintomas clínicos de CVV, e por serem sintomas inespecíficos, podem estar associados com uma variedade de outras doenças vaginais como gonorreia, tricomoníase e vaginose bacteriana. Somente a presença de *Candida* na vagina não indica o desenvolvimento de CVV, uma vez que a vagina possui uma microbiota complexa que varia de acordo com o ciclo menstrual, a gravidez, uso de contraceptivos e relação sexual, além do que usualmente, a *Candida* atinge um pico de crescimento no período pré-menstrual (Johal *et al*; 2014).

Segundo estudos, uma colonização vaginal por *Candida* em pacientes sem nenhuma sintomatologia de CVV é de 11,6 a 17% (Gonçalves *et al*; 2015). A sintomatologia e queixas clínicas incluem a presença de prurido e queimação vaginal acompanhado de leucorreia, irritação, encontrando também edema e eritema vaginal e vulvar, fissuras e dor. E quando não tratada adequadamente, pode levar a complicações maiores como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, aborto espontâneo, distúrbios menstruais ou infertilidade (Johal *et al*; 2014, Gonçalves *et al*; 2015).

A CVV pode ser classificada em estágios graves e não graves. Em casos não graves, há queixas de ocorrência inferior a quatro episódios por ano em mulheres saudáveis, apresentando severidade baixa ou moderada, acompanhada de febre e infecção causada por *C. albicans*. Quando graves, a ocorrência de infecção é por espécies não-*albicans*, e em casos

mais complicados podem ocorrer com qualquer espécie de *Candida* (Gonçalves *et al*; 2015). Já na CVV Recorrente (CVVR), que é uma condição clínica mais grave, devido à recorrência dos sintomas e uma resistência ao tratamento, é considerado quando há ocorrência de quatro ou mais episódios por ano, onde as espécies não-*albicans* tem sido as mais isoladas dos pacientes (Bernardis *et al*; 2015, Gonçalves *et al*; 2015). Dados epidemiológicos indicam que a prevalência de CVVR pode chegar de 7 a 8% dos casos de ocorrência de primeiro episódio (Bernardis *et al*; 2015).

O diagnóstico é realizado pela associação de dados clínicos e laboratoriais (Gonçalves *et al*; 2016), realizados por meio de exame clínico da sintomatologia em consultório ginecológico, seguido de exame microscópico da secreção e cultura (Sekhvat *et al* 2011). Testes convencionais de identificação como o de fermentação e assimilação de carboidratos, que são capazes de distinguir *C. albicans* das outras espécies, sendo possível identificar espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Outro teste convencional é o teste Renould braund, realizado pela incubação em soro fetal bovino por 3 horas a 37 °C, que determina a habilidade da levedura em formar hifas verdadeiras ou tubos germinativos; produção de clamidósporos em ágar cornmeal acrescido de tween 80 (Sudbery *et al*; 2004, Brooks *et al*; 2014), esses dois últimos testes são capazes de distinguir *C. albicans* e *C. parapsilosis* não distintas pelo auxanograma (método para testar a assimilação de Carbono e Nitrogênio).

## **1.2. *Candida albicans***

*C. albicans* é um fungo pleomórfico, encontrado na forma comensal em humanos. Podendo ser isolado em cerca de 70% de pessoas saudáveis (Han *et al*; 2011, Dantas *et al*; 2016), é encontrado colonizando e persistindo em muitos locais de mucosa como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário (Bernardis *et al*; 2015).

Possui variações morfológicas (Whiteway & Bachewich 2007), e tem como característica a capacidade de rápida mudança no crescimento, podendo ser identificado quanto a diferentes morfologias (Figura 1), crescendo na forma de levedura oval com brotamento, em pseudo-hifas, e/ ou formando hifas verdadeiras (Brooks *et al*; 2014).

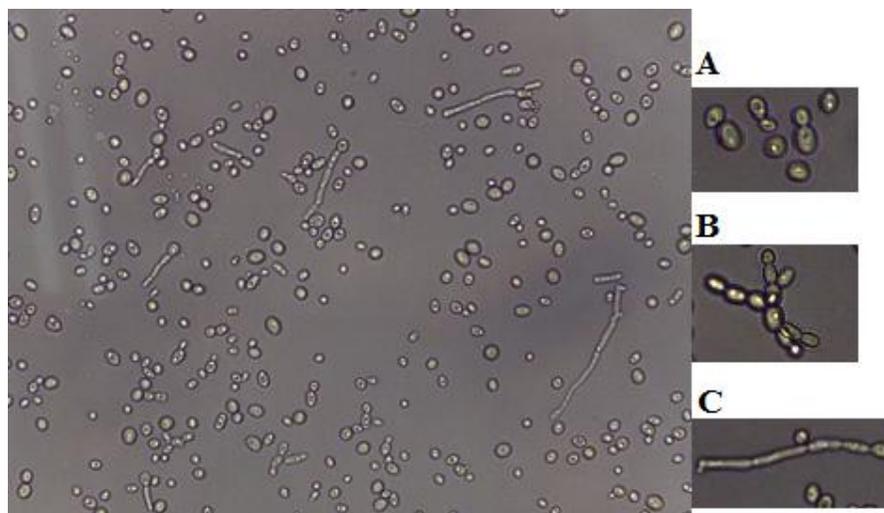


Figura 1 Morfologia de *Candida albicans*: Leveduras, Hifas e Pseudo-hifa.

Legenda: Imagens de microscopia óptica de amostra após 24 horas de cultura. A: Leveduras, B: Pseudo-hifas, C: Hifas

Na levedura, pode ser verificado micélio unicelular com ou sem brotamento, com crescimento isotrópico, células mães originando células filhas que se desassociam da célula de origem (Whiteway & Bachewich 2007). A forma filamentosa, como hifas verdadeiras, se desenvolve a partir de um blastósporo sem constrição na célula de origem e contém lados paralelos ao longo do seu comprimento. Ocorre um crescimento contínuo até a formação de um tubo alongado que separa as células através de septos, sendo um crescimento polarizado extremo na parte apical com sinais intrínsecos e extrínsecos que se combinam para determinar a forma e sua organização (Sudbery *et al*; 2004, Whiteway & Bachewich 2007, Han *et al*; 2011).

Essa forma filamentosa promove uma força mecânica, aumentando a colonização e invasão aos tecidos do hospedeiro e demonstra aumento na resistência à fagocitose (Gonçalves *et al*; 2015). Nas pseudo-hifas, as células de levedura modificam-se por crescimento polarizado e não se separam após o término de cada ciclo celular, se apresenta entre os dois extremos, há uma constrição na célula de origem, no centro e em cada junção septal subsequente variando em seu tamanho e largura podendo se assemelhar a hifas ou leveduras, apresentando tamanho mais largo no centro que nas extremidades (Sudbery *et al*; 2004).

O estado comensal do fungo é controlado por um conjunto especializado de interações entre o equilíbrio do: sistema imunológico, superfície de mucosas, microbiota e adaptações específicas do organismo, podendo residir assim em aproximadamente 50% dos

indivíduos, mas que pode se tornar um importante patógeno oportunista causador de morbidade e/ ou mortalidade (Moyes & Naglik 2011, Dantas *et al*; 2016) em casos de alterações no ambiente local, tratamento com antibióticos em longo prazo ou comprometimento das defesas imunológicas (Moyes & Naglik 2011, Naglik *et al*; 2011).

Esta espécie tem capacidade para ativar respostas em mucosas e adaptação a diversas mudanças e condições ambientais como disponibilidade de nutrientes, pH e níveis de CO<sub>2</sub>, com características de capacidade de adesão e remodelação da parede celular modificando sua sensibilidade a mudanças ambientais (Bernardis *et al*; 2015, Dantas *et al*; 2016). Mecanismos de agressão promovidos pelo fungo faz com que estes participem ativamente no processo patológico, em que a doença é mediada pelo número de fatores de virulência que o fungo detém, como formação de hifas, adesão, formação de biofilmes, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e mudanças fenotípicas (Gonçalves *et al*; 2015).

O pH é um fator importante na regulação de transição levedura-hifa. Uma transição branco-opaca é identificada como uma transição de morfologia celular, onde células de forma branca são ovoides, que caracterizam as leveduras de brotamento, com paredes lisas e formam colônias cremosas, já células de cor opaca, são formas alongadas com fossas e geram colônias achatadas e mais acinzentadas (Whiteway & Bachewich 2007). Em cultura crescem na forma de levedura oval com brotamento, formam pseudo-hifas quando os brotos continuam crescendo e não se desprendem formando cadeias celulares com constrição nos septos entre as células, e são capazes de formar hifas verdadeiras. Em culturas de 24 horas a 37 °C ou a temperatura ambiente formam colônias de cor creme e consistência mole com odor de levedo (Brooks *et al*; 2014).

As variações morfológicas ocorrem geralmente, a partir das condições ambientais em que o fungo está exposto, onde as hifas são induzidas a partir de leveduras com a adição de soro e temperatura de 37 °C, para a produção do tubo germinativo. Temperaturas acima de 35 °C e pH neutro também são capazes de induzir hifas e pseudo-hifas (Sudbery *et al*; 2004, Han *et al*; 2011). Os clamidósporos são formas distintas das formas proliferativas, e ambientes com baixo teor de luz, oxigênio, nutrientes e temperatura são os fatores de desenvolvimento desta forma de resistência (Whiteway & Bachewich; 2007).

Independentemente da característica morfológica apresentada, as leveduras e hifas tem a capacidade de aderir à superfícies de mucosas e disseminar pela corrente sanguínea, no entanto quando na forma filamentosa apresenta uma maior capacidade de invasão tecidual em relação a forma de levedura, pois hifas dificilmente são fagocitadas pelas células de defesa

(macrófagos e neutrófilos). Assim, as formas de levedura e filamentosa são consideradas como fatores de virulência do fungo (Han *et al*; 2011).

O fungo apresenta ambos blastoconídios e pseudohifas na sua fase comensal ou infectante, no entanto quando apresenta uma maior quantidade de hifas tem maior capacidade de invasão à célula do hospedeiro e evasão da fagocitose pelas células de defesa (Gonçalves *et al*; 2016, Zida *et al*; 2016). Assim, os fatores de virulência que desempenham infecções na mucosa são a aderência, dimorfismos com variações antigênicas, produção e enzimas com secreção de proteinases e composição da superfície celular, com especial atenção às adesinas, que facilitam a aderência ao tecido vaginal, e a formação de hifas que favorecem a implantação do fungo na mucosa, onde as hifas se aderem fortemente à superfície queratinizada do epitélio vaginal e se infiltram na camada sub-epitelial (Bernardis *et al*; 2015) causando dano às células epiteliais e liberação de alarminas (Verma *et al*; 2017). Cepas de *C. albicans* que não apresentam a capacidade de transição dimórfica não são patogênicas (Bernardis *et al*; 2015).

### **1.3. Resposta Imunológica na CVV**

A imunidade no trato genital feminino forma uma rede complexa de identificações de epítomos na tentativa de proteção contra agentes infecciosos e permanência e manutenção de micro-organismos comensais e partículas estranhas ao organismo, como os espermatozoides (Ensign *et al*; 2014). O sistema que permite esse equilíbrio na imunidade de mucosa para proteção contra o fungo ainda é pouco conhecido, no entanto a presença de imunidade celular com produção de células TCD4 é muito importante para evitar a proliferação do fungo (Bernardis *et al*; 2015).

A mucosa da vagina é diferente de outras, como a encontrada no trato respiratório e gastrointestinal, que contêm estruturas linfóides e células colunares simples unidas por junções íntegras. Na vagina o epitélio é formado por células escamosas e não apresentam as estruturas linfóides organizadas, atuando assim, como uma barreira aos patógenos (Ensign *et al*; 2014).

O epitélio é a primeira linha de defesa do organismo contra o fungo, e além do epitélio, o muco cervicovaginal atua como uma barreira na proteção contra infecções vaginais (Ensign *et al*; 2014). Padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como parte de uma resposta imune inata e pela ativação de diferentes vias de sinalização. A partir do reconhecimento do fungo

pelas células, inicia-se um perfil de resposta às células epiteliais infectadas, resultando no recrutamento, diferenciação e ativação de citocinas e quimiocinas de perfil pró-inflamatórias e uma variedade de células imunes como neutrófilos, células dendríticas e células T (Moyes & Naglik 2011, Naglik *et al*; 2011).

Células T, padrão Th17, secretora de IL-17 e IL-22, são associadas à imunidade anti-*Candida*. A IL-22 auxilia no controle de crescimento de células de levedura na integridade da camada epitelial durante a infecção, e a IL-17 atua sobre os neutrófilos e as células epiteliais, sendo uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. Os neutrófilos atuam na defesa do hospedeiro contra infecções por *C. albicans* e são as primeiras células a serem mobilizadas para o local da infecção, com capacidade de fagocitar partículas fúngicas em formas de levedura, mas não formas de hifas (Moyes & Naglik 2011).

Sua incapacidade de fagocitar hifas, desencadeia a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* - NETs), que compreendem uma teia de fibras de cromatina revestidas com serina proteases, proteínas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), e podem secretar peptídeos de defesa do hospedeiro (Verma *et al*; 2017). Estes auxiliam na manutenção da imunidade da mucosa, mas podem causar inflamações patológicas e podem ser responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas da CVV (Verma *et al*; 2017).

A proteção está mais associada à presença de anticorpos nos fluidos vaginais e aumento de linfócitos ativados na mucosa vaginal. Células TCD4+, e células dendríticas que induzem a proliferação de células T e liberação de altos níveis de IL-2, IFN $\gamma$  e IL-6 e baixos níveis de IL-10 (Bernardis *et al*; 2015). As respostas celulares têm a finalidade de promover o recrutamento de leucócitos e formação de peptídeos de defesa. Citocinas e quimiocinas são importantes na diferenciação de defesa contra fungos invasores e controle de infecções na superfície das mucosas (Moyes & Naglik 2011); dano e invasão são atividades específicas de infecção (Naglik *et al*; 2011). Durante um episódio de infecção, a proliferação fúngica e a ativação do sistema imunológico podem se traduzir em sinais clínicos da infecção. Tais sinais, juntamente com o ciclo de ativação imune (baseado em cargas fúngicas e formação de hifas) seguido de cura, podem representar o que ocorre em pacientes com infecção aguda por *C. albicans* (Naglik *et al*; 2011).

A utilização de nanopartículas de quitosana no epitélio vaginal pode auxiliar durante a ativação e expansão da imunidade celular e humoral, atuando no aumento de atividades imunoadjuvantes de citocinas e na capacidade de apresentação de antígeno celular. A quitosana pode apresentar um papel na indução de citocinas pró-inflamatórias e anti-

inflamatórias, como aumento de IL-12. Suas propriedades de viscosidade aumentam o tempo de retenção de formulações no local da infecção. Pesquisas utilizando quitosana demonstraram que durante o tratamento não houve o aparecimento de nenhum antígeno anti-quitosana ou IgE (Amidi et al. 2010).

#### **1.4. Tratamento para a CVV**

Os fármacos disponíveis para o tratamento da CVV são limitados (Zida *et al*; 2016), sendo que a administração de antifúngicos tópicos (cremes, géis, supositórios, loções, óvulos vaginais) ou orais são a escolha ideal (Johal *et al*; 2014, Gonçalves *et al*; 2015). Tais características estão envolvidas com praticidade e eficácia, colaborando para a prevenção de recidivas (Sekhavat *et al*; 2011).

O tratamento inicia-se a partir da queixa de sintomas, com o objetivo de impedir o crescimento desenfreado de *Candida*, diminuindo a sintomatologia (Johal *et al*; 2014). A utilização de fármacos de administração oral, com boa eficácia clínica e curto período de tratamento, é a forma escolhida por pacientes. Entretanto, as aplicações tópicas por não apresentarem efeitos colaterais graves, a preferência por formas mais fáceis de administrar e tempo curto de tratamento é a mais frequentemente solicitada (Sekhavat *et al*; 2011). Classes dos imidazóis (Miconazol, Cetoconazol, Nistatina), triazóis (Itraconazol, Fluconazol) e poliênicos, que são agentes tópicos e orais, e algumas formulações com anfotericina B foram os mais utilizados para o tratamento de CVV (Zida *et al*; 2016), assim como Clotrimazol, Econazol, Triconazol, Voriconazol e Isoconazol. Para as espécies não-*albicans* devem ser administrados antifúngicos não azólicos (Johal *et al*; 2014).

Cada classe de antifúngico apresenta um mecanismo de ação, variando desde atuação em parede e membrana celular, síntese de DNA e RNA. Os poliênicos e equinocandinas são classes naturalmente derivadas de micro-organismos. As equinocandinas atuam na inibição da biossíntese de 1,3- $\beta$ -D-glucana, promovendo a formação de uma parede celular defeituosa e instável com a consequente lise da levedura (Zida *et al*; 2016).

Os fármacos que atuam na membrana celular são poliênicos (Anfotericina B, Nistatina) e os azólicos (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol). Os poliênicos se ligam ao ergosterol presente na membrana e altera a permeabilidade da célula, formando poros. Já os azólicos agem no metabolismo do fungo, inibindo a enzima esterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51) (Liu & Kohler 2015).

Existe uma preocupação na administração de quimioprofiláticos que possam induzir a casos de resistência às infecções por *C. albicans*, mudança no espectro de ação dos antifúngicos sobre as espécies causadoras da doença e aumentar a incidência de cepas não-*albicans* (Bernardis *et al*; 2015, Zida *et al*; 2016). Com o aumento na taxa de infecções fúngicas, casos de resistência são gerados, e questões importantes como suscetibilidade, toxicidade e resistência devem ser levados em consideração para a escolha do tratamento (Ludwig *et al*; 2018). Em comparação à *C. albicans*, as espécies não-*albicans* estão mais associadas à resistência aos azóis, apresentando baixa suscetibilidade e uma alta resistência aos fármacos desta classe (Gonçalves *et al*; 2015).

A terapia de manutenção de longo prazo com os antifúngicos tem auxiliado para prolongar o período assintomático entre as recorrências, mas não fornecem a cura para a doença (Bernardis *et al*; 2015). Os antifúngicos disponíveis são eficazes no tratamento de sintomatologia individual, mas não atuam na prevenção de casos recorrentes (Bernardis *et al*; 2015).

Alguns antifúngicos convencionais apresentam desvantagens na forma de administração, como no caso de géis e pomadas, e são medicamentos desconfortáveis, apresentando baixa eficácia devido às perdas do produto, tanto de volume como baixa uniformidade, durante a sua aplicação tópica. Ocorre uma baixa retenção no epitélio vaginal, baixa adesão ao paciente, necessidade de frequente administração, aumento no tempo da terapia, baixa biodisponibilidade e padrão de liberação inadequado (Johal *et al*; 2014).

#### **1.4.1. Fluconazol**

O fluconazol é um antifúngico, pertencente à classe dos azóis, e é um agente bis-triazólico muito utilizado no tratamento da CVV devido à sua eficácia contra infecções fúngicas. Tem capacidade fungistática em 72 a 96 horas em administração oral, atua na inibição da síntese do ergosterol. Apresenta boa polaridade e ligações reduzidas às proteínas que são resultantes da substituição do anel triazólico para o anel imidazólico (Galgiani 1990, Grant & Clissold 1990, Sekhvat *et al*; 2011).

A fórmula química do fármaco é  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$  (Figura 2), com aspecto físico em pó, de coloração branca, sem cheiro, baixa solubilidade em água e solúvel em metanol, etanol e acetona (USP 2017, Farmacopeia Brasileira 5ª Edição).

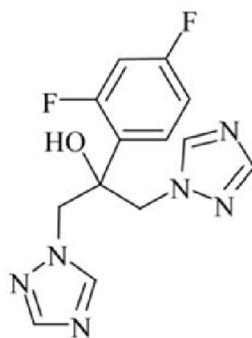


Figura 2 Estrutura Química do Fluconazol (MM: 306,27 Da). Fonte: Farmacopeia Brasileira, 6ª Edição, 2019

O mecanismo de ação do Fluconazol envolve a inibição da enzima desmetilase, envolvida na síntese do ergosterol mediada pelo citocromo P450 (Galgiani 1990, Sekhvat *et al*; 2011). A esterol 14 $\alpha$ -desmetilase é uma enzima que pertence à família do citocromo P450, que é responsável por realizar a desmetilação oxidativa de esteróis intermediários através do grupamento heme, tendo uma importância na biossíntese do ergosterol, que é um requisito para viabilidade das células fúngicas (Ji *et al*; 2000).

O nitrogênio do fármaco se liga ao ferro presente no citocromo e impede a ação da enzima de converter o lanosterol em ergosterol, ou seja, os azóis interagem com o átomo de ferro do grupamento heme da enzima, impedindo a ligação do sítio alvo com o substrato natural, e assim ocorre a inibição da enzima. No Fluconazol, o núcleo triazol se liga de forma mais eficaz com o átomo de ferro da enzima, e assim é mais específico e seletivo na inibição da enzima CYP51. O Fluconazol tem um bom perfil de segurança, é biodisponível, eficaz e hidrossolúvel (Ji *et al*; 2000; Lepesheva *et al*; 2007).

O fluconazol é um antifúngico muito utilizado nas infecções fúngicas, no entanto em sua administração oral não há como prever sua absorção durante a passagem pelo organismo devido a variações fisiológicas e seu metabolismo hepático, e sua absorção pode ser afetada por interferentes na passagem pelo trato gastrointestinal. Embora muito utilizado, há efeitos indesejáveis que são acarretados pelo seu uso como vômitos, náuseas e desconforto abdominal. Atualmente, não existem fórmulas de administração tópica para este fármaco, devido às diferenças entre solubilidade do fármaco e o ambiente vaginal. O Fluconazol tem propriedade hidrossolúvel e ao interagir com o tecido vaginal, com características lipofílicas, teria sua absorção prejudicada em função de não conseguir penetrar em concentrações ativas no tecido (Aulton & Taylor 2016).

O Fluconazol tem amplo espectro de ação contra leveduras patogênicas (*Candida spp*, *Cryptococcus sp*, *Paracoccidioidis*). Por sua característica de ser fungistático, não

prejudica a capacidade de células imunes do hospedeiro para interagir e eliminar células fúngicas (Grant & Clissold 1990). A absorção do Fluconazol é rápida, sendo completada dentro de 2 horas, com absorção mais consistente. Sua excreção é por via renal com meia vida de aproximadamente 30 horas no soro (Galgiani 1990).

### **1.5. Bioprodutos de Derivados Vegetais**

As buscas por medicamentos e terapias de origem natural surgiram em resposta ao elevado número de casos de efeitos colaterais indesejados e, principalmente, ao surgimento de micro-organismos resistentes. O interesse em produtos naturais vem aumentando na esperança de que possam reduzir a produção de um ou mais fatores de virulência e tolerância aos fármacos em doses baixas, atenuando assim a patogenicidade dos micro-organismos (Haghdoost *et al*; 2015).

Os compostos naturais são uma fonte inesgotável de ativos antimicrobianos (Gucwa *et al*; 2018). O número elevado de infecções por micro-organismos resistentes às pequenas opções de fármacos, unidos à toxicidade terapêutica, e eficácia limitada tem indicado a importância no uso de produtos de origem natural. Estes produtos apresentam ações bioativas, forçando assim um maior estudo de desenvolvimento de novos fármacos para tratamentos alternativos com capacidade de inibir a virulência microbiana, aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade (Tobaldini-Valerio *et al*; 2016).

Substâncias bioativas podem ser fontes de compostos com atividade antifúngica de acordo com o mecanismo de ação ao atingir a síntese de componentes da parede celular, síntese de esfingolípideos e proteínas, sugerindo assim uma triagem nos produtos naturais (Zida *et al*; 2016). Estes podem ser usados sozinhos ou como terapias adjuvantes para demonstrar um efeito sinérgico juntamente com outros medicamentos (Khameneh *et al*; 2016).

#### **1.5.1. Própolis verde**

A própolis é formada por um conjunto de substâncias coletadas de plantas, tais como néctar e pólen, pelas abelhas, principalmente da espécie *Apis mellifera* (Martinotti & Ranzato 2015, Tobaldini-Valerio *et al*; 2016), formando um produto resinoso (Figura 3) a partir de uma mistura de cera e enzimas salivares ( $\beta$ -Glicosidase) destes insetos (Silva-Carvalho *et al*; 2015). Essa substância contém flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres sesquiterpênicos, quininas, cumarinas, esteróis, amino ácidos, açúcares e proteínas (Yang *et al*; 2010).

Este composto é utilizado pelas abelhas como material de revestimento interno das paredes ou cavidades de habitação, para reparar danos, como isolante térmico e proteção da colmeia contra predadores, micro-organismos ou ações da natureza e o mesmo tem característica biocompatível e biodegradável (Ghisalberti, 1979, Martinotti & Ranzato 2015, Silva-Carvalho *et al*; 2015, Freires *et al*; 2016).



Figura 3 Amostras de Própolis verde. A Amostra recém-colhida da colmeia; B Extrato Alcólico de Própolis verde

A própolis pode ser encontrada em diversos locais, e suas propriedades podem ser diferentes a depender da região geográfica, vegetação, tempo de produção, variações de temperatura, clima, solo, espécie de abelhas, tipo de arborização e vegetação, influenciando em variações de aroma e cor (de verde a marrom ou avermelhada). Cada região de produção da própolis demonstra uma característica particular de composição, mas no geral é composta por 50% de resina balsâmica, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (Martinotti & Ranzato 2015, Silva-Carvalho *et al*; 2015).

A própolis se apresenta de formas variadas quando aplicada em diferentes temperaturas, sendo pegajosa, macia e maleável em altas temperaturas, e podendo chegar a um estado líquido quando a 60 °C, 70 °C ou 100 °C, e sólido, quebradiço quando em temperaturas baixas de resfriamento (Martinotti & Ranzato 2015, Silva-Carvalho *et al*; 2015).

Seu uso terapêutico deve ser a partir de soluções de extrato etanólico, porção em que são encontradas as propriedades biológicas (Lima *et al*; 2018). Outro desafio é quanto à preparação e uso da substância, estas devem ser avaliadas devido à sua composição heterogênea, suas características e atividades biológicas dependerão muito da região e ambiente de origem (Imhof *et al*; 2005).

O uso da própolis pelo homem é datado desde a antiguidade, sendo usada desde a manutenção da saúde à preservação de alimentos. Tem sido usada em produtos farmacêuticos,

alimentícios, cosméticos como cremes faciais e corporais, e como formulações de higiene oral (Silva-Carvalho *et al*; 2015).

O uso como ativo terapêutico tem aumentado devido ao amplo espectro biológico e propriedades farmacológicas e se estende em ação antisséptica, antimicrobiana, adstringente, anestésica, espasmolítica, antioxidante, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória, anticancerígena, imunomoduladora e imunoestimuladora (Rassu *et al*; 2015; Silva-Carvalho *et al*; 2015; Nascimento *et al*; 2016; 60, Tobaldini-Valerio *et al*; 2016). Atua favorecendo a re-epitelização e eliminando radicais livres da pele. Tem evidências na diminuição de infiltração neutrofílica e normalização do influxo de macrófagos em feridas (Martinotti & Ranzato 2015). Todas estas propriedades irão depender, no entanto, da composição química da própolis utilizada.

#### **1.5.1.1 Flavonóides**

Os produtos de composição da própolis, como os compostos fenólicos e flavonóides tem ocorrência no reino vegetal e apresentam diversas funções. Os flavonóides são encontrados entre os metabólitos secundários de vegetais, não são tóxicos, e frequentemente encontrados em frutas, vegetais, vinhos, cereais e em corantes alimentares (Simões 2003; Panche *et al*; 2016).

O grupo dos flavonóides pode ser subdividido em diferentes grupos tais como os isoflavonóides, flavonas, flavonóis, flavononas, catequinas, antocianinas e chalconas e têm sido associados a efeitos positivos sobre os humanos e animais. Em sua fórmula, possui um ou mais núcleos aromáticos e diversas formas estruturais são descritas.

Suas funções conhecidas estão relacionadas ao amplo espectro de ação, com aplicações farmacêuticas, medicinais, cosméticas e nutricionais, sendo estes agentes antitumorais, antivirais, anti-hemorrágicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes com capacidade de modular funções enzimáticas celulares. Dentre estes, os compostos com ação antifúngica são conhecidos por isoflavonóides e biflavonóides. (Simões 2003; Panche *et al*; 2016).

### **1.6. Nanobiotecnologia**

A nanotecnologia, aplicada na expansão de sistemas de transporte de fármacos, juntamente com os conhecimentos sobre as doenças infecciosas, tem contribuído para uma melhora nos tratamentos em saúde (Gao *et al*; 2014, Gao *et al*; 2018), desenvolvendo

diferentes formas terapêuticas para evitar o aparecimento de inúmeras doenças (Hembram *et al*; 2014). Pesquisas envolvendo partículas em escala nanométrica são os objetivos da nanobiotecnologia, estas tem capacidade de promover uma maior interação do fármaco com sistemas biológicos (Zhang *et al*; 2010), podendo melhorar a farmacocinética dos medicamentos com vantagens na biodisponibilidade, liberação sustentada e controlada, direcionamento ao sítio alvo e redução de resistência (Gao *et al*; 2014, Gao *et al*; 2018).

Por definição, as nanopartículas são partículas coloidais sub-microscópicas que variam em tamanhos nanométricos, menores que 100 nm, desenvolvidos para a obtenção de novas alternativas de tratamentos alvo-específicos, com liberação direcionada de medicamentos e genes (Hembram *et al*; 2014), além de ser uma possibilidade de resolução de eventos adversos indesejados que podem ocorrer durante o uso de alguns medicamentos, como toxicidade, baixa biodisponibilidade e eficácia (Ludwig *et al*; 2018), podendo melhorar as terapias atuais (Gao *et al*; 2014).

As nanopartículas oferecem uma maior estabilidade, penetração e absorção do fármaco, aumentando a área de superfície, com resistência na degradação enzimática (Ong *et al*; 2017). Diversas formas e matrizes são utilizadas para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, e a composição do veículo utilizado é muito importante no desenho de formulações (Ensign *et al*; 2014, Gao *et al*; 2014), sendo reconhecidas estruturas derivadas de formas lipossômicas, dendrímeros, nanopartículas inorgânicas e de polímeros sintéticos ou naturais, como quitosana, (Gao *et al*; 2014), preparadas a partir de diferentes metodologias, como complexação, microemulsão, evaporação de solvente, precipitação, incorporação e gelificação iônica (Hembram *et al*; 2014).

### **1.6.1. Quitosana**

A quitosana é um polímero natural derivado da N-desacetilação da quitina, composta de copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina (Hembram *et al*; 2014), sendo encontrada com o nome químico Poly- $\beta$ -(1,4)-2-Amino-2-deoxy-D-glucose e sinônimos de 2-Amino-2-deoxy-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranan, hydrochloridrum, deacetylated chitin, deacetylchitin,  $\beta$ -1,4-poly-D-glucosamine, poly-D-glucosamine, poly-(1-4- $\beta$ -D-glucopyranosamine), e (Handbook Pharmaceutical Excipients, 2009).

A quitosana é obtida como resultado do processo da desacetilação e despolimerização da quitina e sua estrutura química sugere a presença de grupos hidroxila e amino reativos, não podendo assim, ser definida em termos de composição química exata

(Rowe *et al*; 2009, Hembram *et al*; 2014). A classificação desse polímero é realizada quanto ao seu grau de desacetilação que deve estar entre 40 e 98%, e peso molecular entre  $10^4$  a  $10^6$  Da, sendo necessárias para avaliação das características físico-químicas e biológicas e que irão interferir na sua solubilidade (Hembram *et al*; 2014).

É uma base forte, com carga eletrostática e propriedades físicas dependentes do pH. O pH inferior a 6,5 permite que os grupos amina fiquem protonados, transformando-o em um polieletrólito catiônico, alterando sua densidade, o que permite sua solubilidade em água; do contrário, em pH acima de 6,0, ocorre uma desprotonação, interferindo diretamente na carga e solubilidade do polímero. Esse polímero apresenta propriedades biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas, e tem sido explorado de diversas maneiras. Utilizado como um agente de revestimento e formador de filme, tem aspecto viscoso e propriedade mucoadesiva, aderindo-se às superfícies de carga negativa (Rowe *et al*; 2009, Hembram *et al*; 2014).

O termo mucoadesão é entendido como a força interfacial exercida entre o polímero ou material e a membrana mucosa. Essa interação entre os polímeros catiônicos e o muco pode ocorrer por diferentes tipos de ligações (ligações covalentes, de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações iônicas), favorecendo o tempo de contato entre eles (Schafer-Korting 2010, Neves *et al*; 2011). Há parâmetros que influenciam na mucoadesão, como as características do polímero, pH, viscosidade e espessura do muco, que influenciarão diretamente nos grupos de interação, impactando na extensão do processo (Schafer-Korting 2010).

### **1.6.2. Nanopartículas Poliméricas**

As nanopartículas poliméricas apresentam inúmeras vantagens no seu uso, com características na sua forma física, química e biológica que podem auxiliar para o objetivo final (Ludwig *et al*; 2018). Podem ser formadas por polímeros de origem natural ou sintéticos, com diferentes estruturas químicas e tipos de ligações. Sua subdivisão emprega os termos de nanoesferas e nanocápsulas, relacionados com a forma de adsorção do fármaco na matriz polimérica (Schafer-Korting 2010, Hembram *et al*; 2014).

Este tipo de nanopartícula possui carga superficial e capacidade de adesão a superfícies, e isso faz com que seja uma ótima escolha para um sistema inovador de transporte de fármaco (Ludwig *et al*; 2018), podendo ser eficazes também na entrega combinatória de

antibióticos, com encapsulação direta das moléculas conjugadas do fármaco na forma covalente nos núcleos poliméricos (Gao *et al*; 2014).

A gelificação iônica é uma metodologia largamente empregada na preparação de nanopartículas poliméricas como a quitosana. Estas nanopartículas podem também ser realizadas por meio de metodologias como emulsão *cross-linking*, nanoprecipitação, *salting out*. Muitos trabalhos tem utilizado a técnica de gelificação iônica, principalmente devido à sua capacidade em formar sistemas de transporte de fármacos e genes (Debnath *et al*; 2011; Hembram *et al*; 2014).

O princípio do método se baseia na utilização de um agente de reticulação iônica, no qual é comumente utilizado o tripolifosfato de sódio (TPP) (Debnath *et al*; 2011). O processo envolve a mistura de duas fases aquosas, um polímero natural catiônico como a quitosana, em contato com o TPP, um agente aniônico, formará complexos de ligação iônica em um ambiente de agitação constante, resultando na formação de uma solução com aparência esbranquiçada e límpida, que caracteriza-se pela formação de nanopartículas com tamanho variável (Debnath *et al*; 2011; Hembram *et al*; 2014).

As características das nanopartículas serão influenciadas pelo ambiente em que se encontram. A caracterização físico-química, envolvendo principalmente análises de tamanho, morfologia, carga superficial e quantidade de fármaco ligado, é uma ação essencial quando são preparados sistemas nanoestruturados para a entrega de fármacos. Diante de tais parâmetros, é possível avaliar e entender o comportamento das nanopartículas sobre a natureza biológica bem como oferecer evidências para melhorar o seu desenvolvimento, que permita distribuir o fármaco de forma direcionada e eficaz (Hembram *et al*; 2014).

O tamanho das nanopartículas pode ser obtido por meio de diferentes técnicas como microscopias e Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS). A técnica de DLS resulta em dados quantitativos do tamanho das nanopartículas, e parece ser o método mais adequado devido ao tipo de amostra em que pode ser detectado (Hembram *et al*; 2014). Nesta, um feixe de luz se difunde em uma suspensão de nanopartículas alcançada pelo seu movimento browniano, e isso resulta na quantificação da partícula juntamente com seu raio hidrodinâmico. E assim, quanto menor o tamanho da partícula, mais adequada será à penetração em células, não se esquecendo de particularidades de funcionalização e índice de polidispersividade que contribuem para medir o tamanho (Lim *et al*; 2013; Hembram *et al*; 2014).

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) um feixe de elétrons incide sobre a amostra, permitindo a observação da morfologia superficial da partícula. As nanopartículas de quitosana são observadas no MEV como formas esféricas, ou podem aparecer como misturas

globulares ou em forma de bastonetes, essa alteração é devido às condições de complexação ou modificações na estrutura da quitosana (Hembram *et al*; 2014).

Partículas em solução possuem em sua superfície uma dupla camada elétrica de íons apresentando um potencial hidrodinâmico (Lim *et al*; 2013). O potencial zeta entende-se como a medida da capacidade de atração e repulsão entre as partículas, e um meio que identifica a carga superficial das nanopartículas. Os resultados são interpretados a partir dos valores de carga, se muito negativa ou muito positiva garantem a estabilidade no sistema coloidal, e isso é devido à sua tendência de repelir e não se agregar, mas do contrário, baixo valor de potencial zeta promoverá uma força repulsiva e as partículas irão se aglomerar (Hembram *et al*; 2014).

### **1.6.3. Nanopartículas e o Epitélio Vaginal**

A anatomia e o ambiente vaginal devem ser considerados durante o desenvolvimento de formulações medicamentosas, considerando que pequenas variações fisiológicas podem afetar a eficácia do ativo farmacológico. A anatomia da vagina indica um canal tubular com ângulo de inclinação, possuindo paredes com vastas dobras (Ensign *et al*; 2014), revestidas de muco, não há presença de glândulas e é composta por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado (Ensign *et al*; 2014, Johal *et al*; 2014). Na vagina o fluido vaginal possui vasta composição, com um pH ácido, na faixa entre 3,5 e 4,5, e produção de glicogênio para fortalecer o crescimento da microbiota local de *Lactobacilos* sp. (Ensign *et al*; 2014).

Em administração por via vaginal, a absorção de fármacos ocorre através de sua passagem para a circulação periférica e plexo venoso evitando passagem pelo fígado (Ensign *et al*; 2014). O destino do fármaco por todo o organismo é dependente de suas características físicas, químicas e estrutura molecular (Hembram *et al*; 2014). E essa via de administração pode também sofrer influências de fatores fisiológicos, assim como as outras vias (Ensign *et al*; 2014).

As dobras encontradas na parede vaginal são formadas pela pressão intra-abdominal que promovem a distensão e aumento da área de superfície para a absorção (Ensign *et al*; 2014). O medicamento pode ser absorvido de forma transcelular, dependente do gradiente de concentração; forma paracelular, que passa através de junções entre as células, ou por meio de transporte em vesículas ou mediada por receptores. A dissolução do fármaco no lúmen vaginal e sua penetração pela membrana irão facilitar a absorção, e qualquer fator que

influencie na fisiologia da vagina, solubilidade do fármaco e transporte, alterará o perfil de absorção do ativo (Johal *et al*; 2014).

Fatores físico-químicos como o peso molecular, grau de ionização e perfil lipofílico de solubilidade do fármaco, irão interferir na absorção, assim como fatores fisiológicos de espessura do epitélio, aspecto do fluido vaginal, muco cervical e pH (Johal *et al*; 2014). Alterações em nível de pH são motivos de atenção durante a terapia medicamentosa, este pode ser alterado quando há infecções por fungos ou quando há sêmen na vagina, o que pode prejudicar a absorção de alguns fármacos e afetar sua ionização (Ensign *et al*; 2014).

O muco, produzido pelo colo do útero, é composto por uma grande quantidade de água, lipídeos, proteínas, enzimas, fatores imunológicos e glicoproteínas de mucina, que apresentam importante papel na adesão. A forma e aspecto do muco variam de acordo com o período ovulatório da mulher. E esta variação pode influenciar na absorção do fármaco, assim como as suas propriedades de barreira (Ensign *et al*; 2014).

A absorção do composto sofre influência por meio de seu tempo de permanência no sítio alvo, e a mucoadesão é um fator importante frente a outras estratégias (Ensign *et al*; 2014). Polímeros com carga eletrostática, como a quitosana (catiônica) promovem uma interação iônica com as estruturas aniônicas do muco, promovendo assim um contato prolongado com a mucosa, melhorando o período de permanência no sítio alvo e sua ação, o que permite altas concentrações do composto no tecido, com sua consequente absorção (Schafer-Korting 2010). Assim, o muco influencia na distribuição, tempo de contato e penetração das nanopartículas no tecido vaginal (Ensign *et al*; 2014).

### **1.7. Suscetibilidade e Toxicidade das Nanopartículas Poliméricas**

Avaliar a atividade biológica das nanopartículas poliméricas sobre micro-organismos e seus efeitos tóxicos envolve a utilização de técnicas laboratoriais padronizadas.

Com a utilização de substâncias de origem natural e biocompatíveis espera-se que a vasta gama de compostos ativos forneça atividades biológicas e não causem efeitos tóxicos sobre células saudáveis durante o seu uso clínico (Cé, *et al*; 2020). Sendo assim, testes laboratoriais como Concentração Inibitória Mínima (CIM), sobre cultura celular e com larvas de *Galleria mellonella* podem ser utilizados.

A análise de toxicidade das nanopartículas e de compostos ativos encapsulados faz-se necessária a todas as composições desenvolvidas que serão testadas em modelo *in vivo*. A análise prévia para aplicação biológica testa quanto a influências e os parâmetros

comportamentais do material particulado, sendo importante a avaliação reativa da superfície iônica, seu tamanho e aspectos moleculares de cada componente (Cé, *et al*; 2020).

### **1.7.1. Concentração Inibitória Mínima**

Devido ao aumento na incidência de infecções sistêmicas fúngicas e na resistência de fungos aos agentes antifúngicos, o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) formou um comitê com a finalidade de padronizar os testes, que incluem desde a preparação e quantidade do inóculo, escolha de meios de cultivo, temperatura e período de incubação e definição dos parâmetros finais da análise (CLSI 2008).

A CIM pode ser determinada pela técnica de microdiluição em caldo, que visa testar a suscetibilidade fúngica, de acordo com o protocolo do CLSI M27A-3. Este protocolo indica testes de referência para infecções como *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans*, padronizando valores de breakpoints (susceptível, dose dependente e resistente) estabelecido frente a diferentes agentes antifúngicos, implementação e interpretação de procedimentos de testes e propõem a implementação e controle de qualidade nos laboratórios. Esse método possui diversas vantagens como fácil realização, economia e resultados rápidos (CLSI 2008).

### **1.7.2. Teste de Toxicidade por Hemólise e Utilização de *Galleria mellonella***

O modelo *in vivo* é a melhor avaliação sobre a capacidade tóxica dos componentes, no entanto outros métodos como testes em cultura celular e ensaios com *G. mellonella* têm sido considerados como preditores confiáveis de verificação da toxicidade. Testes confiáveis e sensíveis são necessários para avaliar interações com as nanopartículas antes do experimento *In vivo* (Cé, *et al*; 2020).

Hemácias representam o constituinte celular mais abundante no sangue. Estas são células bicôncavas, formato discoide, constituída de hemoglobina e globulinas com função de transporte de oxigênio e gás carbônico, não possuem organelas e núcleo. Podem ser utilizadas para se testar variados ensaios laboratoriais simples como o baseado na detecção de hemólise, que permite a análise de amostras que podem causar toxicidade, danos, destruição e eliminação de hemácias (Pan *et al*; 2016).

*G. mellonella* é um organismo invertebrado, espécie conhecida como traça grande da cera ou traça do favo de mel, que tem sido utilizada como um modelo de experimentação laboratorial. A forma larval é o modelo utilizado como uma alternativa para a triagem nos estudos de nanotoxicologia em nanopartículas poliméricas, fornecendo rápidos resultados. É

um modelo de experimentação barato com diversas qualidades no uso, com a possibilidade de utilização de um alto número de amostras em um curto espaço de tempo, por apresentarem um sistema imune inato com similaridade ao dos humanos e de manipulação fácil (Cé, *et al*; 2020).

Este trabalho têm, portanto, o objetivo de desenvolver e avaliar sistemas nanoestruturados para o tratamento da doença comum em mulheres, como a CVV. A formulação será testada e avaliada por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, buscando alternativas para as terapias atuais. A própolis associada ao fluconazol, fármaco convencional de uso oral para o tratamento da CVV, podem servir como uma opção de tratamento que fornecerá sinergismo na atividade biológica, podendo apresentar eficácia terapêutica nos casos resistentes.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

A CVV acomete mulheres em todo o mundo e apresenta um aumento em sua incidência a cada ano, gerando milhões em gastos com consultas médicas e tratamento. Terapias antifúngicas convencionais são limitadas, apresentam eficácia baixa, efeitos colaterais indesejados, e não impedem casos recorrentes e resistência do micro-organismo.

A maioria dos produtos em desenvolvimento são versões novas e melhoradas de fármacos antigos, mas novas abordagens devem ser buscadas. Uma alternativa interessante à problemática seria o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado mucoadesivo (quitosana) contendo um antifúngico convencional (Fluconazol) conjugado a um composto natural produzido por abelhas (própolis verde).

A hipótese para essa proposta baseia-se na utilização de um polímero mucoadesivo (quitosana) formando uma nanoestrutura que pode se ligar a mucosa por um período prolongado, aumentando assim o tempo de contato do fármaco com o tecido. Dentre os compostos naturais de ação antimicrobiana, a própolis verde é um produto que tem se destacado devido a suas inúmeras atividades antimicrobianas, imunomoduladoras e imunoestimulantes, e o fluconazol, como antifúngico, é muito utilizado e sua via de administração oral tem boa eficácia.

Propõe-se o desenvolvimento de uma forma nanoparticulada de administração tópica que permite o uso de doses menores de fármacos, efeitos colaterais reduzidos, biocompatíveis, biodegradáveis, com propriedades mucoadesivas e imunoestimulantes, atuando na liberação sustentada e absorção controlada pelo epitélio vaginal.

Por meio deste, almeja-se uma terapia inovadora, eficaz e segura que sirva à comunidade, para minimizar casos de resistência e recidivas podendo o tratamento se estender a outros casos de infecções fúngicas, como na Candidíase Oral ou Bucal.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. Objetivo Geral**

Preparo, caracterização e aplicação de um sistema nanoestruturado contendo o Fluconazol e extrato etanólico natural de própolis verde para tratamento da CVV em modelo murino.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Preparar e caracterizar o sistema nanoestruturado com polímero quitosana contendo antifúngico convencional (Fluconazol) e extrato natural da própolis verde.

Definir a CIM pelo método de microdiluição em caldo para o Fluconazol e avaliar a atividade do extrato de própolis verde *in vitro* em *C. albicans* ATCC 10231.

Investigar a liberação e toxicidade (através de teste com eritrócitos e *G. mellonella*) do sistema nanoestruturado.

Avaliar a atividade *in vitro* do sistema mucoadesivo em *C. albicans* ATCC 10231.

Avaliar a eficácia terapêutica do sistema mucoadesivo *in vivo* em modelo murino para CVV.

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1. Ensaio de Atividade Antifúngica *In Vitro*

#### 4.1.1. Micro-organismo e Condições de Crescimento

O fungo *C. albicans* ATCC 10231 foi mantido no laboratório de Nano&Biotecnologia (LANAB) no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás por repiques semanais em meio de cultura ágar Sabouraud a temperatura ambiente. Para os ensaios, o fungo foi cultivado em ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C.

#### 4.1.2. Obtenção do Inóculo

Foram realizadas diluições para obter a concentração de inóculo necessário para uso nos ensaios *in vitro*. Para obtenção da suspensão I ( $1-2 \times 10^7$  células/mL), foram coletadas três alçadas de uma cultura de *C. albicans* de 24 horas dissociando-se essa amostra em 5 mL de solução salina a 0,85%. Agitou-se em vórtex por 1 minuto e então 10 µL foram pipetados na câmara de Neubauer para realização da contagem celular. A viabilidade celular foi verificada por coloração de azul de tripan. A partir do resultado obtido, diluições sucessivas foram realizadas para alcançar a concentração padronizada de  $1 \times 10^7$  células/mL. Para a obtenção da suspensão II ( $1 \times 10^6$  células/mL), uma alíquota de 500 µL da suspensão I foi diluída em 4500 µL de meio RPMI 1640. Agitou-se em vórtex por 1 minuto. A suspensão III ( $1 \times 10^4$  células/mL) foi obtida por meio da diluição de 100 µL da suspensão II em 9900 µL de RPMI 1640, volume suficiente para uma placa de 96 poços.

#### 4.1.3. Teste de Suscetibilidade *In Vitro* do Fluconazol

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M27A-3 com modificações (CLSI 2008). O fármaco fluconazol foi inicialmente dissolvido em solução de metanol e água na proporção 1:1, preparando-se uma solução inicial na concentração de 1 mg/mL. Diluições seriadas em RPMI foram realizadas para a obtenção da concentração de 64 µg/mL. Foram adicionados 200 µL da solução obtida (64 µg/mL) aos poços da primeira fila da placa. Aos demais poços, foram adicionados 100 µL do RPMI e a diluição seriada foram realizadas pela

passagem de 100 µL dos poços da primeira linha para os poços da segunda linha até a última. Os últimos 100 µL da diluição foram descartados.

Em cada poço da placa foram pipetados 100 µL da suspensão III (obtida como descrito em 5.4.2) juntamente com 100 µL do fármaco diluído, proporcionando uma diluição 1:2, sendo que as concentrações avaliadas variaram de 64 a 0,031 µg/mL. O fluconazol e o metanol foram usados como controles, além da utilização de controle negativo (RPMI 1640) e positivo (RPMI e suspensão de células).

A placa foi vedada com filme plástico, homogeneizada, cuidadosamente envolvida em papel alumínio e mantida em estufa a 35 °C por 48 horas. Após as 48 horas, os resultados foram obtidos pela da leitura visual da placa de 96 poços. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento em relação ao controle. O teste foi realizado em triplicata em três ensaios distintos.

#### **4.1.4. Determinação do Efeito do Extrato de Própolis verde sobre o Fungo *C. albicans***

Para avaliar o efeito do extrato de própolis verde sobre o fungo *C. albicans* ATCC 10231, uma solução estoque de extrato de própolis verde na concentração de 4000 a 20000µg/mL foi preparada, diluindo-se o extrato em metanol. Esta solução estoque foi diluída em meio RPMI1640 para obtenção das concentrações necessárias para a realização do teste, que foram: 4000 a 1,95 µg/mL e 20.000 a 78,1 µg/mL. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL das diluições do extrato de própolis verde e 100 µL do inóculo III (conforme item 4.1.2). A placa foi mantida a 35 °C. Os resultados foram obtidos após 48 horas, pela análise de leitura da placa e o teste foi realizado em triplicata, três ensaios distintos.

#### **4.1.5. Teste de Sinergismo do Fluconazol e Extrato de Própolis verde**

Para avaliar o efeito do sinergismo existente entre fluconazol e extrato de própolis verde sobre o fungo *C. albicans* ATCC 10231, uma solução de extrato de própolis verde na concentração de 4000 µg/mL e uma solução de fluconazol na concentração de 64 µg/mL foram preparadas, diluindo-se ambos em meio RPMI1640 para obtenção das concentrações necessárias para a realização do teste. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL das diluições do extrato de própolis verde e fluconazol, e 100 µL do inóculo III (conforme item 4.1.2). A placa foi mantida a 35 °C. Os resultados foram obtidos após 48 horas, pela análise de leitura da placa e o teste foi realizado em triplicata.

#### **4.1.6. Teste de Suscetibilidade *In Vitro* das Nanopartículas no Fungo *C. albicans***

Ao avaliar a suscetibilidade das Nanopartículas Vazias (NV), Nanopartículas de Própolis (NP), Nanopartículas de Fluconazol (NF) e Nanopartículas Coencapsuladas (NCO), foi utilizada uma ressuspensão dos *pellets* das nanopartículas em meio RPMI. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL das ressuspensões de cada nanopartícula e 100 µL do inóculo III (conforme item 4.1.2). A placa foi mantida a 35 °C. Os resultados foram obtidos após 48 horas, pela análise de leitura da placa e o teste foi realizado em triplicata.

#### **4.1.7. Teste Fungicida/ Fungistático dos Compostos**

Para avaliar a atividade dos compostos fluconazol e própolis verde, e das NV, NF, NP e NCO sobre o fungo *C. albicans* ATCC 10231 e indicar sua propriedade de ação fungicida ou fungistática, os 200 µL de amostra contida nos poços da placa de 96 poços do teste de CIM, em que houve indicação de inibição do fungo, foram estriados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas e mantidas a 37 °C por 48 horas. Ao final considera-se atividade fungistática quando há crescimento superior à 2 colônias do fungo e quando houver ausência de crescimento ou limite de 2 colônias na placa indica atividade fungicida.

### **4.2. Preparo das Nanopartículas**

#### **4.2.1. Nanopartículas Co-encapsuladas (NCO)**

As nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica de acordo com o protocolo de Calvo *et al* (1997) modificado, preparando-se uma solução ácida à 1% de ácido acético (99,8%, marca Neon) para dissolução de quitosana (Grau de Desacetilação de 75%, marca Sigma-Aldrich) por sonicação, e pH ajustado para 4.7. Na solução de quitosana foi adicionado, por gotejamento, sob agitação magnética branda de 150 rpm, 1mL do fluconazol (98% pureza, marca Sigma-Aldrich) na concentração de 260,7 µg/mL, e mantida em agitação por 5 horas, ao abrigo da luz. Adicionou-se a esta solução uma preparação de 8 mL de solução de TPP (marca Sigma-Aldrich) contendo extrato de própolis verde (doada pela empresa Citrinitas – SP) na concentração de 20000 µg/mL, por gotejamento, sob agitação magnética branda (150 rpm) e mantida em agitação branda (150 rpm) por 1 hora. Foi mantida proporção de 2:1, de quitosana e TPP. A solução foi aliqüotada em tubos de 1,5mL e

centrifugadas à 13200 rpm (Figura 4). O sobrenadante foi separado por três centrifugações. A amostra foi centrifugada duas vezes, por um período de 15 minutos cada, na rotação de 13200 rpm, e a terceira vez por um período de 10 minutos à 13200 rpm, seguindo a separação do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* formado.

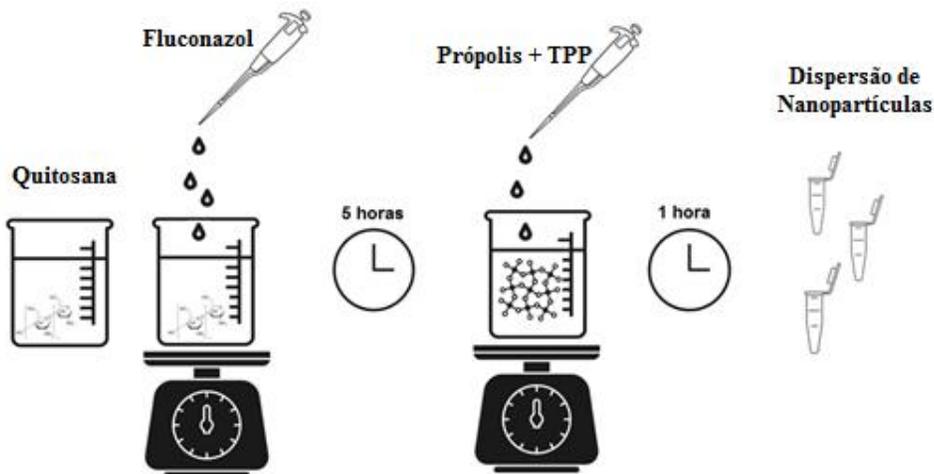


Figura 3 Esquemática do Preparo de Nanopartículas. Fonte: Banco de imagens (thenounsproject.com).

Legenda: Na solução de quitosana foi adicionado o Fluconazol, permitindo a complexação por um período de 5 horas. Após esse período adicionou-se a própolis com o agente reticulante (TPP), permitindo agitação por mais um período de 60 minutos. Aliquotou-se em microtubos para prosseguir com a centrifugação da dispersão de nanopartículas e separação dos *pellets* e sobrenadante.

### 4.3. Preparo das Nanopartículas Vazias (NV)

A técnica usada para o preparo das nanopartículas sem adição dos compostos ativos (NV) foi semelhante ao descrito no item 4.2.1, substituindo-se o Fluconazol e o extrato de própolis verde por água milli-Q.

### 4.4. Caracterização das Nanopartículas

#### 4.4.1. Diâmetro, PDI e Potencial Zeta

A caracterização das nanopartículas foi realizada quanto ao diâmetro e Índice de Polidispersão (PDI) pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), e para obtenção

do potencial zeta foi realizada técnica de Espalhamento de Luz Eletroforético, ambas no equipamento Zetasizer.

#### **4.4.2. Morfologia das Nanopartículas**

As nanopartículas foram analisadas no Laboratório de Microscopia – LABMIC UFG, por meio de microscopia eletrônica de varredura utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV), Joel, JSM -6610, *Thermo Scientific NSS Spectral Imaging*. As amostras foram preparadas e uma gota da suspensão foi gotejada sobre lâmina e realizado um preparo utilizando sistema para deposição de filmes de ouro, Dantum Vacuum, Desk V, equipado com acessório de carbono.

#### **4.5. Eficiência de Associação dos Compostos na Nanopartícula**

##### **4.5.1. Análise Espectrofotométrica UV-Visível e Linearidade**

As concentrações dos compostos associados à nanopartícula foram determinadas por quantificação do Fluconazol, extrato de própolis verde e diluição do padrão de quercetina presentes no sobrenadante após centrifugar a dispersão de nanopartículas. A quantificação dos compostos foi realizada inicialmente por espectrofotometria no ultravioleta e os comprimentos de onda utilizados foram escolhidos mediante análise de varredura no espectrofotômetro Varian Cary 50Bio detectando o espectro de absorção máxima de cada composto.

A partir dos dados de varredura espectrofotométrica, a curva de linearidade padrão foi preparada utilizando diluições de uma solução de fluconazol nas concentrações 100, 85, 70, 55, 40, 25, 10, 5 e 2,5 µg/mL. Para própolis verde nas concentrações de 100, 85, 65,2, 43,5, 21,7, 10, 5, 2,5 µg/mL, e para padrão de Quercetina nas concentrações de 12,5, 10, 7,5, 5, 2,5, 1 µg/mL (Figura 5) ambas diluídas em sobrenadante de nanopartícula sem a adição dos compostos ativos. As análises foram realizadas em triplicata.

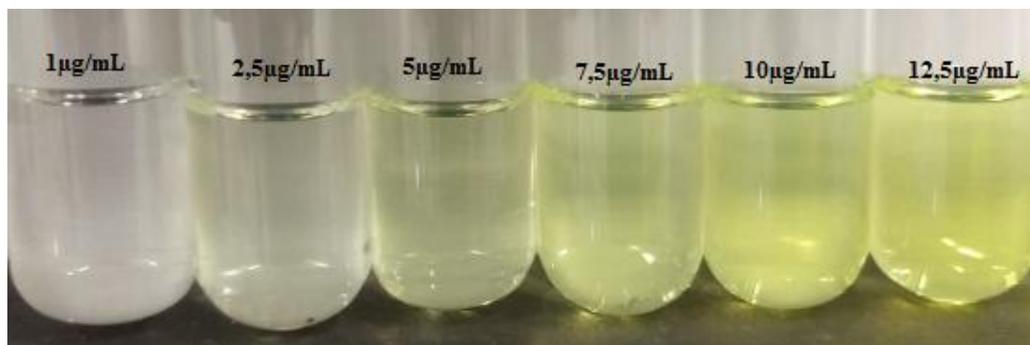


Figura 4 Diluição do padrão de Quercetina para construção da curva de linearidade padrão.

As médias das absorbâncias de cada concentração foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes nas abscissas. A curva foi plotada no programa Origin Pro 8.0. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a equação 1:

Equação 1

$$y = ax + b$$

Onde **a** é a inclinação da reta em relação ao eixo e **b** é a interseção da reta com o eixo y.

As concentrações das amostras foram determinadas a partir das equações da reta obtidas e a concentração do composto foi substituída na Equação 5, conforme item 4.5.3.

#### **4.5.2. Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação do Fluconazol e Própolis verde por CLAE**

As análises foram conduzidas utilizando um equipamento de sistema cromatográfico da marca Waters, modelo HPLC Alliance com módulo de separação e2695, detector de arranjo de diodo (DAD) 2998 e software Empower 2.0. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (250 mm x 4,6 mm, 5µm). A fase móvel com composição de acetonitrila, metanol, e água ultrapura (Milli-Q) acidificada com ácido acético a 5%, foi previamente filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45µm e degaseificada usando banho ultrassônico. A fase móvel foi utilizada em modo de eluição gradiente e vazão de 1mL/min por 45 minutos, e detecção a 261nm e 300nm. O volume de injeção foi de 20µL, e as análises foram realizadas na temperatura de 25°C. O Quadro 1 resume as condições cromatográficas que foram testadas para a escolha do método de análise.

Quadro 1- Condições Cromatograficas Testadas para o Desenvolvimento do Método de Análise em CLAE para Quantificação de Fluconazol de Propolis Verde

Nº	Composição da Fase Móvel	Proporção da Fase Móvel	Vazão
1	Metanol:Acetonitrila:Água	40' 50:48:2	1mL/min
2	Metanol:Acetonitrila: Água+Ácido Acético 0,3%	0' 30:10:60; 10' 45:15:40; 20' 55:20:25; 25' 65:25:10; 40' 0:100:0; 50' 0:100:0	0,8mL/min
3	Metanol: Acetonitrila:Tampão Fosfato pH 3,0	0' 30:10:60; 10' 45:15:40; 20' 55:20:25; 25' 65:25:10; 40' 0:100:0; 50' 0:100:0	0,8mL/min
4	Metanol:Acetonitrila: Água+Ácido Acético 0,5%	0' 20:70:10; 10' 65:15:20; 20' 10:60:30; 25' 60:20:20; 40' 25:55:20; 50' 30:60:10	0,8mL/min
5	Metanol:Água+Ácido Acético 1%	0' 25:75; 10' 40:60; 20' 50:50; 25' 70:30; 40' 100:0; 50' 100:0	1mL/min
6	Metanol:Água+Ácido Acético 1%	0' 25:75; 10' 40:60; 20' 50:50; 25' 70:30; 40' 100:0; 50' 100:0	1mL/min
7*	Metanol: Acetonitrila: Água+Ácido Acético 5%	0' 15:5:80; 10' 30:10:60; 20' 50:15:35; 25' 65:15:20; 40' 70:20:10; 45' 70:20:10	1mL/min

Legenda: N – número de métodos. \* Parâmetro avaliado.

#### 4.5.2.1 Dados de Conformidade do Sistema

O sistema cromatográfico deve ser avaliado quanto a sua capacidade de fornecer resultados reprodutíveis. Esta avaliação é realizada antes de se iniciar as análises de validação para verificar por meio de um conjunto de parâmetros, com limites recomendados (Quadro 2), que o equipamento utilizado garante resultados exatos e precisos (Ribani *et al*; 2004).

Quadro 2 - Parâmetros de Conformidade do Sistema Cromatográfico

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (tm), $k > 2$ .
Repetitividade (RSD)	RSD < 1% para $n > 5$ .
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo.
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$
Número de pratos teóricos da coluna (N)	Em geral deve ser > 2000.

Fonte: Adaptado de Ribani *et al*; 2004.

#### 4.5.2.2 Validação do Método Analítico

A validação foi realizada conforme RDC nº166 de 24 de julho de 2017.

#### 4.5.2.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da identificação do Fluconazol e da própolis na amostra de sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada comparando os tempos de retenção e o espectro de absorção UV (190 a 400nm) dos picos obtidos. Os cromatogramas dos diluentes como sobrenadante de NV, metanol e água, foram verificados para avaliar possíveis picos interferentes nas análises.

#### 4.5.2.4 Linearidade

Na construção da curva de linearidade padrão no CLAE, foram preparadas diluições de uma solução de Fluconazol nas concentrações 1,5, 3, 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL em sobrenadante de NV. As soluções diluídas foram filtradas em membrana de 0,22 µm e injetadas no cromatógrafo. As análises foram realizadas em triplicata. As médias das áreas de cada concentração foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes nas abscissas. A equação da reta foi obtida conforme item 4.5.1. Os resultados dos testes foram tratados com o auxílio do *software Statistic*, realizando-se os testes de significância da regressão, por análise de ANOVA. Todos os resultados foram calculados com intervalo de confiança de 95%.

#### 4.5.2.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando dados da equação da curva, substituindo nas equações 2 e 3:

Equação 2

$$LD = \frac{3,3 * DP\alpha}{IC}$$

Equação 3

$$LQ = \frac{10 * DP\alpha}{IC}$$

Onde DPa é o Desvio padrão do intercepto com o eixo Y da curva de calibração e IC representa a Inclinação da curva de calibração. LD é o Limite de Detecção e LQ é o limite de Quantificação.

#### 4.5.2.6 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

O parâmetro de precisão avalia a repetibilidade e a precisão intermediária. A avaliação da repetibilidade foi realizada pela determinação da concentração de três pontos da curva analítica: nível baixo (18,2µg/mL), nível médio (22,6 µg/mL) e nível alto (27,2 µg/mL). A precisão intermediária foi realizada alterando o analista e o dia da análise, seguindo com o preparo das amostras de forma idêntica às condições anteriores. As soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm e injetadas, em triplicata, no cromatógrafo. Os parâmetros foram estabelecidos por meio do coeficiente de variação (CV).

#### 4.5.2.7 Exatidão

No parâmetro de exatidão adicionou-se quantidade conhecida (concentração equivalente à 10 µg/mL) do padrão de fluconazol às soluções da amostra em três níveis de concentração diferentes. O valor da exatidão, em porcentagem, foi obtido pela relação entre a concentração do padrão adicionado na amostra e a concentração do padrão antes da adição, conforme equação 4:

Equação 4

$$Exatidão = 100 \times \frac{[(Amostra + padrão fluconazol) - (Padrão fluconazol)]}{[Padrão fluconazol]}$$

#### 4.5.2.8 Robustez

A robustez foi avaliada variando-se os parâmetros de: fluxo (de 1mL/min para 0,8mL/min e 0,9mL/min), temperatura (alterada de 25 °C para 26 °C e 27 °C) e coluna (Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6mm x 250 mm, 5 µm), alterada para a coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)). Calculou-se o CV entre as áreas dos picos do Fluconazol em cada alteração em relação à área do método original.

#### 4.5.2.9 Efeito Matriz

Para o efeito matriz construiu-se duas curvas para avaliar o paralelismo existente. Cinco soluções de fluconazol nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL diluídas em

sobrenadante de NV foram avaliadas, juntamente com amostras de 80%, 90%, 100%, 110% e 120% de concentração. As soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm e injetadas, em triplicata, no cromatógrafo. Foi realizada análise estatística de avaliação de F (ANOVA).

#### 4.5.3. Eficiência de Encapsulação das Nanopartículas

As concentrações dos compostos associados à nanopartícula foram determinadas por quantificação do Fluconazol e extrato de própolis verde presentes no sobrenadante da nanopartícula. A concentração da amostra foi determinada a partir da equação da reta, conforme descrito no item 4.5.1, obtida da curva de linearidade e substituída na equação 5:

Equação 5

$$E.A = \frac{QT \text{ (valor total)} - QX \text{ (valor quantificado)}}{QT \text{ (valor total)}} \times 100$$

Onde, a % da eficiência de associação (E.A.) representa a porcentagem de composto retido as nanopartículas, QT representa a massa de composto adicionada inicialmente para se obter as nanopartículas e QX representa o valor analisado no equipamento CLAE.

A quantificação dos compostos foi realizada inicialmente por espectrofotometria no ultravioleta a 261nm e 300nm para o Fluconazol e a própolis verde, respectivamente. Posteriormente o método de quantificação foi alterado para doseamento em CLAE.

#### 4.6. Teste de Liberação *In Vitro*

As nanopartículas foram preparadas conforme item 4.2 alterando sua ressuspensão do *pellet* de água ultrapura para solução salina 0,85% e pH 4.1. O sobrenadante após preparo das nanopartículas foi analisado conforme item 4.5.3. Os *pellets* ressuspensos em solução salina 0,85% e armazenados em tubos falcon de 50mL. Os tubos foram colocados em uma estufa agitadora com programação de temperatura à 37 °C, velocidade de 70 rpm. Para análise, de cada tubo falcon foram retirados 4,5mL, colocados em tubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas duas vezes, por um período de 15 minutos cada, na rotação de 13200 rpm, e a terceira vez por um período de 10 minutos à 13200 rpm, seguindo a separação do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* formado. Os sobrenadantes foram reservados para análise de eficiência de encapsulação e os *pellets* foram ressuspensos em solução salina 0,85% e retornados para os tubos falcon iniciais. Os sobrenadantes foram analisados por 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas.

## 4.7. Análise de Citotoxicidade

### 4.7.1. Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado com a finalidade de determinar a capacidade hemolítica das nanopartículas de quitosana, nanopartículas de quitosana encapsulando o Fluconazol, nanopartículas de quitosana encapsulando a própolis e nanopartículas de quitosana coencapsulando o Fluconazol e própolis.

Para a preparação, 1,5mL de sangue humano foram coletados em tubo tratado com EDTA. O sangue foi centrifugado à 1500 rpm por 8 minutos e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com PBS 1X e diluídas em PBS na proporção de 3:11 (v/v). Adicionar às placas de 96 poços com fundo em V 10µL da diluição de células. Para cada poço adicionar 90µL de água destilada (controle positivo), PBS 1X (Controle Negativo), Nanopartícula de Quitosana, Nanopartícula de Quitosana encapsulando o Fluconazol, Nanopartícula de Quitosana encapsulando a Própolis, Nanopartícula de Quitosana Coencapsulando o Fluconazol e Própolis, Própolis Livre na concentração de 8mg/mL, Fluconazol Livre na Concentração de 30µg/mL, Solução de Própolis e Fluconazol, todos ressuspendidos e diluídos em PBS e realizados em triplicata.

Incubar as placas por 30 minutos à 37 °C e então centrifugar à 2000 rpm à 10 minutos. Coletar o sobrenadante e manter o mesmo em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente para verificar a oxidação da hemoglobina e transferir para placas de 96 poços para determinar a absorbância à 545nm.

A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação 6:

Equação 6

$$\%H = \frac{\text{Abs Amostra} - \text{Controle Negativo}}{\text{Abs Controle Positivo}} \times 100$$

### 4.7.2. Teste de Citotoxicidade usando como modelo *Galleria mellonella*

Para o teste de citotoxicidade foi utilizado o modelo *in vivo* com larvas de *G. mellonella*. As larvas foram selecionadas de acordo com peso,  $175 \pm 40$ mg, e coloração mais clara. As larvas foram separadas em 10 grupos com um *n* de 10 larvas. Foram testadas as concentrações de uso dos compostos e a água ultrapura foi utilizada como diluente e veículo. Foram injetados 10µL da solução através da última pró-perna esquerda utilizando uma seringa Hamilton de 10µL. Três controles foram utilizados para testar as condições utilizadas:

controle negativo (Larvas sem injeção), controle do veículo (Larvas com injeção de água ultrapura), controle positivo (Larvas com injeção de DMSO), e foram testados os compostos livres (própolis e Fluconazol) e as nanopartículas nas concentrações de uso.

As larvas foram mantidas em potes de vidro com entrada de ar e providas de cera de abelha e pólen *ad libitum* em temperatura de 35 °C. A viabilidade das larvas foi avaliada por 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Observando-se o comportamento larval com estímulos, motilidade e alteração de cor.

#### **4.8. Teste *In Vivo* em modelo Murino**

A eficácia terapêutica das nanopartículas foi avaliada a partir de ensaio *in vivo* utilizando modelo murino, a partir do protocolo aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal sob número 095-18. Este modelo tem sido utilizada para mimetizar a infecção ativa em seres humanos, sendo este eficiente para avaliar o tratamento de fármacos para esta infecção (Yano & Fidel, 2011). Foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem Balb/c, com idade entre 6 a 8 semanas, mantidos sob condições de luminosidade com acesso a dieta padrão para camundongos do biotério do IPTSP com água *ad libitum*. As técnicas utilizadas para a infecção, manuseio durante os tratamentos e sacrifícios seguiram as normas éticas de manuseio de animais.

O método de infecção foi baseado no protocolo descrito por Yano & Fidel, (2011). Nas 72 horas anteriores à aplicação do inóculo, os animais receberam uma dose de 100µL de valerato de estradiol (1mg/mL), diluído em óleo de rícino por via subcutânea, para induzir um estado pseudoestro e uma infecção vaginal persistente no camundongo. Este procedimento foi repetido semanalmente até o término do experimento.

O fungo *C. albicans*, ATCC 10231, foi repicado em ágar sabouraud e incubado à 37 °C por 24 horas, Suas células leveduriformes foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade conferida por azul de tripan e a concentração do inóculo foi ajustada para  $7,5 \times 10^7$  leveduras/mL. A infecção foi realizada pela inoculação com auxílio de uma pipeta, inoculando 20µL da suspensão fungica por via vaginal. Os camundongos foram mantidos com a calda suspensa por 30 segundos após a inoculação.

O controle da infecção foi realizado 48 horas após a administração do inóculo, com a adição de PBS em lavagem vaginal, e em seguida inoculado em ágar sabouraud, incubado por 37 °C e a verificação do crescimento fúngico realizada após 24 horas.

Foram utilizados sete grupos de tratamento com  $n= 5$ : (i) Controle Negativo, (ii) Controle Positivo, (iii) Controle de Miconazol, (iv) Nanopartículas de Quitosana, (v) Nanopartículas de Quitosana encapsulando Própolis, (vi) Nanopartículas de Quitosana encapsulando Fluconazol, (vii) Nanopartículas de Quitosana coencapsulando Própolis e Fluconazol. O tratamento teve início, 48 horas após a infecção e foi continuado por 7 dias seguidos, através da administração de 20 $\mu$ L de cada um dos compostos do tratamento por via vaginal. Após o término dos tratamentos os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical.

#### **4.8.1. Análise de Carga Fúngica**

Após a eutanásia, os tecidos vaginais dos camundongos foram extraídos de forma asséptica em cabine de segurança biológica e cortados de forma longitudinal para realizar a análise de recuperação de carga fúngica e análise histopatológica, seguido de pesagem de cada parte do tecido cortado. Os tecidos foram macerados, utilizando macerador individual para cada grupo, em 1 mL de PBS 1 $\times$ . O material proveniente da maceração foi inoculado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud contendo antibiótico e incubado à 37 °C por 24, 48, 72, 96, 120 horas. Os resultados foram expressos por média  $\pm$  DP da contagem das colônias obtidas para cada grupo.

#### **4.8.2. Análise Histopatológica**

As amostras de tecido vaginal foram armazenadas em formol tamponado 10% nas primeiras 24 horas, transferindo-se as amostras para álcool 70% até o momento da preparação dos cortes histológicos. Foram realizados cortes longitudinais nos tecidos vaginais, e estes foram submetidos a análise histopatológica. Após identificação dos tecidos, os mesmos são submetidos a uma bateria de ensaios no equipamento AUTOTEC com ciclos de imersão em álcool, xilol e parafina. Após a solidificação do material embebido em parafina permitir cortes histológicos de 1,05 micras com auxílio de micrótomo, seguindo de confecção da lâmina. A coloração utilizada para diferenciação de núcleo e citoplasma foi de Hematoxilina-Eosina e para marcação do fungo *Candida albicans* utilizou-se a coloração de Ácido periódico de Schiff (PAS).

#### **4.9. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre os resultados ( $p < 0,05$ )\*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ensaio de Atividade Antifúngica *In Vitro*

#### 5.1.1. Teste de Suscetibilidade do Fluconazol, determinação do Efeito do Extrato de Própolis verde e Suscetibilidade de Nanopartículas no Fungo *Candida albicans*

O número de concentrações testadas abrangeu os *breakpoints* e os esperados para as cepas de controle de qualidade segundo o CLSI M27A2, que para o Fluconazol é preconizada a faixa entre 0,125 e 64 µg/mL. Para avaliar a faixa de concentração do efeito inibitório da própolis verde sobre o fungo foram testadas concentrações já descritas em Ong *et al* (2017), utilizando assim a concentração entre 1,95 e 4000 µg/mL.

Os compostos livres: Própolis verde na concentração de 20.000 µg/mL apresentou efeito inibitório na concentração de 1250 µg/mL e Fluconazol (32 µg/mL) apresentou CIM em 1 µg/mL (Tabela 1). O teste de sinergismo entre Fluconazol e extrato de própolis verde foi realizado unindo-se os compostos nas concentrações avaliadas anteriormente. Neste teste, os resultados do sinergismo para Fluconazol na concentração de 64 µg/mL e própolis verde na concentração de 4000 µg/mL foram de 254 µg/mL, resultado alcançado a partir da soma de concentrações dos compostos.

A suscetibilidade das nanopartículas sobre o fungo *C. albicans* foi realizada testando as nanopartículas vazias, NP, NF e NCO da própolis verde e o Fluconazol. Os compostos livres foram testados isoladamente em concentrações diferentes das anteriormente testadas, avaliando-se as concentrações adicionadas na solução total de nanopartículas.

Tabela 1- Suscetibilidade antifúngica e efeito fungistático/fungicida

Grupo	CIM (µg/mL)	<i>p</i>	Capacidade Fungicida/ Fungistática	Contagem Fúngica de Poços com CIM (UFC/200µL)	<i>P</i>
Fluconazol	1	0,79	Fungistático	37	0,99
Própolis	1250		Fungistático	133	
Fluconazol +Própolis	254		Fungistático	122	
NV	1300		Fungistático	200	
NP	152,18		Fungistático	188	
NF	3,07		Fungistático	138	
NCO	158,3		Fungistático	178	

Legenda: Suscetibilidade antifúngica dos compostos e sua capacidade de efeito fungicida ou fungistático sobre o fungo *C. albicans*. Resultados são representativos de três análises independentes em triplicata.

Nas nanopartículas, melhores resultados foram verificados para NF, com CIM de 3,07µg/mL. Nanopartículas de própolis verde em sua totalidade foi eficaz em 152,18µg/mL (Tabela 1) e em flavonóides totais, 22,7µg/mL (Dados não mostrados). Nanopartículas provenientes da co-encapsulação, a CIM foi de 158,3µg/mL (Tabela 1) considerando a própolis verde total com Fluconazol e 28,82µg/mL para flavonóides totais e fluconazol. Os controles, positivo e negativo, apresentaram resultados satisfatórios, com crescimento característico no controle positivo e ausência de crescimento, no controle negativo (dados não mostrados).

Os resultados do teste fungicida/ fungistático dos compostos livres e das nanopartículas com a cepa *C. albicans* ATCC 10231 demonstraram que ambos os compostos possuem característica fungistática nas concentrações em que houve a inibição do fungo. Após plaquear o inóculo dos poços em que não houve crescimento fúngico houve crescimento de média em 37 UFC/200µL para fluconazol, 133 UFC/200µL para própolis verde, 122 UFC/200µL para o sinergismo entre própolis e fluconazol. Nos poços com nanopartículas, para NV houve crescimento médio de 200 UFC/200µL, NP 188 UFC/200µL, NF 138 UFC/200µL e NCO 178 UFC/200µL.

## **5.2. Caracterização das Nanopartículas**

O método de gelificação iônica foi empregado utilizando variadas proporções de quitosana e TPP. Estas diferenças foram avaliadas, na tentativa de se obter nanopartículas que atendessem aos critérios físico-químicos como menor tamanho e PDI.

Nas tabelas a seguir estão mostrados os dados resultantes da caracterização das nanopartículas contendo o extrato de própolis verde (Tabela 2) e nanopartículas contendo o fluconazol (Tabela 3).

Tabela 2 - Proporções das Soluções de Quitosana e TPP para Análise de Formação das NP

<i>Proporção Quitosana:TPP</i>	<i>Diâmetro (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Eficiência de Associação (%)</i>
1:1	1488±68	0,157±0,003	0
2:1	<b>346,5±31,1</b>	<b>0,220±0,008</b>	<b>45,6</b>
3:1	<b>288,8±11,2</b>	<b>0,250±0,03</b>	<b>57,9</b>
4:1	516,3±2,3	0,615±0,013	55,6
5:2	443,5±5,4	0,477±0,023	21,3

Legenda: Resultados são representativos de média ± desvio padrão, de três análises independentes em triplicata.

A NP verde apresentou melhores resultados quando preparada na proporção de 3:1, demonstrando tamanho inferior a 300nm e PDI menor que 0,3. Nesta proporção a eficiência de associação também foi maior, em comparação as demais. No entanto, para a NF, a proporção 2:1 indicou características mais adequadas, com tamanho inferior a 400nm, PDI menor que 0,3 e eficiência de encapsulação de 40%. Visando uma nanopartícula apta para administração em mucosas, em que um diâmetro inferior a 400nm, unido a um PDI baixo, com quantidade suficiente de fármaco na concentração ativa, foram satisfatórios, escolheu-se assim a proporção 2:1 para uso. Essa proporção apresentou uma caracterização melhor em nanopartículas de fluconazol, mas nas nanopartículas de própolis verde os dados não foram diferentes.

Tabela 3 - Proporções das Soluções de Quitosana e TPP para Análise de Formação das NF

<i>Proporção Quitosana:TPP</i>	<i>Diâmetro (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Eficiência de Associação (%)</i>
1:1	261,3±1,4	0,451±0,004	0
2:1	<b>383,1±4,9</b>	<b>0,211±0,011</b>	<b>40</b>
3:1	480,7±9,2	0,449±0,008	31,2
4:1	421,3±0,6	0,354±0,046	9,7
5:2	765,3±14,7	0,343±0,014	32

Legenda: Resultados são representativos de média ± desvio padrão, de três análises independentes em triplicata.

Os resultados de caracterização em tamanho, PDI e eficiência de associação das nanopartículas de extrato de própolis verde e fluconazol contribuíram para definir qual a melhor proporção de quitosana e TPP a ser utilizada no desenvolvimento de nanopartículas de co-encapsulação. A partir dos dados satisfatórios encontrados em ambas formulações de 2:1 com tamanho inferior a 400nm, PDI menor que 0,3 e eficiência de associação de aproximadamente 40%, seguiu-se com o preparo das nanopartículas co-encapsuladas, com resultados demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valor correspondente ao Tamanho, PDI, Potencial Zeta e Eficiência de Associação da NV e NCO na Proporção escolhida de 2:1 de Quitosana e TPP, respectivamente.

Nanopartícula	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Associação (%)		
				Fluconazol	Própolis	Flavonóides
NV	394,0±7	0,356±0,006	-	NA	NA	NA
NCO	316,5±14,7	0,391±0,004	37,4±0,3	38,3	45,6	5,23

Legenda: Resultados são representativos de média ± desvio padrão, de três análises independentes em triplicata.



Figura 5 Dispersão de Nanopartículas após preparo na proporção 2:1. NV e NCO.

As NCO foram preparadas na proporção 2:1 (polímero e agente reticulante) e sua caracterização demonstrou um diâmetro médio de 316,5nm e PDI 0,39. O potencial Zeta da partícula é positivo em 37,4mV. A eficiência de associação para o fluconazol foi de 38,3% e para a encapsulação da própolis verde em extrato total foi de 45,6% e flavonóides totais de 5,23%.

### 5.3. Morfologia das Nanopartículas Determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das imagens obtidas por MEV das nanopartículas vazias (Figura 7 A) e co-encapsulada (Figura 7 B) é possível atribuir morfologia irregular, opaca e tamanho aproximado de 400nm, sendo resultados reproduzíveis às análises realizadas pela técnica de DLS.

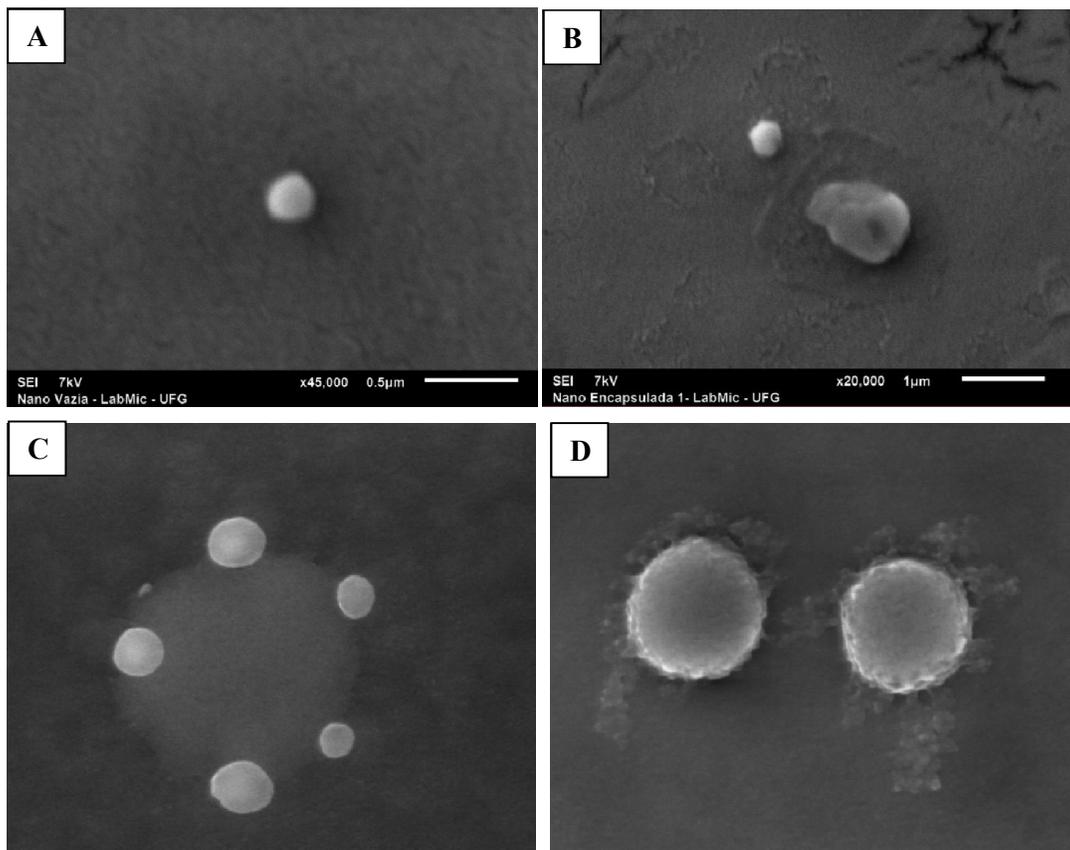


Figura 6 Fotomicrografias obtidas por MEV das NV e NCO

Legenda: Fotomicroscopias de Nanopartículas mostrando em A) NV e B), C) e D) NCO. Aumento de x45.000, SEI 7Kv 1µm de diâmetro.

## 5.4. Determinação do Comprimento de Onda de Máxima Absorção para o Fluconazol e Própolis verde por Espectrofotometria UV-Vis

### 5.4.1. Varredura Espectrofotométrica UV-Vis do Fluconazol

A varredura da solução de fluconazol diluído em metanol e água na proporção de 1:1 na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou dois picos de absorção máxima, um deles em 210nm e o outro em 261nm, conforme observado na Figura 8. Dentre os resultados obtidos, o comprimento de onda de 261nm foi selecionado para as análises de leitura no espectrofotômetro UV-Vis para a quantificação, isso se explica porque em comprimentos de onda próximos a 200nm quase todas as moléculas orgânicas tendem a absorver a luz visível.

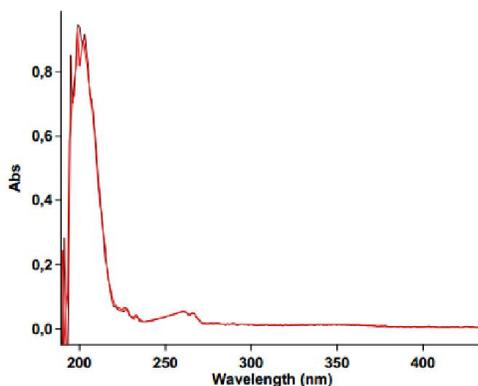


Figura 7 Espectro de absorção em espectrofotometria UV Vis de uma solução de Fluconazol na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  diluído em metanol e água na proporção 1:1

### 5.4.2. Varredura Espectrofotométrica UV-Vis do Extrato de Própolis verde

A varredura da solução de extrato de própolis diluído em metanol na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentou pico de absorção máxima em 300nm, conforme mostra a Figura 9.

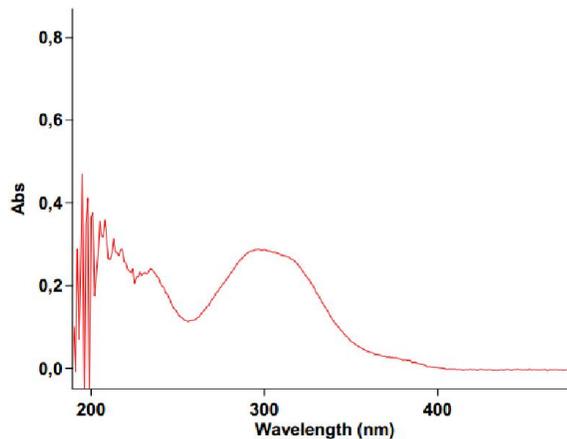


Figura 8 Espectro de absorção em espectrofotometria UV Vis de uma solução de própolis verde na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  diluído em metanol.

Para flavonóides totais, o padrão de quercetina foi lido em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 420nm, conforme descrito na metodologia de Woisky & Salatino (1998).

### 5.5. Eficiência de Associação

Para verificar a eficiência de associação dos compostos nas nanopartículas, foram realizadas análises espectrofotométricas UV-Vis dos compostos livres para a elaboração das curvas de linearidade e conseqüente obtenção das equações da reta. Curvas foram realizadas para cada composto separadamente, como pode ser observado nas Figuras 11, 12 e 13.

Foram realizadas as quantificações da própolis e do Fluconazol nas nanopartículas para avaliar o rendimento da co-encapsulação dos compostos. No entanto, quando ocorreu a interação entre o Fluconazol e a própolis não foi possível determinar um valor de absorbância na leitura espectrofotométrica UV-Vis para o Fluconazol, gerando uma absorbância muito parecida com o padrão encontrado na própolis verde. Diante disso, diversas análises espectrofotométricas e de cromatografia líquida foram realizadas para entender o processo envolvido durante a interação dos ativos.

Análises cromatográficas por CLAE foram realizadas para verificar o perfil dos compostos no sobrenadante da amostra de NCO. A partir dessas corridas verificou-se que fluconazol e a própolis possuem o mesmo tempo de retenção (Figura 10), e são compostos de estrutura molecular parecida, em que qualquer alteração realizada para modificar um ativo se aplicava também ao outro.

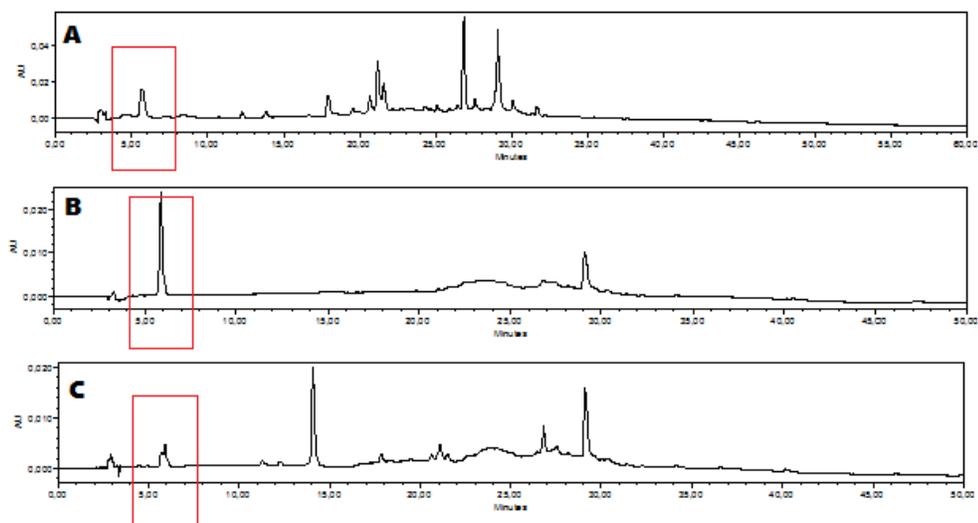


Figura 9 Perfis cromatográficos 2D a 261nm da própolis verde, Fluconazol e sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada

Legenda: A. Cromatograma de própolis verde a 261nm; B. Cromatograma de Fluconazol a 261nm; C. Cromatograma de sobrenadante da NCO.

Foi estabelecido um método de análise cromatográfica para separar os picos co-eluídos, alcançando com sucesso a validação do fluconazol na amostra de sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada, conseguindo-se quantificar de forma indireta por meio dessas análises o teor de Fluconazol presente no interior da nanopartícula co-encapsulada. Dificuldades foram encontradas na quantificação dos compostos da própolis verde, 13 padrões flavonóides foram pesquisados na tentativa de identificação dos picos de compostos majoritários para a quantificação, no entanto, não houve sucesso na identificação. Assim, para construção da curva de linearidade de Própolis verde foi necessária a quantificação de flavonóides totais a partir de padrões com o composto quercetina, conforme metodologia de Woisky & Salatino (1998).

### 5.5.1. Curva de Linearidade por Espectrofotômetro UV-Vis

#### 5.5.1.1 Curva de Linearidade Padrão do Fluconazol

A partir da leitura espectrofotométrica de nove diluições, foi construída a curva de linearidade para o Fluconazol. Para a nanopartícula de quitosana contendo Fluconazol foi possível avaliar a eficiência de associação, com maior quantificação por 40%.

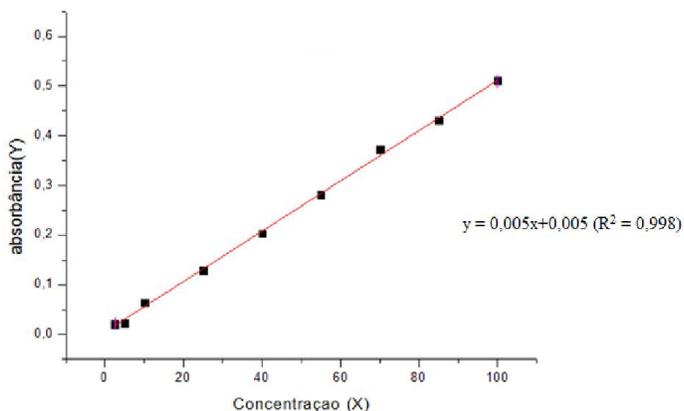


Figura 10 Curva Analítica do Fluconazol em µg/mL. Equação 6:  $y = 0,005x + 0,005$ .  $R^2 = 0,998$ .

### 5.5.1.2 Curva de Linearidade Padrão do Extrato de Própolis verde e Padrão de Quercetina

Após a leitura espectrofotométrica, os dados de absorbância foram plotados em gráfico gerando a equação para quantificação do extrato no interior da nanopartícula. Para a nanopartícula de quitosana contendo própolis livre, a eficiência de associação foi igual a 45,6%.

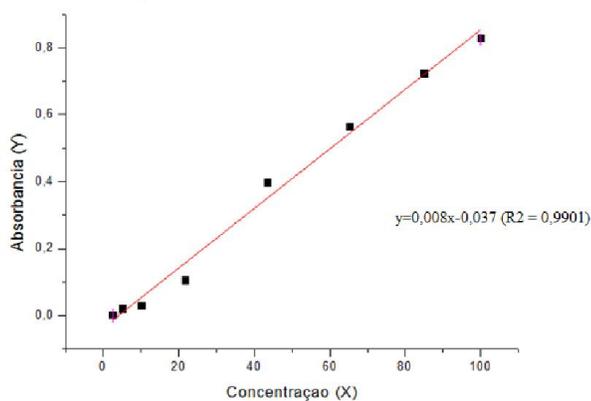


Figura 11 Curva Analítica da Própolis verde em µg/mL. Equação 7:  $y = 0,008x - 0,037$ .  $R^2 = 0,990$ .

Como visto anteriormente, na NCO dos compostos Própolis verde e Fluconazol, não é possível realizar a quantificação da Própolis por espectrofotômetro e no CLAE não encontramos padrão específico para a mesma. Uma curva de Linearidade padrão com quercetina para a quantificação de flavonóides totais foi realizada.

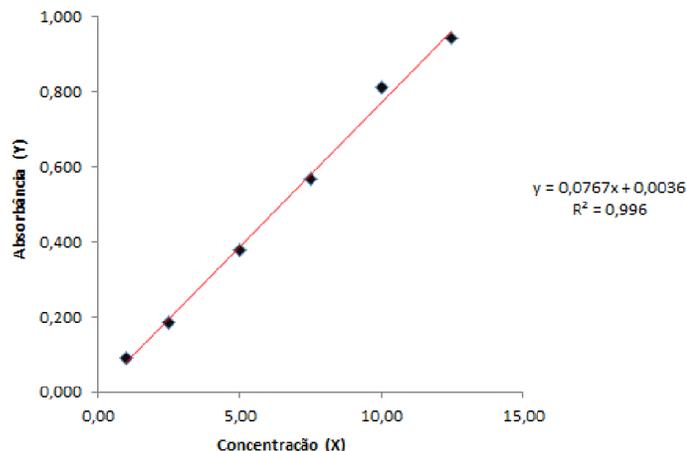


Figura 12 Curva Analítica do Padrão de Quercetina em µg/mL. Equação 7:  $y=0,0767x-0,0036$ .  $R^2 = 0,996$ .

### 5.5.2. Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação do Fluconazol por CLAE

O desenvolvimento do método de validação por CLAE foi realizado para quantificação do Fluconazol no sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada.

No sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada, utilizada como amostra para a validação e que continham os compostos Fluconazol e própolis verde, somente o Fluconazol foi validado, que se explica pela não identificação de padrão majoritário para a própolis verde.

#### 5.5.2.1 Conformidade do Sistema

Para verificar se o equipamento está gerando resultados de qualidade, e se estes são exatos e precisos, critérios de adequação do sistema foram analisados. Como descrito na Tabela 5, os critérios para adequação do sistema avaliados de acordo com FDA foram fator de retenção, resolução, fator de cauda e número de pratos teóricos, e mostraram que o método é adequado para a análise do composto fluconazol na amostra de sobrenadante da NCO.

Tabela 5 - Condições de separação para o parâmetro de conformidade do sistema

<i>Conformidade do Sistema</i>				
	Fator de Retenção (k)	Resolução (RSD)	Fator de Cauda (FT)	Número de Pratos Teóricos (N)
Padrão Fluconazol	2,36E+00	-	1,51E+00	1,24E+04

Nanop. Coencapsulada	2,31E+00	2,00E+00	1,39E+00	6,04E+03
Especificação	$\geq 2$	$\geq 2$	$\leq 2$	$\geq 2000$

Nas Figuras 14 e 15, os cromatogramas mostram os picos do fluconazol na nanopartícula e do padrão avaliados, e o espectro de absorção máxima mostram tais resultados.

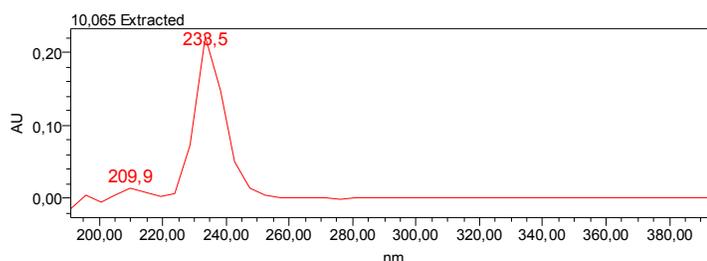


Figura 13 Espectro de absorção máxima do fluconazol na nanopartícula (233,5nm).

O comprimento de onda de absorção máxima para o Fluconazol no sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada foi 233,5nm no UV, no entanto o comprimento de onda de 261nm foi estabelecido para o método, pois ao avaliar o composto em 233,5nm o cromatograma não apresenta os compostos da própolis no sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada.

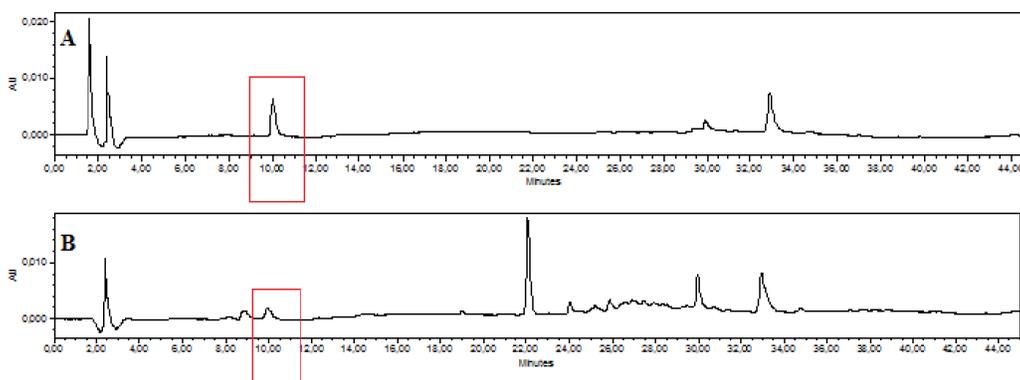


Figura 14 Perfis cromatográficos 2D a 261nm do padrão e da amostra

Legenda: A. Cromatograma do padrão sigma de Fluconazol com integração em 10,009min; B. Cromatograma da amostra de NCO com integração em 9,920min. CLAE (261nm).

### 5.5.2.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da identificação do Fluconazol e da própolis verde na amostra por comparação entre os tempos de retenção e espectro de absorção ultravioleta (190 a 400nm) dos picos obtidos na amostra e no padrão. Os cromatogramas dos diluentes metanol e água, e sobrenadante de nanopartícula, também foram avaliados para verificação de possíveis picos interferentes dos mesmos nas análises.

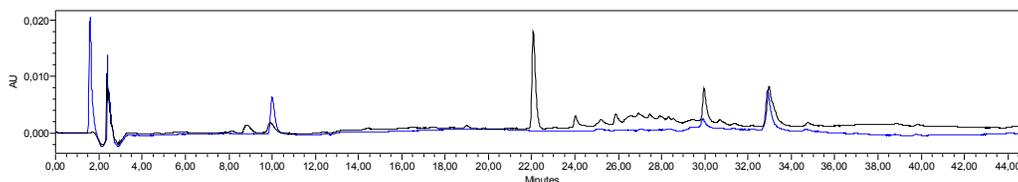


Figura 15 Perfil cromatográfico 2D a 261nm do padrão de Fluconazol sobreposto ao cromatograma da nanopartícula co-encapsulada.

Legenda: Azul: Cromatograma de padrão de fluconazol; Preto: Cromatograma do sobrenadante da NCO.

Os cromatogramas, conforme Figuras 16, 17, 18 e 19 demonstram que o método em questão é capaz de medir exatamente o composto fluconazol na amostra de sobrenadante de nanopartículas na presença de outros componentes, conforme estabelecido pela RDC 166/2017.

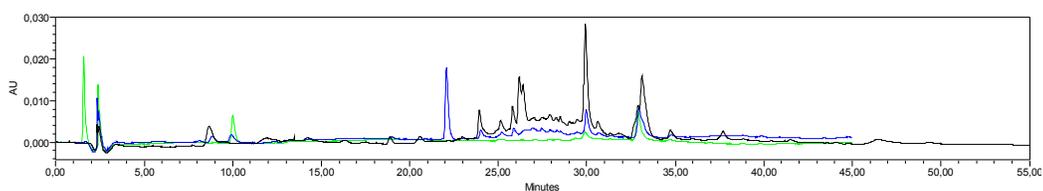


Figura 16 Perfil cromatográfico 2D a 261nm do padrão de Fluconazol sobreposto ao cromatograma da NCO, e cromatograma do extrato de Própolis verde.

Legenda: Azul: Cromatograma de sobrenadante de NCO; Preto: Cromatograma do extrato da Própolis verde; Verde: Cromatograma do Padrão de Fluconazol.

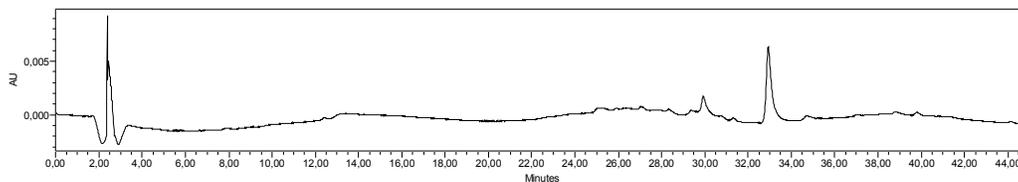


Figura 17 Perfil cromatográfico 2D a 261nm do diluente Metanol e Água.

Legenda: Preto: Cromatograma do diluente (Metanol e Água).

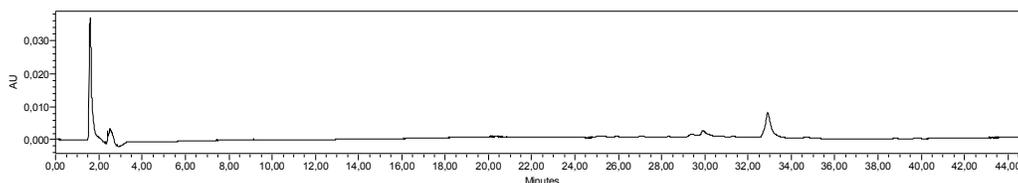


Figura 18 Perfil cromatográfico 2D a 261nm do diluente Sobrenadante da NV.

Legenda: Preto: Cromatograma do diluente (Sobrenadante da NV).

### 5.5.2.3 Linearidade

A curva de linearidade obtida pode ser visualizada na Figura 20. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos foi menor que 5% em todos os pontos da curva. Segundo a RDC 166/2017, o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, e o método foi considerado linear, demonstrando um coeficiente de correlação igual a 0,99912, e este resultado mostra que os dados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do composto na amostra.

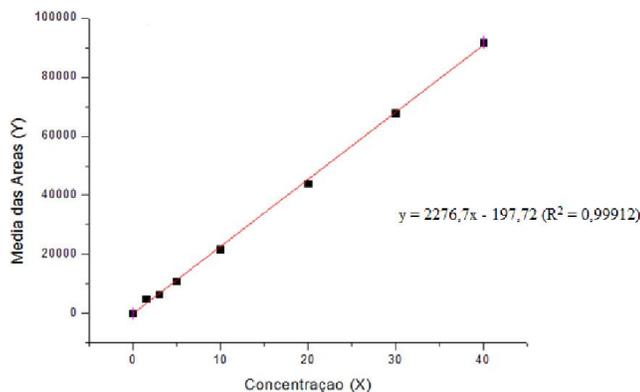


Figura 19 Curva de Linearidade do Padrão Fluconazol em  $\mu\text{g/mL}$  no CLAE. Equação 8:  $y = 2276,7x - 197,72$ .  $R^2 = 0,99912$

O intervalo especificado para trabalho compreende a faixa de  $1,5\mu\text{g/mL}$  a  $40\mu\text{g/mL}$ .

#### **5.5.2.4 Precisão**

Os valores de precisão quanto ao nível de repetibilidade e precisão intermediária são disponibilizados nas Tabelas 6 e 7.

Conforme preconizado na RDC 166/2017 o desvio padrão relativo para ambos os testes foi menor que 5% entre as triplicatas das concentrações baixa, média e alta.

Tabela 6 - Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de repetibilidade

<i>Intervalo</i>	<i>Massa (<math>\mu\text{g}/10\text{mL}</math>)</i>	<i>Concentração teórica (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</i>	<i>Area (<math>\mu\text{V}^*\text{S}</math>)</i>	<i>Concentração Real (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</i>	<i>Teor (%)</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>DPR</i>
	91	18,2	24165	10,70	58,80			
80%	91	18,2	25367	11,23	61,70	61,45	1,60	2,62
	91	18,2	25266	11,18	61,45			
	113	22,6	30204	13,35	59,08			
100%	113	22,6	31675	13,99	61,94	61,76	1,59	2,59
	113	22,6	31579	13,96	61,75			
	136	27,2	38178	16,86	61,97			
120%	136	27,2	39297	17,35	63,77	63,68	1,01	1,59
	136	27,2	39235	17,32	63,67			

Legenda: Concentração Teórica (Concentração a partir de partição); Area (área do pico de Fluconazol); Concentração Real (obtida através da curva de linearidade); Teor (% do Fluconazol na amostra); Média (média dos teores); DP (Desvio Padrão); DPR (Desvio Padrão relativo).

Tabela 7 - Valores equivalentes ao parâmetro de precisão ao nível de precisão intermediária

<i>Intervalo</i>	<i>Massa (µg)</i>	<i>Concentração teórica (µg/mL)</i>	<i>Area (µV*S)</i>	<i>Concentração Real (µg/mL)</i>	<i>Teor (%)</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>DPR</i>
	91	18,2	24539	10,86	59,70			
80%	91	18,2	25940	11,48	63,10	59,99	1,87	3,12
	91	18,2	24661	10,92	59,99			
	113	22,6	31064	13,73	60,76			
100%	113	22,6	32760	14,48	64,05	60,76	2,14	3,53
	113	22,6	30684	13,56	60,02			
	136	27,2	38472	16,98	62,44			
120%	136	27,2	38425	16,96	62,37	62,37	2,01	3,22
	136	27,2	36290	16,03	58,92			

Legenda: Concentração Teórica (Concentração a partir de partição); Area (área do pico de Fluconazol); Concentração Real (obtida através da curva de linearidade); Teor (% do Fluconazol na amostra); Média (média dos teores); DP (Desvio Padrão); DPR (Desvio Padrão relativo).

### 5.5.2.5 Robustez

Conforme RDC 166/2017, a robustez indica a capacidade do método em resistir a pequenas variações das condições de trabalho, neste teste alterou-se o fluxo, temperatura e coluna (Tabela 8), itens alterados conforme descrito na tabela 1 da RDC 166/2017 e todos apresentaram resultados satisfatórios com DPR inferior a 5%.

Tabela 8 - Avaliação do parâmetro robustez considerando variação de fluxo da fase móvel, temperatura e coluna em relação ao método original desenvolvido.

Condição		Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{S}$ )	Média ASC	Média entre Parâmetros	DP (%)	DPR (%)
Método Original Desenvolvido		31740		-	-	-
		30090	30775	-	-	-
		30775		-	-	-
Fluxo	0,8 mL/min	32111				
		33377	31925,5	31350,25	813,53	2,59
		34655				
	0,9 mL/min	32756				
		32115	32724	31749,50	1378,15	4,34
Temperatura	26°C	32724				
		30513				
		29659	29978	30376,50	563,56	1,86
	27°C	29978				
		30149	30063,5	30419,25	503,11	1,65
Coluna	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	28654				
		30792				
		29797	29369	30072,00	994,19	3,31
		28158				
		29369				

Legenda: ASC (Area Sobre a Curva); DP (Desvio Padrão); DPR (Desvio Padrão Relativo).

### 5.5.2.6 Exatidão

Nesta análise, a exatidão foi verificada adicionando-se quantidades conhecidas (concentração equivalente a 10 µg/mL) do padrão de Fluconazol às soluções da amostra em três níveis de concentração diferentes 80%, 100% e 120%.

Assim, conforme na Tabela 9, os valores estão entre 80% a 120% e os intervalos de recuperação foram de 95,4% a 103,4%, com média de 98,2%, Desvio Padrão de 0,8% e Desvio Padrão Relativo de 0,9%.

Tabela 9 - Valores referentes ao Parâmetro de Exatidão pelo Método de Recuperação do Padrão de Fluconazol

<i>Intervalo</i>	<i>Massa (µg/10mL)</i>	<i>Area sem Padrão</i>	<i>Area com Padrão</i>	<i>Area Padrão</i>	<i>Concentração Obtida Padrão</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>DPR</i>
80%	99	24965	24753	24541	10,86	100,11	97,41	1,79	1,83
	99	25797	24751	23705	10,50	96,73			
	99	25577	24726	23875	10,57	97,41			
100%	124	31914	28164	24414	10,81	99,60	98,21	0,89	0,90
	124	31727	27866	24005	10,63	97,94			
	124	31937	28005	24073	10,66	98,22			
120%	149	39811	31597	23383	10,36	95,43	96,41	4,34	4,50
	149	38608	31117	23626	10,46	96,41			
	148	39541	32446	25351	11,22	103,40			

Legenda: Area com Padrão (Area do Fluconazol no sobrenadante da NCO acrescida do padrão de Fluconazol); Area Padrão (área do pico do padrão na concentração que foi adicionada na amostra); Recuperação (quantidade do fluconazol na amostra de sobrenadante de nanopartícula na amostra); DP (Desvio Padrão); DPR (Desvio Padrão Relativo).

### 5.5.2.7 Limites de Detecção e Quantificação

Segundo a RDC 166/2017, calculou-se o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas e a média da inclinação das mesmas, e os limites de detecção e quantificação foram calculados através das suas fórmulas. Os valores de detecção foram 0,20 µg/mL e 0,62 µg/mL para quantificação.

### 5.5.2.8 Efeito Matriz

Segundo a RDC 166/2017, o efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração do padrão em solvente e com a amostra fortificada com o padrão. Assim, como mostra a Figura 21, o paralelismo das retas indicou a ausência de interferência dos constituintes da matriz e sua demonstração foi realizada com análise estatística com resultado de nível de significância menor que 5%.

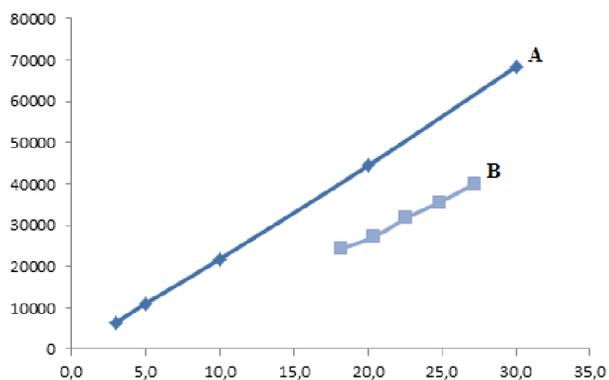


Figura 20 Gráfico do Teste de Paralelismo

Legenda: A. Amostra fortificada com padrão. B. Padrão.

### 5.6. Teste de Liberação *In Vitro*

O teste de liberação foi realizado mimetizando o processo biológico *in vivo* com a verificação por período programado para avaliar a porcentagem de liberação dos compostos a partir do seu material particulado.

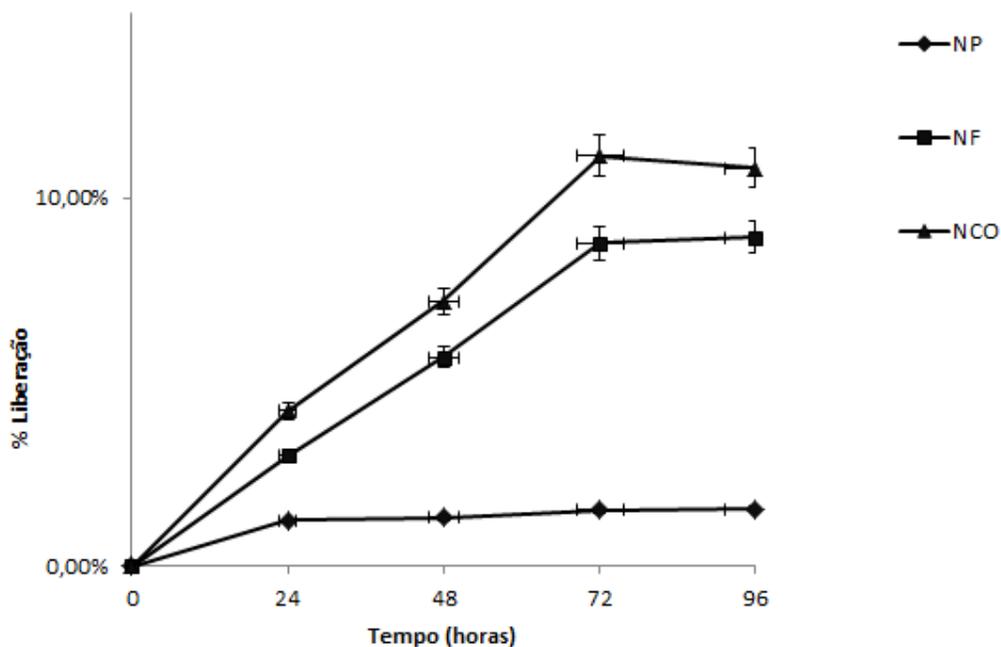


Figura 22 Gráfico do Ensaio de Liberação de Nanopartículas. Fonte: Programa Excel

Legenda: Gráfico de Liberação de NP, NF e NCO, mostrando dados de liberação em 24, 48, 72 e 96 horas.

Dados de 1º hora de análise (demonstrada como dia 0 na figura 22) demonstram a inicialização da análise retirando-se todo o sobrenadante das nanopartículas retirando-se a porcentagem de fármaco livre no sobrenadante da nanopartícula até 1 hora após preparo. Foram avaliados então a porcentagem de liberação no período de 24, 48, 72 e 96 horas. A quantidade de liberação para os compostos em todas as amostras de nanopartículas iniciou-se em 24 horas, indicando que uma curva crescente no período de até 72 horas (figura 22). No entanto, a partir de 72 horas de análise a taxa de liberação alcança estabilidade na liberação dos compostos, demonstrando que sua liberação atingiu um platô de liberação.

## 5.7. Análise de Citotoxicidade

### 5.7.1. Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado para os compostos livres e nanopartículas de quitosana (vazia), nanopartículas de quitosana encapsulando o fluconazol, nanopartículas

de quitosana encapsulando a própolis e nanopartículas de quitosana co-encapsulando o fluconazol e própolis (Figuras 23 e 24).

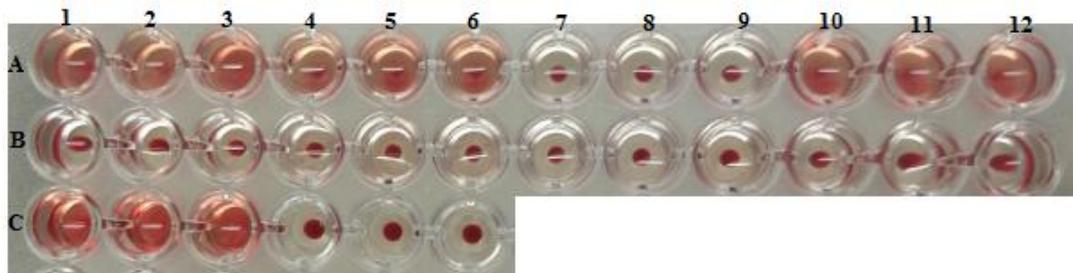


Figura 21 Placa de 96 poços do ensaio de hemólise após centrifugação da placa em V.

Legenda: Linha A/ Colunas 1 a 3: Própolis 4mg, Linha A/Colunas 4 a 6: própolis 2mg, Linha A/COLUNAS 7 a 9: Fluconazol, Linha A/ Coluna 1 a 12: Propolis 4 mg + Fluconazol 32 $\mu$ g. Linha B/ Colunas 1 a 3: NV, Linha B/Colunas 4 a 6: NP, Linha B/COLUNAS 7 a 9: NF, Linha B/ Coluna 1 a 12: NCO. Linha C/ Colunas 1 a 3 Controle Positivo, Linha C/ Colunas 4 a 6: Controle Negativo. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata.

Conforme Figura 23, nos testes com própolis verde, independente da concentração, foi verificada hemólise celular (formação de malha nos poços), com valores de absorvância similares ao controle positivo, no entanto fluconazol e nanopartículas não apresentaram resultados tóxicos para a célula (formação de botão de hemácias no fundo da placa).

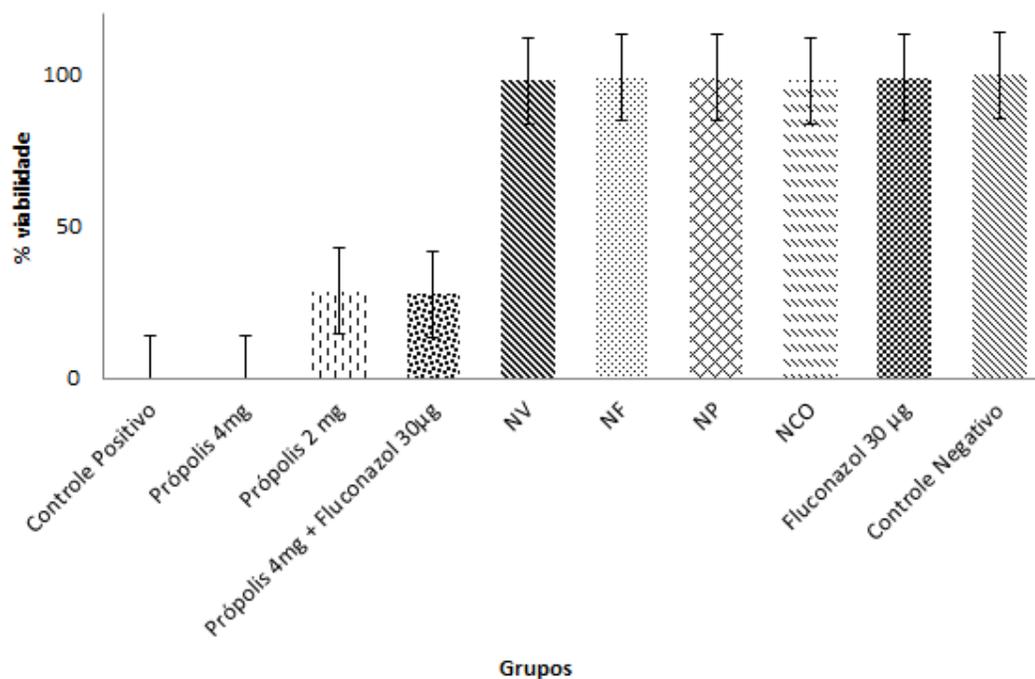


Figura 22 Gráfico do Ensaio de Hemólise.

Legenda: Resultados são apresentados com média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios independentes em triplicata.

Nas nanopartículas, conforme verificado na Figura 24, os resultados do teste de hemólise demonstraram que as mesmas apresentaram viabilidade celular semelhante ao controle negativo, o mesmo se aplica para o Fluconazol livre. Não foi detectada toxicidade pelo ensaio de hemólise para as nanopartículas, diferentemente para própolis verde livre. Resultados para a própolis verde em diferentes concentrações apresentaram atividade tóxica nas concentrações de 4mg (100% de hemólise), 2mg (71,3% de hemólise) e em sinergismo com o Fluconazol (72,2% de hemólise), dados confrontados com o controle positivo. Para as nanopartículas o efeito tóxico é minimizado. Na nanopartícula co-encapsulada de própolis e Fluconazol, não houve atividade hemolítica.

### 5.7.2. Teste de Citotoxicidade usando como modelo *Galleria mellonella*

Verificações diárias foram realizadas nas larvas de *G. mellonella*, que foram injetadas com compostos na concentração equivalente a 1mg/kg, utilizando como parâmetro de avaliação dados físicos e comportamentais de cor, motilidade (Figura 25), formação de pupa, morte ou normalidade das mesmas (Figura 26) no período de 7 dias.

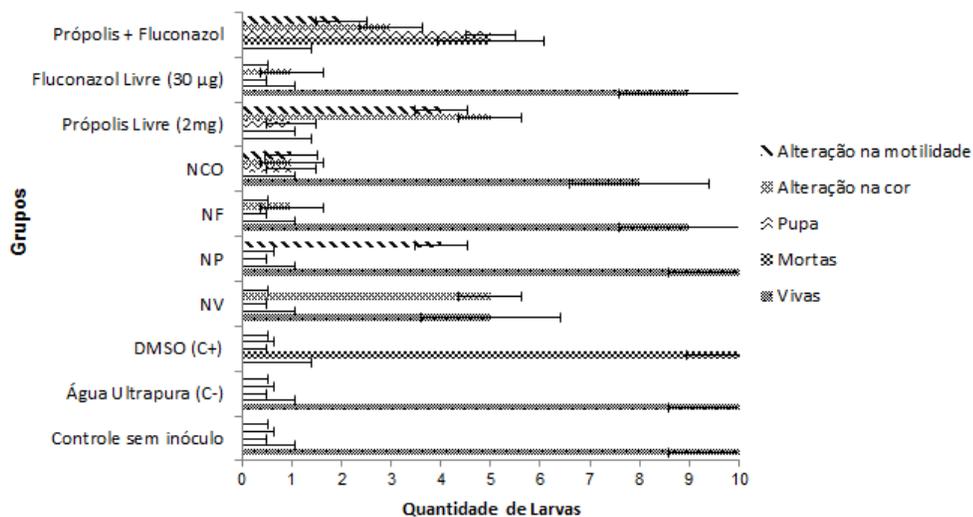


Figura 23 Gráfico do Ensaio de Toxicidade por *Galleria mellonella*

Legenda: Teste de Citotoxicidade usando como modelo *Galleria mellonella*.  $N=10$  larvas testadas para cada grupo de tratamento avaliando por 7 dias o comportamento, forma e sobrevivência das larvas. Dados são apresentados com média e  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata.

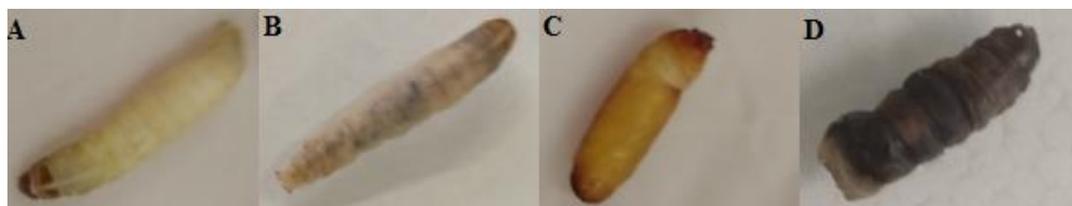


Figura 24 Larvas de *Galleria mellonella*

Legenda: Imagens ilustrativas para as formas encontradas da larva. A: Larva normal; B: Larva com alteração na cor. C: Larva em formação de pupa; D: Larva morta.

Os grupos para controle foram avaliados, conforme descrito em literatura por outros autores (Trein *et al*; 2018), utilizando a injeção de água ultrapurificada como um parâmetro negativo, juntamente com o controle sem inóculo, para avaliar se a técnica de injeção com a agulha de Hamilton provocaria alterações nas amostras. O controle positivo, utilizando o DMSO como agente tóxico, na forma pura, sem diluições. Todos os resultados dos controles foram satisfatórios.

No ensaio com *G. mellonella* verificou-se que as nanopartículas apresentaram resultados condizentes com o ensaio de hemólise, conforme verificado na Figura 25, a maioria das larvas permaneceram inalteradas (Figura 26 A). No entanto, foram

verificadas pequenas alterações na cor (Figura 26 B) e motilidade para a forma nanoencapsulada de co-encapsulação, NV e NF. Outros dados foram visualizados como a formação de pupa antes do fim do prazo de testes (Figura 26 C). Dados compatíveis à toxicidade foram verificados em ensaios com própolis livre e no grupo de sinergismo entre própolis e Fluconazol, demonstrando o aparecimento de mortes das larvas (Figura 26 D) e alterações na motilidade e cor.

## 5.8. Teste *In Vivo* em modelo Murino

### 5.8.1. Análise de Carga Fúngica

A análise de carga fúngica foi realizada para verificar a taxa de recuperação fúngica a partir de diferentes tratamentos no período de 7 dias. A análise de carga fúngica, conforme Figura 27, mostra a eficácia dos tratamentos em comparação ao controle positivo. Foi observado que não houve crescimento fúngico nas amostras do grupo não infectado, identificados como Controle Negativo. Grupo de infectados, tratados com PBS, utilizados como controle positivo, apresentaram alto grau de infecção, com carga fúngica elevada.

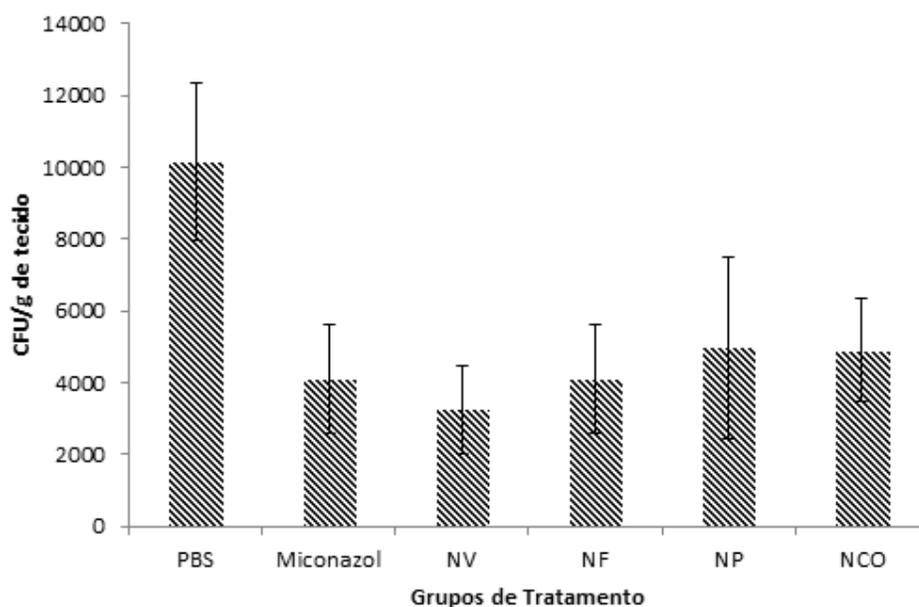


Figura 25 Ensaio de Análise de Carga Fúngica

Legenda: Análise da quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) dos tecidos vaginais infectados com o fungo *C. albicans* utilizando diferentes tratamentos.

Dados são apresentados com média e  $\pm$  desvio padrão de experimento em triplicata.  $P < 0.05$  para diferenças entre controle e tratamento de nanopartícula co-encapsulada.

O tratamento com miconazol reduziu a carga fúngica em aproximadamente 60% comparado ao controle positivo. Os tratamentos realizados com as nanopartículas resultaram em médias de aproximadamente 50% de inibição, quando comparados ao controle positivo.

Os dados apresentados indicam que houve eficácia nos tratamentos realizados, e nas nanopartículas vazias e com Fluconazol apresentaram os melhores resultados. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de variância (ANOVA), a mesma indicou que embora haja diferença estatística entre o controle positivo e os tratamentos realizados, não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento.

### **5.8.2. Análise Histopatológica**

As análises histopatológicas dos tecidos vaginais foram realizadas observando-se 10 campos por lâmina, em aumento de 400x, com verificações quanto às diferenciações nas colorações de Hematoxilina-Eosina (usado para diferenciação tecidual em partes basófilas e acidófilas) e PAS (identificação de *C. albicans*).

Foram analisados 7 grupos com  $n$  igual a 5 tecidos vaginais conforme a indicação de tratamento. No grupo infectado e tratado com PBS, utilizando como controle positivo, foi verificada uma hiperplasia discreta dos fragmentos utilizados, com presença de raros neutrófilos e hiperkeratose acentuada (Figura 28 A-HE, setas), nesta mesma região, a partir da coloração de PAS identifica as leveduras e hifas presentes no lúmen tecidual, mas não chegam até o epitélio, ficando restritas a região da Ceratina (Figura 28 A-PAS, setas). No grupo não infectado e tratado com PBS, identificado como controle negativo, não foram visualizadas evidências de crescimento fúngico nas lâminas coradas com PAS, conforme pode ser verificado na Figura 28 B-PAS, no entanto foi verificada a presença de neutrófilos e microabscessos no epitélio (Figura 28 B-HE setas).

Nas análises de fragmentos teciduais da NV (Figura 28 C-HE e C-PAS), verificou-se raros indícios de hiperplasia, hiperkeratose com neutrófilos na submucosa e leveduras na camada córnea (setas). O tratamento com nanopartículas de co-encapsulação da própolis verde e Fluconazol (Figura 28 D-HE e D-PAS), demonstrou através da coloração de HE presença de hiperplasia, hiperkeratose e raros neutrófilos na submucosa

(Figura 28 D-HE, setas) e na coloração de PAS (Figura 28 D-PAS), leveduras foram facilmente identificadas na camada córnea e luz tecidual (setas).

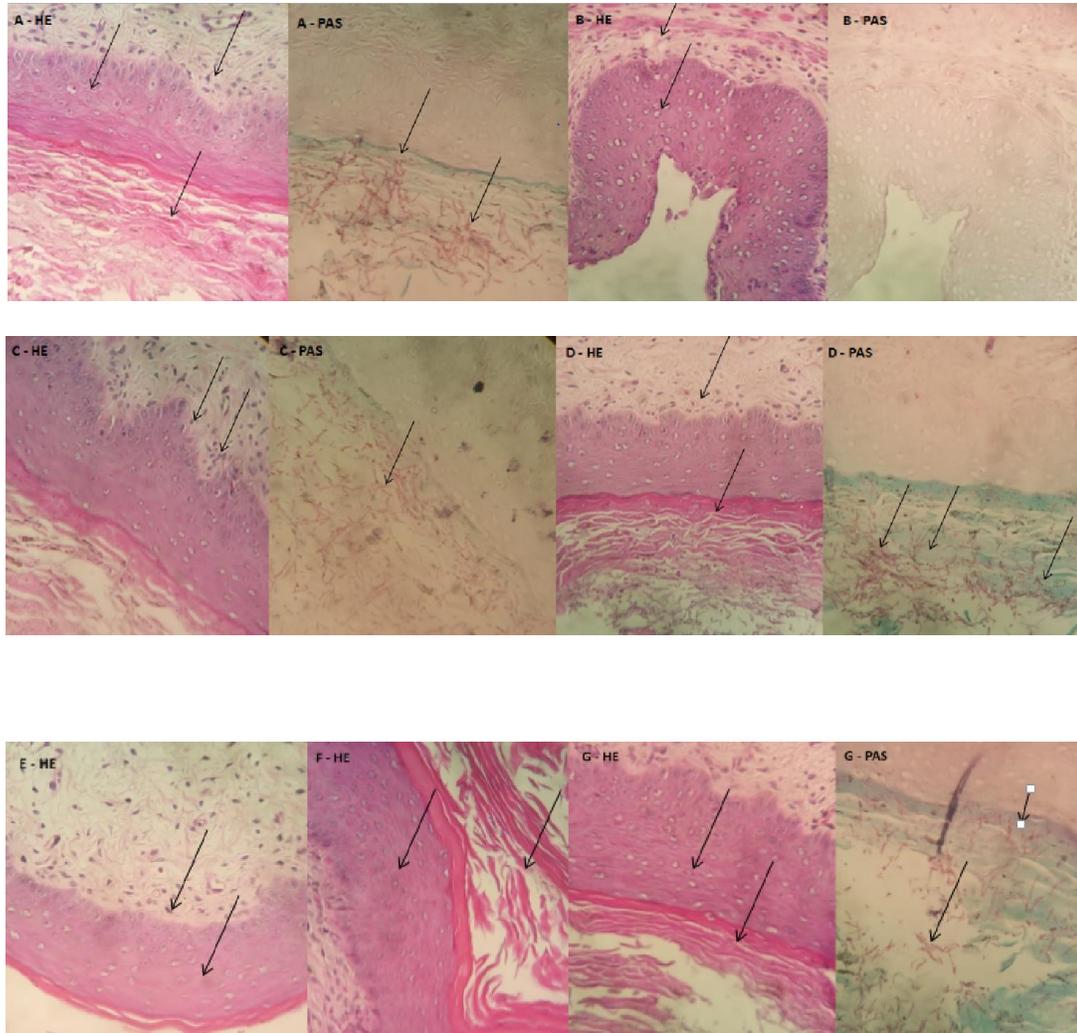


Figura 26 Ensaio de Histopatológico de Tecido Vaginal

Legenda: Imagens dos fragmentos de tecido vaginal corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e PAS. A-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com PBS, corados por HE. A-PAS: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com PBS, corados por PAS. B-HE: Tecido vaginal de camundongos não infectados e tratados com PBS, corados por Hematoxilina-Eosina. B-PAS: Tecido vaginal de camundongos não infectados e tratados com PBS, corados por PAS. C-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com NV, corados por Hematoxilina-Eosina. C-PAS: Tecido vaginal

de camundongos infectados e tratados com NV, corados por PAS. D-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com NCO, corados por Hematoxilina-Eosina. D-PAS: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com nanopartícula co-encapsulada, corados por PAS. E-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com miconazol, corados por Hematoxilina-Eosina. F-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com NF, corados por Hematoxilina-Eosina. G-HE: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com NP, corados por Hematoxilina-Eosina. G-PAS: Tecido vaginal de camundongos infectados e tratados com NP, corados por PAS.

Para o grupo de tratamento com miconazol (Figura 28 E-HE), embora tenha a visualização de neutrófilos na submucosa (seta), não demonstrou alterações no epitélio. Resultados semelhantes ao de tratamento com NV foram verificados para as nanopartículas de própolis (Figura 28 G-HE e G-PAS) e Fluconazol (Figura 28 F-HE), diferenciando-se somente pela presença de neutrófilos e as leveduras se estenderem da camada córnea a luz (Figura 28 F-HE, G-HE e G-PAS).

## 6. DISCUSSÃO

---

A nanotecnologia é uma área vasta que estuda o desenvolvimento de partículas, em escala nanométrica (Ahlawat *et al.*; 2018), que podem ser aplicadas em diagnóstico, tratamentos e aprimorar a obtenção de resultados no paciente a partir da administração de fármacos, apresentando boa biodistribuição, menores efeitos adversos e entrega direcionada (Rizeq *et al.*; 2019). Com sua utilização baseada em princípios biológicos pode atingir novos níveis de sensibilidade, seletividade, efetividade e estabilidade na administração e entrega dos fármacos, diminuindo as limitações encontradas nas formas convencionais. Formulações convencionais, de modo geral, em comparação aquelas usando os princípios da nanotecnologia, apresentam efetividade e seletividade reduzidas, baixa biodistribuição, e uma maior taxa de degradação do ativo (Assa *et al.*; 2016).

Nanopartículas poliméricas têm sido estudadas para atuar na melhora terapêutica de fármacos, com ação em sítios biológicos para terapia e diagnóstico (Costa *et al.*; 2018; Amaral *et al.*; 2019; Cé, *et al.*; 2020). Neste trabalho, nanopartículas de quitosana foram preparadas seguindo o método de gelificação iônica proposto por Calvo *et al.* (1997), um método com preparo relativamente simples, que exige poucos equipamentos, curto espaço de tempo e a técnica tem um custo econômico baixo para sua execução (Debnath *et al.*; 2011).

A quitosana é um polímero natural com grau de desacetilação e peso molecular controlável, apresenta boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, possui propriedades antimicrobianas, baixa toxicidade, tem boa adesão e atividade imunoestimulante (Debnath *et al.*; 2011). Com potencial para formação de pequenas partículas, esta permite a encapsulação simultânea de diferentes fármacos, apresenta carga superficial positiva e propriedades mucoadesivas, que aumentam o tempo residual no sítio de absorção, e tem sido motivo de escolha para *drug delivery* em formulações mucoadesivas pois aumentam a taxa de dissolução de fármacos poucos solúveis aumentando sua absorção (Debnath *et al.*; 2011; Costa *et al.*; 2018).

Ensaio com diferentes proporções entre polímero e agente reticulante, demonstram a influência que os mesmos podem exercer sobre o tamanho, dispersão das partículas e poder de associação com os compostos (item 5.2). A combinação 2:1 de polímero *versus* agente reticulante promoveu o preparo de partículas de tamanho médio de 316,5nm, PDI de 0,39 e um potencial de carga positivo 38,7mV (Tabela 5). Formou-se

uma solução de dispersão de nanopartículas de coloração gelo, aspecto gelatinoso (Figura 6) e partículas com formato irregular e aspecto opaco (Figura 7).

As propriedades físicas são semelhantes aos encontros de outras pesquisas para tratamento de CVV. Costa *et al* (2018) e Amaral *et al* (2019), demonstram a utilização de nanopartículas de quitosana com diâmetro aproximado de 300nm, PDI menor que 0,3 e potencial Zeta positivo, no tratamento para infecções fúngicas do tecido vaginal. Tamanho entre 50 e 300nm juntamente ao seu potencial de carga superficial positivo, são eficientes para aplicações em mucosas (Roger *et al*; 2010), por apresentarem sinais de ligação com o tecido mucoso, facilitando a aderência as membranas celulares por suas cargas superficiais negativas. A homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, representado por valores de PDI, e ausência de agregados de partículas, visualizado na presença de repulsão eletrostática promovida pelo potencial Zeta, indicam particularidades de melhor estabilidade da formulação (Ong *et al*; 2017; Amaral *et al*; 2019); e tais características podem permitir maior permanência no sítio de ação para liberação do ativo.

A associação da nanopartícula de quitosana ao fármaco convencional Fluconazol, foi pensada para verificar se, a partir das diferenças de solubilidade entre fármaco e sítio de ação, o Fluconazol na formulação nanoencapsulada teria eficácia ao ser administrado na forma tópica, aumentando assim sua absorção. E se, este, em união com um composto natural com propriedades antimicrobianas conhecidas, como a própolis verde, haveria um efeito sinérgico promovendo melhores respostas terapêuticas em infecções como CVV.

O estudo a cerca do sinergismo entre própolis verde e Fluconazol, e seu efeito de inibição fúngica, fortalecem a base para o desenvolvimento da partícula nanoestruturada de co-encapsulação. Ensaio de suscetibilidade antifúngica demonstraram sua eficácia (item 5.1) com inibição do crescimento do microrganismo *C. albicans* ATCC 10231 em baixas concentrações dos compostos, como resultados descritos no CLSI M27A2 para o Fluconazol e Ong *et al* (2017) para própolis verde.

Nas nanopartículas, ótimos resultados foram verificados para NF (CIM de 3,07µg/mL), no entanto, nanopartículas de própolis verde (extrato total 152,18µg/mL e flavonóides totais 22,7µg/mL) e nanopartículas provenientes da co-encapsulação (CIM de 158,3µg/mL para extrato total e Fluconazol e 28,82µg/mL flavonóides totais e Fluconazol) quando comparadas a suscetibilidade antifúngica promovida pelos compostos livres, demonstram melhores resultados. A eficácia das nanopartículas de

quitosana encapsulando a própolis verde foi estudada em ensaios realizados por Ong *et al* (2017), neste é testada a eficácia da inibição em biofilmes bacterianos. A efetividade da própolis encapsulada foi verificada na concentração de 100µg/mL do extrato total de própolis verde, nesta concentração houve a redução de 70% da carga do biofilme, verificando-se que com o aumento na concentração havia o aumento na eficácia da nanopartícula.

Nanopartículas de quitosana, identificadas como NV, embora não haja associação com compostos ativos também apresentaram efetividade. Sua eficácia pode ser explicada a partir das propriedades antimicrobianas presentes no polímero. Assim, a partir dos dados apresentados é possível inferir que a combinação das propriedades antimicrobianas do polímero com os compostos ativos indicou sinergismo, mas este envolveu não só a associação dos compostos, mas a formação de um complexo antimicrobiano na totalidade da partícula.

Desafios durante a verificação da eficiência de associação dos compostos foram primordiais na definição das metodologias para este ensaio. Foi verificado que Fluconazol e própolis verde apresentam pico de comprimento de ondas de absorção máxima similar (Figura 10), que quando em sinergismo não permite a quantificação isolada dos compostos por técnicas simples como espectrofotometria de UV visível. O Fluconazol foi quantificado por CLAE a partir de validação de metodologia analítica realizada conforme RDC nº166 de 24 de julho de 2017.

A definição e separação dos picos de Fluconazol e própolis verde no sobrenadante da nanopartícula co-encapsulada foi um processo árduo que envolveu 40 métodos de separação diferentes (dados não mostrados), variando composição e proporção de fase móvel, temperatura e vazão (Tabela 1). No entanto, com a composição variada de diferentes substâncias ativas no extrato total de própolis verde, não foi possível a identificação dos compostos majoritários para sua quantificação durante a validação. Embora a separação dos picos tenha sido bem sucedida, a quantificação para a própolis não retornou em dados satisfatórios, induzindo a quantificação por métodos indiretos, como a quantificação de flavonóides totais.

A eficiência de associação de 38,3% foi verificada para o Fluconazol e sua taxa de liberação foi de 22% em até 72 horas. As taxas de liberação dos compostos foram doseadas a partir do ensaio de liberação, empregando um teste com parâmetros que mimetizem um ambiente biológico com pH acidificado. Processo semelhante foi utilizado para a quantificação de própolis verde, esta foi testada por espectrofotômetro

UV Vis para a quantificação de flavonóides totais e extrato total. A quantificação de flavonóides totais demonstrou eficiência de associação de 5,23% na nanopartícula co-encapsulada, e 45,6% do extrato total para a NP verde, apresentando taxa de liberação de 9,3% em até 72 horas. Neste mesmo período, a nanopartícula co-encapsulada liberou taxa de 48,44% dos compostos em sinergismo, no entanto atingiram nível de estabilização na liberação em até 96 horas.

A utilização de modelo biocompatível, provido de substâncias naturais, com sua estrutura conhecida, e metodologia padronizada, leva a acreditar que o método é seguro e com efeitos adversos menores ou inexistentes. No entanto, o uso de nanopartículas podem trazer inúmeros desafios em relação à toxicidade, principalmente em relação à forma de administração e estratégia de entrega do ativo. Substâncias ativas e componentes da estrutura da nanopartícula devem ser testadas, podendo ter influência reativa em diversas situações comportamentais e físicas, como nas superfícies iônicas ou devido ao seu tamanho (Cé, *et al*; 2020).

Testes com eritrócitos, avaliados através do teste de hemólise, e o teste utilizando o modelo *G. mellonella* foram utilizados como forma de demonstrar resultados de toxicidade na análise de nanopartículas. No ensaio de hemólise, as amostras de própolis verde na forma livre, foram os únicos compostos a apresentarem resultados tóxicos em todas as concentrações testadas, com resultados de lise celular comparáveis ao controle positivo. A verificação no modelo de *G. mellonella* testado por período de 7 dias, apresentou resultados semelhantes de toxicidade para a própolis verde na forma livre, com aparecimento de alterações na motilidade e coloração das larvas (Figura 25), com morte no grupo de sinergismo com Fluconazol, com resultados diferentes dos apresentados nos controles negativo e de veículo.

A utilização do modelo *in vivo* de *G. mellonella* indicou pequenas alterações na coloração e motilidade em larvas do grupo de tratamento com as nanopartículas, principalmente para a nanopartícula de co-encapsulação. Contudo, quando faz-se a comparação com o teste de hemólise, o qual não demonstrou resultados indicativos de toxicidade e apresentou resultados comparáveis ao controle negativo, levantamos questionamentos a respeito de outros parâmetros não relacionados a nanopartícula, como erros durante a inoculação, estado e comportamento relacionado a própria larva que possam interferir nos resultados.

Em ambos os ensaios, indícios de toxicidade foram verificados nos testes com os grupos contendo própolis livre, e quando em sinergismo com Fluconazol livre; estes dados mostram que o composto isolado pode ter um efeito tóxico, mesmo quando em sinergismo com outra substância, e não é indicado para uso livre em formulação para mucosa. Assim, conforme verificado no teste de hemólise, a forma nanoencapsulada do composto faz uma proteção contra os efeitos tóxicos, indicando que mesmo o composto sendo tóxico, em sua forma encapsulada, pode sofrer uma diminuição do efeito adverso.

A comparação de resultados de toxicidade da *G. mellonella* com outros ensaios *in vivo* pode ser feita, no entanto podem indicar resultados iguais em ambos os modelos, ou pode apresentar efeito tóxico em menor ou maior proporção na *Galleria* que no modelo murino. Levando em consideração que resultados de toxicidade nas larvas podem ser considerados positivos para toxicidade nos camundongos, o modelo *in vivo* permite uma avaliação melhor em relação à capacidade de toxicidade dos compostos e podem ser considerados como preditores confiáveis para avaliação da toxicidade e podem ser um elo de ligação entre os testes *in vitro* e *in vivo* (Cé, *et al*; 2020).

Camundongos da linhagem Balb/c fêmeas, foram utilizados como modelo para o tratamento de CVV. Neste modelo, foi necessário promover a estratificação do epitélio vaginal, com a indução de um estado pseudo-estro e deposição do estrogênio nas paredes vaginais, a partir de administração de doses hormonais (Valerato de Estradiol), com a finalidade de promover maior aderência fúngica e indução de CVV. Após os tratamentos com administração diária por um período de 7 dias, e realização da eutanásia, as vaginas foram retiradas para promoção da recuperação da carga fúngica e análise histopatológica (Yano & Fidel; 2011).

O tratamento das nanopartículas co-encapsuladas com Fluconazol e própolis verde foram avaliadas em comparação ao grupo infectado com *C. albicans* e tratado com PBS. Na análise de carga fúngica o índice de recuperação indicou inibição em aproximadamente 50% da carga fúngica do tratamento com a NCO(Figura 27). Tratamentos realizados com as nanopartículas e controle miconazol foram semelhantes com análise das médias de cada grupo de tratamento. Para controle negativo (dados não mostrados) não apresentando recuperação fúngica. Resultados semelhantes para os dados de UFC foram verificados em modelo desenvolvido por Costa *et al* (2018). Nos tratamentos utilizando as nanopartículas houve uma intensa redução na carga fúngica.

Análise estatística utilizando o teste de variância, dos grupos de tratamento com nanopartículas e miconazol com controle positivo (infectado e tratado com PBS),

apresentaram diferença, no entanto entre os grupos de tratamento (nanopartículas e miconazol) não houve diferença estatística.

Durante a análise histopatológica dos tecidos vaginais, avaliou-se as características de cada grupo de tratamento. O grupo infectado e tratado com PBS, utilizado como controle positivo, apresentou características de infecção fúngica com a presença de leveduras no lúmen do tecido, restritas a região da queratina não alcançando o epitélio (coloração de PAS). Como descrito em outros trabalhos como Costa *et al* (2018) e Amaral *et al* (2019), foi observada a presença de uma hiperqueratose com presença de células do sistema fagocítico (neutrófilos) nos grupos de tratamentos. A hiperqueratose, caracterizada pelo aumento da camada córnea pode ser devida a administração hormonal que promove a estratificação do epitélio, facilitando, juntamente com o Ph vaginal nos camundongos, para a promoção de crescimento fúngico. A partir da infecção, pode ocorrer a migração de neutrófilos como resposta a um processo inflamatório promovido pela infecção. Os camundongos são assintomáticos para este tipo de infecção, no entanto, a avaliação e presença dos neutrófilos pode ser indicação simples e confiável de inflamação (Yano & Fidel; 2011).

A comparação dos resultados *in vitro* e *in vivo* permitem inferir que a formulação desenvolvida tem eficácia. Suas propriedades físicas são compatíveis com o uso em mucosas, e embora a eficiência de liberação e encapsulação apresentar taxas baixas, a mesma demonstra efetividade na inibição fúngica conforme carga testada. O uso dos compostos de forma isolada gera efeitos tóxicos, mas quando encapsulados promove proteção, diminuindo os efeitos tóxicos iniciais. A partícula, por ser preparada a partir de polímero e compostos naturais, sendo estes biocompatíveis, podem cumprir com o objetivo inicial de desenvolvimento de nova formulação e atender à comunidade em casos positivos para a CVV.

## 7. CONCLUSÕES

---

Nanoestruturas mucoadesivas foram preparadas com a finalidade de encapsular o Fluconazol e a própolis verde testando o seu sinergismo para tratamento de CVV. Neste trabalho, definimos a CIM pelo método de microdiluição em caldo para o Fluconazol, própolis verde, avaliando seu sinergismo e o efeito das nanopartículas em *Candida albicans* ATCC 10231. Investigou-se a taxa de liberação e toxicidade (através de teste com eritrócitos e *Galleria mellonella*) do sistema nanoestruturado demonstrando sua atividade fúngica e a sua eficácia terapêutica frente ao modelo mucoadesivo *in vivo* em murinos, com análises de carga fúngica e histopatológico dos tecidos vaginais, e estes sugerem, a partir dos resultados apresentados, que as nanopartículas co-encapsuladas com capacidade fungistática sobre *C. albicans*, não apresentam efeitos adversos tóxicos, tiveram boa redução da carga fúngica frente aos grupos controle e podem servir como um modelo terapêutico eficaz para tratamentos de CVV.

## **8. PERSPECTIVAS**

---

Sugere-se a realização de mais testes *in vitro* para o desenvolvimento das nanopartículas, a fim de complementar o presente estudo conferindo maior segurança e perfil de efetividade às formulações, antes que sejam empregadas na utilização *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

---

1. Ahlawat J, Henriquez G, Narayan M. Enhancing the delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules*, 23, 2157. 2018.
2. Amaral AC, Saavedra PHV, Souza ACO, Melo MT, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MSS, Bocca AL. Miconazole loaded Chiton-based nanoparticles for local treatment of vulvovaginal candidiasis fungal infections. *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*. 174 409-415, 2019.
3. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59-82. 2010.
4. Assa F, Jafarizadeh-Malmiri H, Ajamein H, Vaghari H, Anarjan N, Ahmadi O, Berenjian A. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Critical Reviewa in Biotechnology*. 2016.
5. Aulton ME, Taylor KMG. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. Elsevier. 2016.
6. Barousse MM, Pol BJVD, Fortenberry D, Junior FPL. Vaginal yeast colonization, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescentes. *Sex Transm Infect*. 80:48-53. 2004.
7. Bernardis F, Arancia S, Sandini S, Graziani S, Norelli S. Studies of Immune Responses in Candida vaginitis. *Pathogens*. 967-707. 2015.
8. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014.
9. Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse AS, Mietzner TA. *Micobiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg – 26º Edição*. AMGH. 2014.
10. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *John Wiley & Sons*, 125-132, 1997.
11. Cé R, Silva R C, Trentin D S, De Marchi J G B, Paese K, Guterres S S, Macedo A J, Pohlmann A R. Galleria mellonella Larvae as na In Vivo Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. Vol 20, 1486 – 1494. 2020.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 – Refernce Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3º Edition, 2008.

13. Costa AD, Araujo DE, Cabral MS, Brito IT, Leite LBM, Pereira M, Amaral AC. Development, characterization, and in vitro-in vivo evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for Treatment of vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 1-11. 2018.
14. Debnath S, Kumar R S, Babu M N, Ionotropic Gelation – A Novel Method to Prepare Chitosan Nanoparticles. *Research J. Pharm. And Tech.* 4. 2011.
15. Dota KFD, Freitas AR, Consolaro MEL, Svidzinski. A Challenge for Clinical Laboratories: Detection of Antifungal Resistance in Candida Species Causing Vulvovaginal Candidiasis. *Science*. Vol 2, N2. 2011.
16. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review. *J Control Release*. 0:500-514. 2014.
17. Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição. Fluconazol (Fluconazolum). Vol 2, Página 966. 2010.
18. Fernebro J. Fighting bacterial infections-Future treatment options. *Drug Resistance*. 125-139. 2011.
19. Freires IA, Queiroz VCPP, Furletti VF, Ikegaki M, Alencar SM, Duarte MCT, Rosalen PL. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian própolis against Candida spp. *Journal de Mycologie Médicale*. 26, 122-132. 2016.
20. Galgiani JN. Fluconazole, a New Antifungal Agent. *Annals of Internal Medicine*. 113:177-179. 1990.
21. Gao W, Thamphiwatana S, Angsantikul P, Zhang L. Nanoparticle Approaches against Bacterial Infections. *Wiley Interdiscip Ver Nanomed Nanobiotechnol*. 6 (6): 532-547. 2014.
22. Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-Based Local Antimicrobial Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Ver*. 127:46-57. 2018.
23. Ghisalberti E L. Propolis: A Review, *Bee World*. Taylor & Francis, 1979.
24. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henrique M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*. 42(6): 905-927. 2016.
25. Grant SM, Clissold SP. Fluconazole A review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Superficial and Systemic Mycoses. *Drugs*. 39 (6): 877-916. 1990.
26. Gucwa K, Kusznierevicz B, Milewski S, Dijck PV, Szweda P. Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. *Pathogens*. 7, 56. 2018.

27. Haghdoost NS, Salehi TZ, Khosravi A, Sharifzadeh A. Antifungal activity and influence of própolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale*. 26, 298-305. 2015.
28. Han T, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quórum sensing. *Fungal Genetics and Biology*. 747-763. 2011.
29. Hembram KC, Prabha S, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Informa Healthcare*. 2014.
30. Imhof M, Lipovac M, Kurz C, Barta J, Verhoeven HC, Huber JC. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 89, 127-132. 2005.
31. Ji H, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y, Lu J, Zhu J. A Three-Dimensional Modelo f Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase of *Candida albicans* and Its Interaction with Azole Antifungals. *Journal Med Chem*. 43, 2493-2505. 2000.
32. Johal HS, Garg T, Rath G, Goyal AK. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Delivery*. 1-14. 2014.
33. Kelidari HR, Moazeni M, Babaei R, Saeedi M, Akbari J, Parkoochi PI, Nabili M, Gohar AA, Morteza-Semnani K, Nokhodchi A. Improved yeast delivery of fluconazole with a nanostructured lipid carrier system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83-88. 2017.
34. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Bazzaz BSF. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*. 2016.
35. Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, Hill GC, Villalta F, Waterman MR. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chem Biol*. 14(11): 1283-1293. 2007.
36. Lim J, Yeap S P, Che H X, Low S C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Research Letters*. 8:381. 2013.
37. Lima NCA, Ratti BA, Mendonça PSB, Murata G, Pereira RRA, Nakamura CV, Consolaro EL, Svidzinski TIE, Hatanaka E, Bruschi L, Silva SO. Propolis increase neutrophils response against *Candida albicans* through the increase of reactive oxygen species. *Future Microbiol*. 13 (2), 221-230. 2018.

38. Liu N, Kohler JR. Antagonismo f Fluconazole and a Proton Pump Inhibitor against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 60 N 2. 2015.
39. Ludwig DB, de Camargo LEA, Kalil NM, Auler ME, Mainardes RM. Antifungal Activity of Chitosan-Coated POly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles Containing Amphotericin B. Springer. 2018.
40. Martinotti S, Ranzato E. Propolis: a new frontier for wound healing. *Burns & Trauma*. 3:9. 2015.
41. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011.
42. Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interations with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*. 963-976. 2011.
43. NCCLS. M27-A2 - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica. 2º Edição, 2002.
44. Nejat Z A, Farahyar S, Falahati M, Khozani MA, Hosseini AF, Faiazy A, Ekhtiari M, Hashemi-Hafshenjani S. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterno f Non-albicans *Candida* Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. *Iranian Biomedical Journal*. 22(1):33-41. 2016.
45. Neves J, Amiji M, Sarmiento B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe. John Wiley & Sons, Inc. Vol 3. 2011.
46. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Siddalingam RP, Yuen KH, Ambu SP, Davamani F. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos One*. 2017.
47. Pan D, Vargas-Morales O, Zern B, Anselmo A C, Gupta V, Zakrewsky M, Mitragotri S, Muzykantov V. The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells. *Plos One*, 2016.
48. Panche A N, Diwan A D, Chandra S R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutricional Science*. Vol 5, 1-15. 2016.
49. Rizeq B R, Younes N N, Rassol K, Nasrallah G K. Synthesis, Bioapplications, and Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 5776, 2019.
50. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, Sinani A, Sánchez-Blanco E, Arenas-Guzmán R, Hernandez-Castro R. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. Elsevier. 110-125. 2019.

51. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. APhA. Sixth Edition. 2009.
52. Schafer-Korting M. Drug Delivery – Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, vol 197, 2010.
53. Sekhavat L, Tabatabaie A, Tezerjani FZ. Oral Fluconazole 150mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. Elsevier, Journal of Infection and Public Health. 195-199. 2011.
54. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs. Journal of Ethnopharmacology. 253-260. 2011.
55. Sherry L, Kean R, McKlound E, O'Donnell LE, Metcalfe R, Jones BL, Ramage G. Biofilms Formed by Isolates from Recurrent Vulvovaginal Candidiasis Patients Are Heterogeneous and Insensitive to Fluconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 61. 2017.
56. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015.
57. Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª Edição, UFSC. 2003.
58. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. Nature, Vol 9. 2011.
59. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends in Microbiology. Vol 12 N 07. 2004.
60. Tobaldini-Valerio FK, Bonfim-Mendonça PS, Rosseto HC, Bruschi ML, Henriques M, Negri M, Silva S, Svidzinski TIE. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. Future Microbiol. 11 (8), 1035-1046. 2016.
61. Trein MR, Oliveira LR, Rigo GV, Garcia MAR, Silveira BP, Trentin DS, Macedo AJ. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of chalcone and amino-analogues. Parasitology Research. 607-615. 2018.
62. U.S. Pharmacopeial Convention. U.S. Pharmacopeia National Formulary – USP 40 NF 35. Vol. 2. 2017.
63. Varma A, Gaffen SL, Swidergall M. Innate Immunity to Mucosal *Candida* Infections. Journal of Fungi. 3 60. 2017.
64. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. Annu Ver Microbiol. 61:529-553. 2007.
65. Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. International Journal of Antimicrobial Agents. 333-339. 2018.

66. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 99-105. 1998.
67. Yang Sz, Peng LT, SU XJ, Chen F, Cheng YJ, Fan G, Pan SY. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Chemistry.* 210-215. 2010.
68. Yano J, Fidel Jr PL. Protocols for Vaginal Inoculation and Sample Collection in the Experimental Mouse Model of *Candida vaginitis*. *Vis. Exp.* 58. 2011.
69. Zhang L, Pornpattananankul D, Hu CMJ, Huang CM. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry.* 17, 585-594. 2010.
70. Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé RT. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale.* 1-19. 2017.
71. Zipfel PF, Wurzner R, Sherka C. Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. *Molecular Immunology.* 3850-3857. 2007.

# ANEXOS

---

## Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 11 de março de 2019.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N.º 095/18

#### I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa –Mestrado

#### II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 14/11/2018
- Data do atendimento da pendência:** 06/02/2019
- Título do projeto:** Fluconazol e própolis co-encapsulados em nanopartículas mucoadesivas para o tratamento da candidíase vulvovaginal
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** André Correa Amaral IPTSP/UFV
- Pesquisadores Participantes:** Jacqueline Teixeira da Silva IPTSP/UFV, Paulo Henrique Dantas de Sousa IPTSP/UFV, Adelaide Fernandes Costa ICB/UFV
- Médico Veterinário/CRMV:** Liliana Borges de Menezes Leite CRMV 3056
- Unidade onde será realizado:** Biotério do IPTSP/UFV

#### III – Respostas as pendências:

- 1- Solicitação da CEUA:** Explicar qual é o número de animais que serão utilizados neste projeto e quantos animais serão provenientes do projeto: “Desenvolvimento de nanoformulações poliméricas contendo farnesol para o tratamento da candidíase vulvovaginal”;  
**Resposta do Pesquisador Responsável:** No projeto intitulado “Fluconazol e própolis co-encapsulados em nanopartículas mucoadesivas para o tratamento da candidíase vulvovaginal 095/18” serão utilizados 7 grupos experimentais com um N igual a 5, entretanto, 3 destes grupos experimentais serão provenientes do projeto intitulado “Desenvolvimento de Nanoformulações Poliméricas contendo Farnesol para o Tratamento da Candidíase Vulvovaginal – 105/18”. Assim, o projeto 095/18 solicita um total de 20 animais, uma vez que outros 15 serão provenientes do projeto 105/18.
- 2- Solicitação da CEUA:** Descrever o número de registro do projeto “Desenvolvimento de nanoformulações poliméricas contendo farnesol para o tratamento da candidíase vulvovaginal” no Comitê de Ética no Uso de Animais.  
**Resposta do Pesquisador Responsável:** 105/18
- 3- Solicitação da CEUA:** Definir a quantidade de grupos experimentais, no item 18 há a citação de utilização de 11 grupos de animais.

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.  
Email: [ceua.ufv@gmail.com](mailto:ceua.ufv@gmail.com)

## Anexo 2 – Publicação de Capítulo de Livro



DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
SANT GADGE BABA AMRAVATI UNIVERSITY  
AMRAVATI- 444 602, MAHARASHTRA, INDIA

Telephone: +91 721 2662208, 2662209, 2662358; Fax: +91 721 2662135, 2660949

Professor (Dr.) Andre Correa Amaral

January 16, 2020

Nano & Biotecnology Laboratory,  
Federal University of Goias,  
Goiânia, Goias, Brazil

Dear Professor Amaral,

I have pleasure to inform you that your chapter entitled- **Nanotechnology for antifungal Therapy** (Authors: Jacqueline Teixeira da Silva and Andre Correa Amaral) has been accepted for publication in - *Nanotechnology in Diagnosis, drug delivery and Treatment* (Eds: Mahendra Rai, Mehdi Razzaghi-Abyaneh and Avinash Ingle), which is being published from Wiley publisher, USA. I am happy to inform you that the book is in press .

Thanks for your co-operation

Sincerely,

Professor Mahendra Rai,

Editor, *Nanotechnology in Diagnosis, drug delivery and Treatment*

UGC-BSR Faculty Fellow

Department of Biotechnology

SGB Amravati University Amravati-444 602,

India E-mail: [mahendrarai7@gmail.com](mailto:mahendrarai7@gmail.com)