



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
Colegiado de Farmácia



LORRANE JENIFER FERREIRA AMARO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
INCORPORADAS COM MICONAZOL E REVESTIDAS COM ÁCIDO
HIALURÔNICO DESTINADAS AO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE
VULVOVAGINAL RECORRENTE**

OURO PRETO
2022

LORRANE JENIFER FERREIRA AMARO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
INCORPORADAS COM MICONAZOL E REVESTIDAS COM ÁCIDO
HIALURÔNICO DESTINADAS AO TRATAMENTO DE CANDIDÍASE
VULVOVAGINAL RECORRENTE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia, da Escola
de Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto (UFOP), como requisito parcial
para a obtenção do título de bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof^ª Dra. Gisele Rodrigues da
Silva
Coorientadora: MSc. Aniely dos Reis
Teixeira

**Ouro Preto
2022**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A485d Amaro, Lorrane Jenifer Ferreira.

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas incorporadas com Miconazol e revestidas com ácido hialurônico destinadas ao tratamento de candidíase vulvovaginal recorrente. [manuscrito] / Lorrane Jenifer Ferreira Amaro. - 2022.

42 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva.

Coorientadora: Ma. Aniely dos Reis Teixeira.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Nanopartículas. 2. Biopolímeros. 3. Antimicóticos. 4. Candidíase. I. Silva, Gisele Rodrigues da. II. Teixeira, Aniely dos Reis. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.11

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorrane Jenifer Ferreira Amaro (L. J. F. A.)

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas incorporadas com miconazol e revestidas com ácido hialurônico destinadas ao tratamento de candidíase vulvovaginal recorrente

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Aprovada em 04 de novembro de 2022.

Membros da banca

Profa. Dra. - Gisele Rodrigues da Silva (G. R. S.) - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestre - Aniely Teixeira dos Reis (A. T. R.) - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Profa. Dra. - Juliana Cristina dos Santos Almeida (J. C. S. A.) - (UNIFASAR - Centro Universitário Santa Rita)
Mestre - Cristiane del-Bello (C. B.) - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Gisele Rodrigues da Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 07/11/2022



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/11/2022, às 09:00, 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 http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0422821** e o código CRC **6CE2D70B**.

RESUMO

A candidíase vulvovaginal recorrente é uma infecção fúngica que acomete mulheres diariamente, independente de classe social e econômica. Fatores como gravidez, uso de antibiótico frequente e imunocomprometimento são condições que podem contribuir para a ocorrência do fungo e que, quando recorrente, aumenta as chances de resistência fúngica, levando a redução da eficácia das terapias medicamentosas existentes. Tal infecção é tratada através da administração de antifúngicos das classes do imidazol, triazol e polieno, incorporados em diferentes formas farmacêuticas. Entretanto os antifúngicos de via oral podem trazer efeitos colaterais sistêmicos e os de via tópica não induzem a penetração e retenção eficiente do fármaco na vagina. Diante do exposto, com o intuito de viabilizar novas terapias para a candidíase vulvovaginal recorrente, nanopartículas de poli(ε-caprolactona) (PCL) contendo miconazol (MN) e revestidas de ácido hialurônico (AH) foram elaboradas. As nanopartículas foram desenvolvidas por nanoprecipitação e revestidas através da técnica de adsorção de superfície. As nanopartículas foram caracterizadas por diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. A formulação foi submetida ao processo de revestimento por AH em diferentes concentrações que variaram de 0,1 a 3% p/v. As nanopartículas produzidas apresentaram tamanho de partículas próximo a 200 nm, PDI em torno de 0,3 e potencial zeta de cerca de -33 mV. O diâmetro inferior a 300 nm é compatível a aplicações sob mucosas sem que danos sejam causados. Valores de PDI inferiores a 0,3 indicam homogeneidade do tamanho das partículas, garantindo estabilidade da formulação. Valores de potencial zeta superiores a 30 mV promovidos por carga superficial de mesmo módulo são ideais para repelir as nanopartículas, garantindo estabilidade. Estas nanopartículas foram revestidas usando AH na concentração de 0,5 mg/mL utilizando a técnica de adsorção. Foi realizado o teste de estabilidade durante o primeiro, 7, 14 e 30 dias, o qual não apresentou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) e também foi realizado o estudo de eficiência de encapsulação o qual resultou-se 92,54% e 84,56% para nanoesferas de miconazol (NSMN) e nanoesferas de miconazol revestidas com ácido hialurônico (NSMN+AH) respectivamente. Por fim a atividade antifúngica das formulações foi avaliada frente a *C. albicans* através do método difusão em ágar, apresentando diâmetro de 13 e 12 mm, respectivamente, confirmando a atividade antifúngica. Conclui-se, portanto, que as nanopartículas a base de PCL contendo miconazol e revestidas por AH foram desenvolvidas e apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para tratar topicamente a candidíase vulvovaginal recorrente.

Palavras chaves: Nanopartículas, Nanoprecipitação, Ácido Hialurônico, Miconazol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Miconazol	14
Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco	16
Figura 3. Técnica de nanoprecipitação	21
Figura 4. Nanoesferas de PCL sem o fármaco (NS branco) e contendo miconazol a 0,5 mg/mL (NSMN)	24
Figura 5. Halos de inibição em placas de ágar semeadas com <i>C. albicans</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas quanto aos parâmetros: tamanho de partícula, PDI e potencial zeta	26
Tabela 2. Caracterização das nanopartículas após revestimento com solução de ácido hialurônico em diferentes concentrações.....	27
Tabela 3. Caracterização das nanopartículas revestidas	28
Tabela 4. Valores médios de tamanho (nm) \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1º, 7º 14º e 30º dias posteriores ao seu preparo.....	29
Tabela 5. Valores do índice de polidispersão \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1º, 7º 14º e 30º dias posteriores ao seu preparo.....	29
Tabela 6. Valores do potencial zeta (mV) \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1º, 7º 14º e 30º dias posteriores ao seu preparo.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
CVV	Candidíase Vulvovaginal
CVVR	Candidíase Vulvovaginal Recorrente
IPD	Índice de Polidispersão
MN	Miconazol
NS	Nanoesferas
NSB	Nanoesferas Branca
NSMN	Nanoesferas de Miconazol
NSMN + AH	Nanoesferas de Miconazol revestida por Ácido Hialurônico
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PLA	Polilactídeo
PLGA	Polilactídeo-co-glicolido
SPAN	Monoestearato de sorbitano
<i>Spp.</i>	Espécies
TWEEN	Polisorbato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Candidíase vulvovaginal (CVV).....	10
2.2 <i>Candida albicans</i>	11
2.3 Terapia medicamentosa da CVV	12
2.4 Miconazol	14
2.5 Nanocarreadores	16
2.6 Ácido hialurônico	18
3 JUSTIFICATIVA	19
4 OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5 METODOLOGIA.....	21
5.1 Desenvolvimento das nanopartículas	21
5.2 Revestimento das nanopartículas.....	21
5.3 Caracterização das nanopartículas quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta	22
5.4 Teste de estabilidade das nanopartículas	22
5.5 Estudo de encapsulação das nanopartículas	22
5.6 Análise da atividade fúngica <i>in vitro</i> das nanopartículas produzidas frente a cepas de <i>Candida albicans</i>	23
5.6.1 Inóculo	23
5.6.2 Método de difusão em ágar.....	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1 Desenvolvimento de nanopartículas de miconazol.....	24
6.2 Revestimento das nanopartículas.....	27

6.3 Teste de estabilidade das nanopartículas	29
6.4 Eficiência de encapsulação (EE%) do miconazol	31
6.5 Análise da atividade antifúngica <i>in vitro</i> das nanopartículas produzidas contra cepas de <i>Candida albicans</i>	32
7 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo que sofre transição morfológica entre as formas leveduriformes e hifas, o que permite colonizar comensalmente tecidos na região oral, vaginal e gastrointestinal, além de peles e unhas. Entretanto, em condições decorrentes de situações endógenas ou exógenas, há uma proliferação anormal da *C. albicans* resultando em diversas formas de doenças, que vão desde as leves infecções de mucosa até infecções sistêmicas (SANTOS, 2012; HAGHDOOST et al., 2016).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção oportunista, de alta incidência, localizada no trato genital feminino. A levedura mais prevalente a essa infecção é a *C. albicans*, porém outras espécies de *Candida* podem ocasionar a doença. Situações clínicas como imunocomprometimento, uso de antibiótico, gravidez, diabetes mellitus contribuem para presença da infecção (COSTA et al., 2019). Estima-se que cerca de três em cada quatro mulheres saudáveis já tiveram pelo menos um quadro de CVV durante a vida, sendo que uma a cada duas mulheres apresentam episódios recorrentes, levando a procura da terapia medicamentosa (ILKIT; GUZEL, 2011; COSTA et al., 2019). Mesmo com a fácil aquisição de antifúngicos disponíveis, caso o tratamento não seja realizado corretamente pela paciente, pode haver ineficácia e até levar a resistência fúngica (COSTA et al., 2019).

A infecção se inicia a partir do momento em que o fungo se defende contra o sistema imunológico do hospedeiro, levando a proliferação de hifas, além da produção dos fatores de virulência, como produção de enzimas proteolíticas, expressão de adesinas e invasinas e formação de biofilmes (SOUZA et al., 2018). Os sintomas mais comuns da CVV são corrimento vaginal, intenso prurido, dor e queimação vaginal, além de dispareunia (dor genital durante relação sexual) e disúria (dor e desconforto ao urinar) (SOBEL, 2007).

O tratamento para CVV é baseado na administração de antifúngicos das classes farmacológicas dos azóis (imidazol e triazol) e os polienos (anfotericina B), sendo disponíveis em diferentes formas farmacêuticas (SOUZA et al., 2018). O miconazol pertence a classe dos imidazóis, é um antifúngico frequentemente utilizado, possui amplo espectro de ação e seu mecanismo de ação é através da inibição da síntese do ergosterol e das peroxidases, levando à apoptose celular (KENECHUKWU et al., 2018). No entanto, apresenta alguns problemas relacionados a solubilidade aquosa, dificultando sua permeação cutânea (AL-MAGHRABI et al., 2020).

As propriedades farmacocinéticas pouco atrativas levam a um regime terapêutico prolongado de supressão do fungo e manutenção do quadro posológico, que pode provocar

interações medicamentosas, redução da adesão das pacientes à terapia e resistência fúngica (SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2019). Com isso, se faz necessário o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas que garantam a liberação local do fármaco de forma controlada e prolongada, promovendo melhor eficácia terapêutica, reduzindo os efeitos colaterais, proporcionando maior adesão ao tratamento (KENECHUKWU et al., 2018).

Em busca de alternativas para melhorar a eficácia da terapia medicamentosa convencional, estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, que são capazes de promover a liberação controlada do fármaco, vetorização terapêutica, proteção do fármaco, além de aumentar a retenção e solubilidade do fármaco no local, melhorando a biodisponibilidade e eficácia do tratamento (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; MELO et al., 2019). Dentre os sistemas de entrega local do fármaco, os principais são, nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanopartículas lipídicas (SANTOS, 2012).

Neste estudo pretende-se desenvolver nanopartículas de miconazol e revestidas com ácido hialurônico (AH) destinadas ao tratamento local da CVV recorrente. Enfatiza-se que o AH é um polímero que se liga às células epiteliais vaginais por meio dos receptores de membrana CD44, levando à internalização das nanopartículas, que por sua vez, podem reduzir/eliminar a *C. albicans* presente no interior do tecido epitelial, promovendo o tratamento da CVV recorrente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Candidíase vulvovaginal (CVV)

A candidíase vulvovaginal é uma infecção fúngica oportunista, localizada no trato genital feminino, que afeta mulheres de todos os níveis sociais. É ocasionada por leveduras oportunistas do gênero *Candida spp.* sendo *Candida albicans* o fungo mais prevalente à infecção. No entanto, outras espécies de *Candida* não *albicans* também pode causar CVV, como por exemplo a *Candida glabrata* (COSTA et al., 2019; MELO et al., 2019). Cerca de três quartos das mulheres durante seu ciclo reprodutivo têm pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal, sendo que metade delas possuem dois ou mais episódios com *C. albicans*, e aproximadamente 90% dos casos seguida por *C. glabrata* (DESAI; SAMBAREY, 2019).

Sabe-se que essas leveduras habitam normalmente a mucosa vaginal, ou seja, fazem parte da microbiota vaginal. Porém, quando ocorre um crescimento anormal desse fungo, as leveduras do gênero *Candida spp.* podem se tornar patogênicas, uma vez que o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser um ambiente favorável ao seu crescimento descontrolado (SANTOS, 2012). Dessa forma, a adesão do fungo às células epiteliais da vagina é facilitada quando estão presentes algumas condições clínicas, sendo elas: gravidez, relações sexuais frequentes, uso de antibióticos, diabetes mellitus, imunocomprometimento (AIDS ou HIV), duchas vaginais, espermicidas e dispositivos intrauterinos. Todos esses fatores, levam ao desequilíbrio da microbiota vaginal, causando um crescimento excessivo da *Candida* (JOHAL et al., 2014; COSTA et al., 2019; MELO et al., 2019).

Coceira intensa e corrimento vaginal são as principais queixas relacionadas a CVV, embora não sejam sintomas específicos da infecção. O corrimento pode variar de aquoso a uma secreção esbranquiçada. Além disso, dor vaginal, irritação, queimação, disúria e dispareunia são relatados (SOBEL, 2007; DESAI; SAMBAREY, 2019; MELO et al., 2019). Quando realizados exames para diagnóstico, estes revelam edema e eritema na região vulvar, e em alguns casos acompanhadas de fissuras e lesões periféricas pústulo papulares. Caracteristicamente, na semana anterior à menstruação, os sintomas são intensificados. O colo do útero se mantém normal. No entanto, o espectro clínico da CVV varia desde uma forma exsudativa aguda com extenso corrimento vaginal branco e grande número de células leveduriformes, a uma forma com pouca secreção e fungos, mas com intenso prurido (SOBEL, 2007).

Atualmente, grande número de mulheres vem se autodiagnosticando com candidíase vulvovaginal, fazendo uso de preparações antifúngicas sem acompanhamento médico.

Notavelmente, essa prática incorreta é comum em nossa população, e estudos mostraram que até dois terços de todas as terapias medicamentosas utilizadas para CVV são usados por mulheres que não possuem a infecção. Dessa forma, mesmo com os antifúngicos disponíveis, se o paciente não seguir corretamente ao tratamento, o uso incorreto e excessivo desses medicamentos, levam ao risco de resistência fúngica (ILKIT; GUZEL, 2011; COSTA et al., 2019).

O ressurgimento da CVV pode resultar de uma falha da terapia medicamentosa em erradicar completamente a *Candida* da mucosa vaginal, o que leva a uma em cada duas mulheres apresentarem dois ou mais episódios durante a vida, sendo que cerca de 8% dessas mulheres tem CVV recorrente (ILKIT; GUZEL, 2011). A candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) é denominada como quatro ou mais episódios sintomáticos de CVV, sendo este, verificado por cultura em um ano. Deve-se salientar, que a CVVR não é considerada uma infecção crônica, mas sim uma doença com recorrentes episódios (ILKIT; GUZEL, 2011).

Sendo assim, a candidíase vulvovaginal recorrente refere-se a condições clínicas em que a mulher, a *Candida* e o método de terapia antifúngica utilizado devem ser avaliados antes de estabelecer um regime terapêutico, afim de promover um resultado eficaz (ILKIT; GUZEL, 2011).

2.2 *Candida albicans*

Apenas cerca de 600 espécies de fungos são consideradas patogênicos. Desse número, fungos como dermatófitos e espécies de *Malassezia* causam leves infecções na pele. Além desses, possuem fungos que causam infecções cutâneas graves e fungos que apresentam potencial de causar infecções sistêmicas, como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Candida albicans* (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Dentre as espécies do gênero *Candida spp.*, a *C. albicans* é a levedura mais prevalente associada a candidíase vulvovaginal. É um colonizador comensal dos tecidos das mucosas, seja, oral, vaginal e gastrointestinal, além da pele (MATSUMOTO et al., 2013). O processo de infecção se inicia a partir do momento em que *C. albicans* consegue se defender contra o sistema imunológico do hospedeiro, promovendo a adesão do fungo às células epiteliais vaginais. Dessa forma, a *C. albicans* induz endocitose e leva a transição morfológica entre as formas de levedura e hifa, sendo este o principal fator de virulência do fungo (SOUZA et al., 2018; MELO, 2019).

A mudança do comensalismo para o parasitismo está também associada a outros fatores de virulência como, secreção de enzimas hidrolases, expressão de adesinas e invasinas na superfície celular e formação de biofilmes, além da transição morfológica, como já mencionado (HAGHDOOST et al., 2016). Essa transição entre as formas de leveduras e hifas é caracterizada como dimorfismo, sendo ambas formas importantes para a patogenicidade do fungo. Acredita-se que a forma levedura está relacionada com a disseminação do fungo, enquanto que a forma hifa tem se mostrado mais invasiva (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

As adesinas, são proteínas que medeiam a adesão da *C. albicans* as células hospedeiras. As adesinas mais estudadas são as proteínas de sequência semelhante à aglutinina (ALS), que formam uma família composta por oito membros, sendo a proteína Als3 a mais importante para adesão das hifas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Quando aderidas às superfícies das células, a *C. albicans* em forma de hifas tem a capacidade de secretar hidrolases, enzimas que facilitam a penetração nas células e aumentam a captação de nutrientes extracelulares. São três classes diferentes de hidrolases expressa pela *C. albicans*, as proteases, fosfolipases e lipase. Essas enzimas, em especial as proteases, conseguem destruir proteínas livres e ligadas as células que prejudicam a colonização e invasão do fungo (SOBEL, 2007; Mayer; Wilson; HUBE, 2013).

Outro mecanismo envolvido na patogenicidade do fungo é sua capacidade de formar biofilmes, fator relevante quando se trata de falhas da terapia antifúngica (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Os biofilmes se formam a partir de um processo sequencial, que se inicia com aderência das leveduras ao hospedeiro, seguido de sua proliferação e formação de hifas na parte superior do biofilme e, o acúmulo de material de matriz extracelular. O amadurecimento dos biofilmes leva ao fungo uma resistência maior à agentes antimicrobianos e fatores imunológicos do hospedeiro. Essa maior resistência pode estar relacionada a matriz e arquitetura complexa dos biofilmes, e o aumento da expressão das bombas de efluxo de fármacos, o que restringe a penetração do mesmo (BARBEDO, 2010, Mayer; Wilson; HUBE, 2013).

2.3 Terapia medicamentosa da CVV

A terapia medicamentosa de primeira escolha para tratamento da CVV se baseia principalmente na utilização de medicamentos antifúngicos da família dos azóis, os imidazóis (nitrato de miconazol, nitrato de fenticonazol, nitrato de econazol, clotrimazol), e triazóis (itraconazol, fluconazol), e também os da classe dos polienos (anfotericina B, nistatina). Todos

estão disponíveis como agentes tópicos e sistêmicos, sendo o regime terapêutico desses medicamentos disponível em dose única e multidose, adquiridos como produtos de prescrição e de venda livre (SOBEL; SOBEL, 2018; SOUZA et al., 2018).

Esses medicamentos são comercializados em diferentes formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, supositórios vaginais, cremes, pomadas e géis. Porém as formas farmacêuticas convencionais de uso tópico estão geralmente associadas a uma má distribuição e retenção do fármaco, principalmente devido à autolimpeza da vagina (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Dessa forma, o principal objetivo do tratamento é o alívio imediato dos sintomas da CVV e a cura micológica a curto prazo, prevenindo a recorrência da doença (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

Embora pacientes possam relatar sensação de queimação ao uso dos agentes azólicos tópicos, estes são bem tolerados e seguros. As taxas de cura para azóis tópicos variam de 80 a 90%. Em contrapartida, os azólicos orais podem atingir taxas de cura mais altas que os azólicos de uso tópicos, porém possuem potencial efeito colateral sistêmico, o que restringe o seu uso (SOBEL, 2007). Como resultado, o sucesso micológico e clínico da terapia varia de 85% cerca de 2 semanas e 75% por volta de 4 a 6 semanas após o tratamento (SOUZA et al., 2018).

Os antifúngicos imidazólicos uma vez que possuem largo espectro de ação e baixa toxicidade são usados comumente no tratamento da CVV. Dentre eles pode-se citar o clotrimazol, que atua se ligando com o ergosterol da membrana fúngica ocasionando a alteração da permeabilidade celular, provocando a morte do fungo. Outro exemplo bastante utilizado na prática clínica é o nitrato de miconazol, cujo seu mecanismo é inibir a síntese do ergosterol e a ação de peroxidases que geram acúmulo de peróxido no interior da célula, causando a morte celular (SOBEL, 2007; KENECHUKWU et al., 2018).

O uso do polieno anfotericina B, é uma outra alternativa para CVV. É um antibiótico fungicida que se liga ao ergosterol dos fungos, produzindo canais transmembrana que modificam a permeabilidade da membrana, o que leva a um desequilíbrio osmótico ocasionando a morte celular. Entretanto, seu uso pode provocar efeitos colaterais significativos como a nefrotoxicidade (SOBEL, 2007; MELO, 2019).

A fácil comercialização desses antifúngicos devido a sua venda sem prescrição é uma grande preocupação, devido ao autodiagnóstico feito pelas mulheres. O fácil acesso a esses medicamentos está associado a gastos financeiros desnecessários, atraso no diagnóstico, expectativas não atendidas, e o mais importante, o surgimento da resistência antifúngica, que leva a recorrência da infecção (SOBEL, 2018).

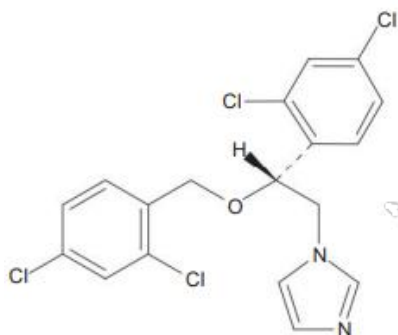
A recidiva da infecção pode ocorrer logo depois ao término do tratamento da CVV, levando a uma doença crônica. Nessa ocasião, a abordagem terapêutica deve ser através de antifúngicos orais e em um regime prolongado que pode chegar em até um ano, garantindo a eliminação do fungo. O uso das formulações tópicas convencionais não são as mais indicadas, uma vez que possuem menor capacidade de eliminar hifas das camadas profundas do tecido vaginal (SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2019).

Além de um tratamento prolongado, a exposição frequente de cepas de *C. albicans* ou *Candida* não albicans, também está relacionada à resistência antifúngica. Tal fato foi mostrado por Coste e colaboradores (2007) e Sobel (2007) que mostraram um aumento da resistência de cepas de *C. albicans*, *C.glabrata* e *C.krusei* após o uso prolongado de fluconazol. Além de aumentar a resistência a esses antifúngicos, o uso prolongado pode provocar interações medicamentosas e efeitos adversos. Dessa forma, todos esses fatores em conjunto levam à não adesão ao tratamento, o que resulta em sua ineficácia (SOUZA et al., 2018).

2.4 Miconazol

Os azóis são classificados como imidazóis ou triazóis. Sua estrutura é composta por um anel imidazol ou triazol não substituído, e o restante da molécula com ligações de nitrogênio e carbono (PIÉRARD et al., 2012). O grupo imidazois é constituído por cetoconazol, miconazol e clotrimazol, sendo as duas últimas indicadas apenas para tratamento tópico. O grupo dos triazois é composta por itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol. (KATZUNG; TREVOR, 2017).

Figura 1. Estrutura química do Miconazol



Fonte: PIÉRARD et al., 2012

O composto 1- [2- (2,4- diclorofenil) -2- [(2,4- diclorofenil) metoxi] etil] imidazol, conhecido também como miconazol (Figura 1), é um fármaco antifúngico de amplo espectro de ação, utilizado frequentemente no tratamento da candidíase. Possui penetração rápida no

estrato córneo da pele e mantém por quatro dias ou mais após sua aplicação. Menos de 1% do fármaco é absorvido na corrente sanguínea, e sua absorção não ultrapassa 1,3% quando aplicado na vagina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

O miconazol apresenta baixa solubilidade aquosa (0,1 mg/mL), o que gera um problema em sua administração tópica, promovendo uma permeação inadequada na pele (AL-MAGHRABI et al., 2020). Entretanto, o seu uso por via oral é inapropriado devido aos graves efeitos colaterais, incluindo distúrbios gastrointestinais, o que leva a administração tópica, mais indicada (KENECHUKWU et al., 2018). No geral, o uso o miconazol tópico é bem tolerado, sendo raras as reações adversas e, quando presentes, consistem em queimação, prurido e eritema no local tratado, sendo em sua maioria reações causadas possivelmente pelos componentes do veículo e não induzidos pelo fármaco (PIÉRARD et al., 2012).

A atividade antifúngica do miconazol é composta por um duplo mecanismo de ação, promove a inibição da biossíntese do ergosterol e a inibição das peroxidases (KENECHUKWU et al., 2018). Quando inibida a síntese do ergosterol, promove níveis tóxicos de esterol metilado que se acumulam dentro das células fúngicas e tornam as membranas fúngicas mais fluidas e permeáveis (PIÉRARD et al., 2012; AMARAL et al., 2019). A inibição das peroxidases resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas, provocando um dano oxidativo seguido de morte celular (BARASCH; GRIFFIN, 2008; KENECHUKWU et al., 2018).

Atualmente os imidazois tópicos são frequentemente prescritos para tratamento da CVV, devido as vantagens associadas, como a entrega do fármaco diretamente no local de ação, o reajuste posológico quando necessário e a redução tanto dos efeitos colaterais quanto do metabolismo de primeira passagem (KENECHUKWU et al., 2018). Porém a rápida liberação do miconazol a partir das formulações e sua baixa solubilidade pode levar a dificuldades no tratamento, uma vez que pode não alcançar o local de ação eficientemente, devido a uma penetração inadequada (AL-MAGHRABI et al., 2020).

Dessa forma, sistemas carreadores adequados para a administração por via tópica são necessários para melhorar a ação farmacológica do antifúngico. O aprisionamento do miconazol em um veículo adequado promove a entrega localizada e sustentada do fármaco, que se mantém por maior tempo no local, promovendo a melhora da solubilidade e disponibilidade do local alvo (SANTOS, 2012; KENECHUKWU et al., 2018; AL-MAGHRABI et al., 2020).

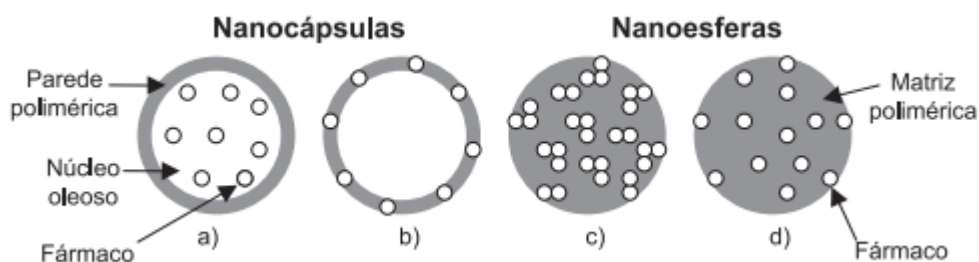
2.5 Nanocarreadores

Atualmente a busca por alternativas de terapias para infecções vaginais incluem o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos mais apropriados, com o objetivo em melhorar a distribuição, retenção e aceitabilidade das formulações, permitindo o controle da liberação do fármaco, com maior atividade e menor toxicidade (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

Dentre os sistemas de entrega de fármaco disponíveis, os nanocarreadores são sistemas que possuem tamanho submicrométrico, e que apresentam atual interesse farmacoterapêutico. Os principais nanocarreadores incluem as nanopartículas poliméricas e lipídicas, nanoemulsões e lipossomas (SANTOS, 2012). As nanopartículas poliméricas tem atraído maior atenção dos pesquisadores, uma vez que apresentam importantes vantagens, como a liberação controlada e direcionamento ao sítio alvo, proteção do fármaco e maior estabilidade durante armazenamento e frente a fluidos orgânicos (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; SANTOS, 2012).

As nanopartículas apresentam diâmetro inferior a 1 μm , o que facilita sua formulação em produtos dermatológicos, além de permitir um maior conforto na pele quando aplicado (OURIQUE et al., 2008). O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas poliméricas e nanoesferas, sendo que estas se diferenciam quanto a composição e organização estrutural (Figura 2). As nanocápsulas poliméricas são compostas por um revestimento polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, na qual o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, são produzidas por uma matriz polimérica, podendo o fármaco ficar aprisionado ou disperso molecularmente (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco



Fonte: SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003

Em relação a entrega do fármaco miconazol na pele, tentativas anteriores incluem lipossomas convencionais, etossomas e microemulsões. Porém, esses sistemas possuem problemas de citotoxicidade e instabilidade (AL-MAGHRABI et al., 2020). Os nanolipossomas são frequentemente usados devido a sua capacidade de entregar fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Além de apresentar biocompatibilidade, proteção contra degradação enzimática e liberação controlada (AL-MAGHRABI et al., 2020).

Apesar das vantagens dos lipossomas, autores já demonstraram problemas nesse sistema, como Agarwal e Katare (2002) e Elmoslemany e colaboradores, (2012), relataram dificuldades de estabilidade devido ao vazamento de miconazol na preparação de lipossomas. Além disso, foi relatado por Peira e colaboradores (2008) que a atividade antifúngica dos derivados de miconazol e cetoconazol é reduzida quando são retidos em lipossomas.

A fim de superar as limitações da entrega de miconazol para tratamento da CVV, novas estratégias foram pesquisadas. Neste contexto, nanopartículas revestidas de quitosana contendo poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e anfotericina B (LUDWIG et al., 2018), micropartículas de fitolípido PEGuiladas com nitrato de miconazol (KENECHUKWU et al., 2018), filmes contendo tioconazol de quitosana-hidroxipropilmetilcelulose (CALVO et al., 2018) e nanofibras de PLGA carregadas com anfotericina B (SOUZA et al., 2018), compõem algumas alternativas para o tratamento local da CVV.

Além disso, mucoadesivos como Eudragit®RS 100 e RL100 (poli(met)acrilatos), alginato e poloxâmeros foram utilizados por diversos pesquisadores no desenvolvimento de microesferas e nanoesferas com ação antifúngica. Devido a propriedade mucoadesiva, o uso desses compostos visa melhorar a retenção do fármaco na vagina, possibilitando a liberação controlada do fármaco sem perda (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

Para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para administração via tópica, deve-se tomar alguns cuidados, pois para que o sistema possua uma aplicação segura, os componentes da formulação devem ser escolhidos com cautela. Os polímeros usados devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, de preferência. Entre as classes de fármacos associados a esse sistema, os antimicrobianos possuem maior relevância, uma vez que devido ao tamanho reduzido e por conseguir carrear o fármaco mais próximo ao local de ação, promovem um aumento do efeito antimicrobiano quando comparado a outras formas farmacêuticas (SANTOS, 2012).

Dessa forma, a melhora da eficácia terapêutica pode ser alcançada através de alternativas de formulações que visam aumentar a retenção, solubilidade e distribuição do

fármaco na vagina e ao mesmo tempo, promover a interação do fármaco com microrganismo e ajudar na melhora da saúde ambiente da vagina. Para isso, é importante considerar os aspectos físicos e químicos do fármaco e da formulação, além das características físicas do ambiente fisiológico em que se encontra (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

2.6 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano composto por unidades repeditas de ácido glucurônico e moléculas de N-acetilglucosamina que atinge comprimento e peso molecular variável (BUZZACCARINI et al., 2021). É encontrado em maior quantidade na pele e nos tecidos conjuntivos, além de constituir um dos componentes fundamentais da matriz extracelular. Em tecidos como humor vítreo e líquido sinovial, o AH é responsável pela função e características físicas (ARDIZZONI, et al., 2011; PAROLIN et al., 2021).

Atualmente é muito utilizado na estética, uma vez que por ser higroscópico, permite a ligação com água proporcionando ao tecido efeitos hidratante e lubrificante (BUZZACCARINI et al., 2021). Além disso, devido a suas propriedades biológicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade e não imunogenicidade, o AH e seus derivados são amplamente aplicados em formulações farmacêuticas e em cuidados médicos, como em feridas e queimaduras (ARDIZZONI, et al., 2011; WANG et al., 2018; PAROLIN et al., 2021).

Na bioengenharia as propriedades físico-químicas do AH são de grande importância para os avanços de novos métodos de reconstrução corporal e regeneração de tecidos (ZAMBONI; WONG; COLLINS, 2022). O AH constitui a matriz pericelular, o qual se liga às suas próprias sintases e aos receptores de superfície celulares, em especial CD44, sendo fundamental para respostas de várias funções celulares (THEOCHARIS et al., 2016; WANG et al., 2018; ZAMBONI; WONG; COLLINS, 2022).

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana ausente de atividade enzimática intrínseca e age como receptor de superfície celular para AH e outros ligantes como, colágeno e fatores de crescimento (THEOCHARIS et al., 2016). Como principal receptor de AH, o CD44 auxilia na ativação de leucócitos e células parenquimatosas em regiões de inflamação e lesão tecidual (ACHARYA et al., 2008). Uma vez que o CD44 é amplamente distribuído na membrana basal e entre células no epitélio estratificado, pode-se dizer que esse receptor é expresso na superfície epitelial da vagina. Dessa forma, se tratando de CVV, formulações constituídas com AH podem apresentar vantagens, aumentando a adesão e a biodisponibilidade do medicamento, sendo mais eficaz contra as formas de leveduras e hifas da *Candida* spp. (MELO et al., 2019).

3 JUSTIFICATIVA

A CVV é uma doença causada pela proliferação de *Candida spp.*, que está presente na microbiota vaginal normal das mulheres e quando em grande quantidade, torna-se patógeno e causa a infecção (ILKIT; GUZEL, 2011). É uma doença frequente entre o sexo feminino, sendo que 75% de todas as mulheres apresentam pelo menos um ou dois episódios de CVV durante a vida. Nos Estados Unidos, foi estimado um custo anual de aproximadamente 1,8 bilhões de dólares para tratar esta infecção (KENECHUKWU et al., 2018).

Várias são as formas farmacêuticas disponíveis para o tratamento da CVV. Entretanto, as formulações convencionais tópicas estão associadas a problemas de distribuição e retenção do fármaco no local de ação, dificultando a eficácia do tratamento (OLIVEIRA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Além disso, os medicamentos administrados oralmente podem causar efeitos colaterais sistêmicos e até interações medicamentosas, fatores importantes que afetam na adesão do paciente (MELO et al., 2019).

Os antifúngicos, devido ao fato de estarem disponíveis como medicamentos de prescrição e de venda livre, muito vezes são adquiridos por pacientes que não procuram um médico, e leva ao autodiagnóstico. Tal fato, além de levar a gastos financeiros desnecessários e diagnóstico inadequado, pode causar a resistência antifúngica, uma vez que, o tratamento é feito de forma incorreta, provocando a recorrência da infecção (SOBEL, 2007).

Sendo assim, para superar tais limitações, alternativas terapêuticas devem ser desenvolvidas afim de promover o controle, liberação e permanência do fármaco no local de ação, além de induzir sua penetração nas células epiteliais da vagina, alcançando os fungos localizados mais internamente à membrana. A vetorização por meio das nanopartículas, tem o intuito de potencializar o efeito antifúngico do miconazol, e quando associado ao ácido hialurônico que se liga ao receptor CD44, permite a entrada do fármaco no epitélio vaginal, eliminando as hifas presentes em regiões mais profundas das células infectadas.

Dessa forma, as nanopartículas revestidas com ácido hialurônico associadas ao miconazol são uma alternativa promissora para administração e tratamento da CVV recorrente, podendo atuar de forma isolada ou como adjuvante a outras terapias medicamentosas.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas poliméricas incorporadas ao miconazol revestidas e não revestidas com ácido hialurônico destinadas ao tratamento da candidíase vulvovaginal recorrente.

4.2 Objetivos específicos

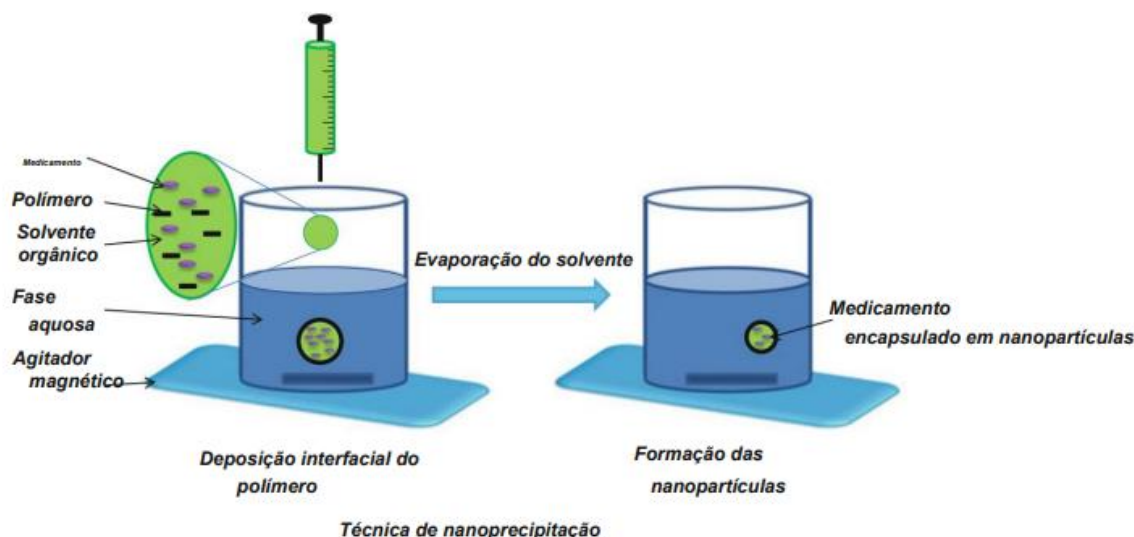
- Desenvolver nanopartículas poliméricas de miconazol revestidas e não revestidas com ácido hialurônico;
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a eficiência de encapsulação do miconazol nas nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas com e sem revestimento de ácido hialurônico;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das nanopartículas com e sem revestimento de ácido hialurônico associadas à miconazol diante das cepas de *Candida albicans*;

5 METODOLOGIA

5.1 Desenvolvimento das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas a partir do método de nanoprecipitação descrito por FESSI e colaboradores (1989).

Figura 3. Técnica de nanoprecipitação



Fonte: MILADI et al., 2012

Essa técnica consiste na diferença de tensões superficiais entre a fase aquosa e a fase orgânica, gerando uma turbulência interfacial, que causa a precipitação gradual do polímero e a formação das nanopartículas. No presente estudo, a fase orgânica foi composta por um solvente orgânico, sendo 4 mL de acetona, 25,9 mg do polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), 11 μ L do tensoativo lipofílico, o Span 60 e fármaco, uma solução de miconazol 0,5 mg/mL em acetona, sob leve aquecimento, a 40°C. A fase aquosa, por sua vez, foi constituída por 8 mL de água MilliQ e 11 μ L do tensoativo, Tween 80. As fases foram mantidas em agitação durante 10 minutos utilizando um agitador magnético e após o preparo, verteu-se a fase orgânica na fase aquosa. Finalmente evaporou-se todo o solvente orgânico por meio do rotavapor (Rotavapor Buchi R-3).

5.2 Revestimento das nanopartículas

O revestimento das nanopartículas de miconazol foi realizado por meio da técnica de adsorção de superfície (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004). Diferentes concentrações de AH foram testadas (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1,5 e 3% p/v). As soluções de

AH, previamente preparadas, foram gotejadas sobre as nanopartículas, sendo mantidas em agitação por 20 minutos utilizando agitador magnético e na ausência de aquecimento. As nanopartículas foram revestidas na proporção 1:1 de formulação e solução de AH.

5.3 Caracterização das nanopartículas quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta

Após o preparo das nanopartículas, estas foram caracterizadas conforme o diâmetro da partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta, por meio das técnicas de Espectroscopia de Correlação Fótons e de Mobilidade Eletroforese por Anemometria Laser Doppler, respectivamente (MELO et al., 2019). A caracterização das nanopartículas foi feita por meio do equipamento ZetaSizer pertencente ao Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia (Cipharma), situado na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

5.4 Teste de estabilidade das nanopartículas

A estabilidade das nanopartículas foi estabelecida por meio da avaliação da presença ou ausência de precipitação das formulações e da determinação de seu diâmetro, IPD e do potencial zeta. Para isso, foram retiradas alíquotas da formulação no 1º, 7º, 14º e 30º dias após o preparo. Durante o período avaliado, as formulações se mantiveram na geladeira a 8°C. O teste foi feito por meio do equipamento Zetasizer pertencente ao Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia (Cipharma), situado na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os dados obtidos foram tratados segundo a análise Two-Way ANOVA, com posterior teste Tukey, utilizando o software Prisma 8.0, considerando dados significativos com $p < 0,05$.

5.5 Estudo de encapsulação das nanopartículas

O estudo de eficiência de encapsulação (EE) de nanopartículas foi realizado através da técnica de ultrafiltração, na qual, a quantificação de fármaco livre, em suspensão, é determinada após a centrifugação (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). O método consistiu em colocar as nanopartículas, previamente filtradas utilizando um filtro de seringa 0,8 µm, em um tubo contendo o filtro Amicon e centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm. Em seguida, após a centrifugação, por meio do filtro Amicon utilizado, houve a separação da fração de fármaco

livre passando para o ultrafiltrado e o fármaco encapsulado retido no filtro. O ultrafiltrado coletado foi diluído em metanol e quantificado pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para isso, foram realizadas diluições a partir da solução estoque de miconazol 1,0 mg/mL em metanol e obtidas diferentes concentrações: 2,5; 5; 12,5; 25; 62,5; 125; 187,5; 250 µg/mL. As soluções diluídas foram filtradas em uma membrana de PVDF de 0,22 µm antes das análises serem realizadas. As amostras foram preparadas e feitas as leituras no mesmo dia e em três dias diferentes. Além disso, foi realizado a quantificação total da formulação diluída em fase móvel, permitindo calcular a eficiência de encapsulação utilizando a equação abaixo, expressa em porcentagem.

$$\% \text{ Eficiência Encapsulação} = \frac{(Q_{\text{total}} - Q_{\text{ultrafiltrado}})}{Q_{\text{total pesada}}} \times 100$$

5.6 Análise da atividade fúngica *in vitro* das nanopartículas produzidas frente a cepas de *Candida albicans*

A atividade antifúngica das nanopartículas, por meio da formação de halos de inibição, foi determinada usando cepas de *C. albicans*. As cepas foram crescidas em placas contendo ágar Sabouraud (Kasvi). O teste foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Laboratório de Microbiologia Industrial situado no *campus* Centro Oeste Dona Lindu.

5.6.1 Inóculo

Para realização do inóculo, cepas de *C. albicans* ATCC10231 foram reativadas em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose a 2% (p/v) durante 24 horas a 37°C. Colônias isoladas do fungo foram coletadas e transferidas para tubos contendo solução salina estéril. Por fim, a concentração de leveduras presente no tubo foi ajustada para 10⁵ células de leveduras/mL conforme a escala padrão de McFarland (SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2019).

5.6.2 Método de difusão em ágar

Suspensões de *C. albicans* foram inoculadas em placas contendo ágar Sabouraud. Em seguida, foram feitos poços de 3 mm de diâmetro, e em cada poço foi adicionado 100 µL de diferentes soluções, sendo elas: de miconazol, nanopartículas sem fármaco, nanopartículas de

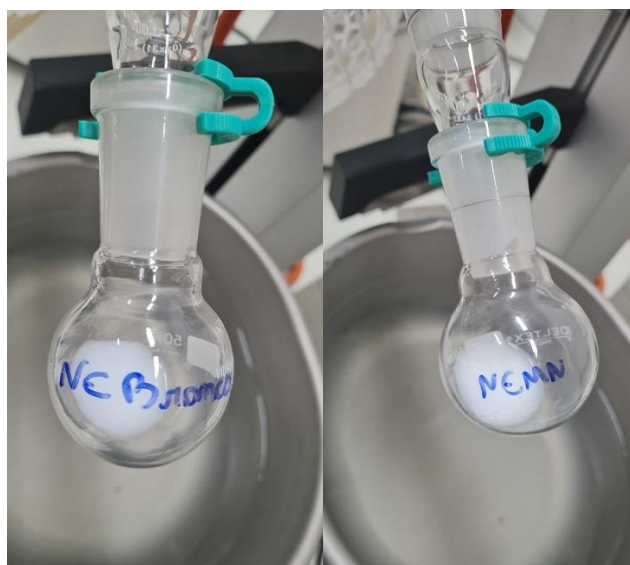
miconazol não revestidas e nanopartículas de miconazol revestidas com AH. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo o experimento realizado em triplicata. As zonas de inibição foram posteriormente medidas, e a susceptibilidade do fungo foi avaliada considerando a especificação do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2002; SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2019).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento de nanopartículas de miconazol

As nanopartículas foram produzidas por meio da nanoprecipitação (Fessi et al., 1989) e apresentaram uma coloração branca, com volume final de 2 mL de formulação, na concentração de 0,5mg/mL de miconazol (Figura 4). A concentração de miconazol foi determinada através de tentativas de incorporação de diferentes concentrações, considerando valores próximos da concentração determinada por LUCENA e colaboradores (2018). Concentrações acima de 0,5mg/mL houve precipitação do fármaco.

Figura 4. Nanoesferas de PCL sem o fármaco (NS branco) e contendo miconazol a 0,5 mg/mL (NSMN)



Esse método consiste na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento da fase orgânica com a fase aquosa. É uma técnica de menor complexidade e que requer menos consumo energético, além de ser aplicável amplamente na fabricação de nanoesferas (HORNIG et al., 2009). Para isso, faz-se necessária a preparação da fase solvente e da fase não solvente, e em seguida, é vertida a fase orgânica na fase aquosa em agitação magnética. O solvente

orgânico é evaporado por meio do rotavapor, permitindo ao final a formação das nanoesferas em suspensão aquosa (RIVAS et al., 2017). Fatores importantes para esse método devem ser levados em consideração como, a miscibilidade dos solventes e a presença de soluções poliméricas diluídas (HORNIG et al., 2009).

Diversos polímeros, em especial os poliésteres biodegradáveis como polilactídeo-co-glicolido (PLGA), polilactídeo (PLA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL), são frequentemente utilizados no encapsulamento de fármacos. A PCL, foi o polímero de escolha para o trabalho, devido as suas propriedades relevantes, como boa solubilidade, baixo ponto de fusão, biocompatibilidade e facilidade de modelagem, sendo capaz de controlar a liberação de ingredientes ativos e a capacidade de incorporar agentes antimicrobianos potencializando sua função (WOODRUFF, M.A.; HUMACHER, D.W., 2010; MARTÍNEZ-ABAD et al., 2013).

Além disso, já foi evidenciado em outros estudos que a utilização da PCL na produção de nanoesferas obteve alta taxa de encapsulação, sendo em torno de 90 a 100% (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). Dessa forma, considerando que o miconazol possui característica lipofílica, sua incorporação a matriz polimérica se torna mais eficiente, pois sua baixa solubilidade em água, favorece sua interação com o PCL, o qual, também possui propriedades hidrofóbicas (DE CARO; GIANNOLA; DI PRIMA, 2021).

A fase orgânica é composta por acetona, usada mais frequentemente, além dos formadores de filmes, como a PCL, o princípio ativo e um tensoativo lipofílico, Span 60. Em contrapartida a fase aquosa é composta pela água Milli-Q e suplementada com um tensoativo hidrofílico, Tween 80 (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RIVAS et al., 2017).

Para formação das nanoesferas, é importante a adição de tensoativos, como Tween 80 e Span 60, uma vez que estes, agem como estabilizadores do sistema polímero-tensoativo (FESSI et al., 1989; DELGADO, 2013). Dessa forma, quando o solvente orgânico é difundido na água, provoca a agregação do polímero, o que leva a formação das nanoesferas (FESSI et al., 1989; DELGADO, 2013). Além disso, o uso de dois tensoativos não iônicos formam barreiras estéricas que diminuem a agregação e tamanho das nanopartículas aumentando a estabilidade da formulação (SADIQUE et al., 2018).

A redução do tamanho de partículas em formulações compostas por Tween 80 já foi mostrada em estudo realizado por KHAYATA e colaboradores (2012) o qual ao analisar nanocápsulas incorporadas por vitamina E com variações dos parâmetros, a preparação que apresentava Tween 80, obteve melhor tamanho médio (185 nm) e alta eficiência de encapsulação (98%). SADIQUE e colaboradores (2018) ao preparar uma microemulsão

composta por nitrato de miconazol avaliou sua solubilidade frente a diferentes tensoativos, como tween 80, tween 20, span 80, entre outros, sendo o tween 80 escolhido como o tensoativo a ser utilizado, apresentando uma solubilidade em miconazol de $51,3 \pm 2,5$ mg/mL.

No desenvolvimento das nanopartículas através do método de nanoprecipitação, a alteração nos parâmetros de formulação, como a natureza e quantidades das fases solvente e não solvente, a natureza e concentração do polímero e dos tensoativos utilizados possuem implicações cruciais nas características físico-químicas das nanopartículas, como mudanças no tamanho das partículas, eficiência de encapsulamento do fármaco, potencial zeta e índice de polidispersão (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; RIVAS et al., 2017).

Dessa forma, a caracterização das nanopartículas foi avaliada em relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. O resultado foi expresso como as médias e desvio padrão das leituras conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas quanto aos parâmetros: tamanho de partícula, PDI e potencial zeta

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (-mV)
NS BRANCA	$170,9 \pm 0,3464$	$0,101 \pm 0,017$	$-25,1 \pm 0,400$
NS MN 0,5 mg/ml	$188,3 \pm 0,8888$	$0,098 \pm 0,026$	$-25,7 \pm 0,208$

O tamanho das nanopartículas é importante para a aplicabilidade de formulações, uma vez que fatores como estabilidade, eficiência de encapsulamento, perfil de liberação e biodistribuição dependem de tal parâmetro (DANAEI et al., 2018). A técnica de espalhamento dinâmico de luz mede o movimento browniano das nanopartículas suspensas, sendo a sua velocidade relacionada ao diâmetro, resultando na medida do diâmetro médio de partículas (CHO et al., 2013). Tamanhos de partículas menores ou iguais a 300 nm conseguem entregar o fármaco nas camadas mais profundas do tecido biológico, o que é ideal para a eliminação das hifas da *C. albicans* estabelecidas em regiões profundas das células epiteliais vaginais (DANAEI et al., 2018).

O conceito índice de polidispersão caracteriza o grau de heterogeneidade da distribuição de tamanho de partículas (DANAEI et al., 2018). É avaliado a partir da análise cumulativa da autocorrelação de intensidade medida pelo espalhamento dinâmico de luz (CHO et al., 2013; DANAEI et al., 2018). Valores próximos a 0,3 são considerados bons e indicam uma distribuição homogênea entre as partículas e valores maiores que 0,5 indicam uma ampla distribuição do tamanho das partículas (CHO et al., 2013; COSTA et al., 2019).

Por fim, tem-se o potencial zeta, que representa o grau de repulsão eletrostática entre as partículas, sendo importante para avaliar a possível agregação de partículas durante o armazenamento do produto (AL-MAGHRABI et al., 2020). Valores de potenciais entre -10 e +10 mV caracterizam as nanopartículas como neutras, enquanto potenciais menores que -30 e maiores que +30 mV, consideram-se nanopartículas como aniônicas e catiônicas, respectivamente. Além disso, valores superiores a 30mV em módulo indicam boa estabilidade das nanopartículas (CLOGSTON; PATRI, 2011; BHATTACHARJEE, 2016).

Dessa forma, as nanopartículas de miconazol apresentaram valores dentro do desejável, conforme mostrado pela Tabela 1. Esses resultados indicam que a formulação consegue alcançar regiões mais profundas da pele, por ter tamanho menor que 300 nm, além de mostrar através do IPD e do potencial zeta que as nanopartículas se encontram em um sistema monodisperso e com boa estabilidade, garantindo menores chances de agregação das partículas. Tais resultados corroboram com estudos realizados por AL-MAGHRABI et al (2020), o qual mostrou o desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos sólidos incorporados de miconazol a fim de aumentar a sua eficácia no tratamento de doenças cutâneas fúngicas. Neste estudo, as nanopartículas obtiveram tamanho de partículas inferiores a 300 nm, índice de polidispersão menores que 0,3 e potencial zeta superior a -30 mV.

6.2 Revestimento das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de ácido hialurônico foi avaliada em relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Os resultados foram expressos como as médias das leituras conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização das nanopartículas após revestimento com solução de ácido hialurônico em diferentes concentrações.

Nanopartículas	Tamanho (nm)	Dispersão média	Potencial zeta (-mV)
AH 0,05%	200,2 ± 2,380	0,181 ± 0,010	-24,9 ± 0,750
AH 0,1%	224,2 ± 1,820	0,222 ± 0,007	-47,8 ± 0,781
AH 0,15%	199,5 ± 2,020	0,431 ± 1,020	-57,5 ± 0,100
AH 0,2%	202,9 ± 2,500	0,443 ± 0,400	-55,4 ± 0,410
AH 0,25%	211,2 ± 2,470	0,421 ± 0,100	-53,2 ± 0,420

AH 0,5%	275,2 ± 3,010	0,588 ± 0,010	-64,0 ± 0,500
AH 1,5%	842,6 ± 3,410	0,683 ± 0,800	-60,4 ± 0,700
AH 3,0%	*	*	*

* Alta concentração de AH levou a formação de um gel, impossibilitando a caracterização.

Diante dos resultados, a formulação composta por 0,05% de AH foi escolhida para utilização da nanopartícula revestida, uma vez que obteve menores valores de IPD e tamanho de partícula, além do potencial zeta, próximo a -30 mV, garantindo melhor homogeneidade e maior estabilidade. Dessa forma, foi realizado o revestimento das nanoesferas de miconazol e caracterizadas conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Caracterização das nanopartículas revestidas

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (-mV)
NS BRANCA + AH	175 ± 0, 3512	0,151 ± 0,008	-39,1 ± 0,058
NSMN 0,5 mg/ml + AH	233,9 ± 0,7371	0,246 ± 0,021	-33,1 ± 0,808

Conforme apresentado pela Tabela 3, as nanopartículas revestidas por AH a 0,05% (p/v) apresentaram diâmetro de aproximadamente 234 nm, IPD em torno de 0,25 e potencial zeta cerca de -33mV. Dessa forma, as nanopartículas atendem aos requisitos de tamanho para eliminação dos fungos na CVV, indicando um sistema monodisperso e estável, com menor possibilidade de agregar ou coalescer.

As caracterizações das nanopartículas revestidas por AH a 0,05% (p/v) foram compatíveis aos estudos realizados MELO e colaboradores, (2019), o qual avaliaram nanopartículas poliméricas compostas anfotericina B revestida por ácido hialurônico. Nesse estudo, as nanopartículas obtiveram tamanho de partículas inferiores a 300 nm, índice de polidispersão entre 0,3 e potencial zeta superior a -30 mV. Além disso, assim como neste estudo, MELO e colaboradores, (2019) demonstraram que nanopartículas à base de Eudragit RL100 incorporadas com anfotericina B e revestidas com ácido hialurônico apresentaram maior diâmetro e potencial zeta quando comparados àqueles verificados para a formulação não revestida, possivelmente devido à presença dos grupos aniônicos, gerados pelo revestimento eletrostático com AH (MELO et al., 2019).

6.3 Teste de estabilidade das nanopartículas

Foi avaliada a estabilidade das nanopartículas não revestidas e revestidas por 0,05% (p/v) de AH nos tempos zero, 7, 14 e 30 dias, mantidas a temperatura de 8°C. Nos tempos pré-estabelecidos, alíquotas foram retiradas e analisadas visualmente (se houve ou não presença de precipitados) e também se determinou o diâmetro, IPD e potencial zeta. Não houve alterações visíveis das formulações nos tempos avaliados, nem diferença significativa entre os dados obtidos ($p < 0,05$). Os parâmetros físico-químicos obtidos para as nanopartículas determinados nos diferentes tempos estão descritos nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Valores médios de tamanho (nm) \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1°, 7°, 14° e 30° dias posteriores ao seu preparo.

Dia	NSB	NSB+AH	NSMN	NSMN+AH
1°	191.0 \pm 1.350	192.6 \pm 1.253	202.2 \pm 2.103	200.2 \pm 2.380
7°	195.0 \pm 0.655	193.2 \pm 3.014	202.9 \pm 1.274	202.2 \pm 5.229
14°	193.8 \pm 1.365	193.3 \pm 1.518	197.3 \pm 0.642	210.7 \pm 0.808
30°	191.7 \pm 0.264	194.9 \pm 1.997	199.1 \pm 1.159	206.3 \pm 2.107

*NSB: nanoesfera branca; NSB+AH: nanoesfera revestida com ácido hialurônico; NSMN: nanoesfera de miconazol; NSMN+AH: nanoesfera de miconazol revestida com ácido hialurônico.

Tabela 5. Valores do índice de polidispersão \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1°, 7°, 14° e 30° dias posteriores ao seu preparo.

Dia	NSB	NSB+AH	NSMN	NSMN+AH
1°	0.156 \pm 0,014	0.152 \pm 0.007	0.174 \pm 0.023	0.181 \pm 0.011
7°	0.167 \pm 0.009	0.169 \pm 0.021	0.179 \pm 0.011	0.181 \pm 0.007
14°	0.162 \pm 0.013	0.182 \pm 0.015	0.157 \pm 0.013	0.222 \pm 0.006
30°	0.173 \pm 0.013	0.174 \pm 0.010	0.164 \pm 0.024	0.214 \pm 0.022

*NSB: nanoesfera branca; NSB+AH: nanoesfera revestida com ácido hialurônico; NSMN: nanoesfera de miconazol; NSMN+AH: nanoesfera de miconazol revestida com ácido hialurônico.

Tabela 6. Valores do potencial zeta (mV) \pm DP das nanopartículas produzidas durante o 1°, 7°, 14° e 30° dias posteriores ao seu preparo.

Dia	NSB	NSB+AH	NSMN	NSMN+AH
-----	-----	--------	------	---------

1°	-32.9 ± 0.379	-30.1 ± 0.850	-25.7 ± 0.917	-24.9 ± 0.751
7°	-33.1 ± 0.321	-35.7 ± 0.493	-19.1 ± 0.850	-24.6 ± 0.436
14°	-33.2 ± 0.200	-34.0 ± 0.379	-12.8 ± 1.170	-26.5 ± 1.21
30°	-33.3 ± 0.416	-36.6 ± 1.42	-16.0 ± 0.436	-31.1 ± 2.79

*NSB: nanoesfera branca; NSB+AH: nanoesfera revestida com ácido hialurônico; NSMN: nanoesfera de miconazol; NSMN+AH: nanoesfera de miconazol revestida com ácido hialurônico.

Fatores físico-químicos como as condições de armazenamento, composição e preparo das formulações são relevantes para a manter a estabilidade das nanopartículas poliméricas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além disso, para que se obtenha a entrega bem sucedida do fármaco no alvo de ação, a manutenção da estabilidade da formulação é crucial, uma vez que, o destino das nanopartículas *in vivo* depende da capacidade de manter o tamanho das partículas, permitir a liberação adequada do fármaco para as células e de resistir à agregação ou a degradação (CHO et al., 2013).

Em vista disso, estudos têm se concentrado em avaliar a estabilidade e buscar meios de identificar as propriedades nomeadas como rastreadores de instabilidade. Sendo assim, a estabilidade das nanopartículas poliméricas pode-se ser analisada conforme o seu potencial zeta, tamanho das partículas e índice de polidispersão (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Valores elevados do potencial zeta devem ser obtidos a fim de garantir a estabilidade, evitando a agregação, devido as forças repulsivas entre as nanopartículas. (PAL et al., 2011; COSTA et al., 2019). A distribuição do tamanho das partículas também deve ser considerada, uma vez que afeta a liberação e direcionamento do fármaco. Tamanhos de partículas menores oferecem maior área de superfície, fornecendo rápida liberação do fármaco, porém, essas partículas tendem a se agregar ou promover a degradação durante o armazenamento, o que leva a avaliar constantemente tais parâmetros (PAL et al., 2011).

Tais resultados estão de acordo com o trabalho realizado por KENECHUKWU e colaboradores (2018), no qual, a fim de promover um novo método de administração intravaginal baseado em matrizes lipídicas peguilhadas composta por miconazol para o tratamento de candidíase, foi avaliado a estabilidade da formulação quanto ao tamanho no dia do desenvolvimento, após uma semana, 14 e 30 dias, não havendo aumentos significativos durante o tempo avaliado ($p < 0,05$). Outro estudo presente na literatura, realizado por ABDEL-RASHID e colaboradores, (2022), analisou a estabilidade através do tamanho, IPD e potencial zeta de nanocápsulas poliméricas contendo miconazol durante três meses. Neste estudo os

resultados foram estatisticamente insignificantes ($p < 0,05$), indicando a estabilidade das nanocápsulas.

Dessa forma, o aumento dos parâmetros avaliados, como o tamanho de partícula, pode ser justificado devido ao aumento das forças de interações entre as partículas, promovendo agregação ao longo do tempo (KENECHUKWU et al., 2018). Em vista disto, estudos mostram que a adição de tensoativos hidrofílicos, como Tween 80, é imprescindível para a estabilidade física das nanopartículas, uma vez que atuam reduzindo o tamanho de partículas (FESSI et al., 1989; ABDEL-RASHID et al., 2022). Além disso, o PCL devido a sua natureza hidrofóbica e a presença de cargas negativas em sua superfície, resultam em um potencial negativo que mantém a repulsão entre as partículas impedindo a agregação, o que garante a estabilidade da formulação (ABDEL-RASHID et al., 2022). Adicionalmente, formulações compostas por diferentes polímeros, ao serem armazenadas em temperaturas entre 4 e 8°C, quando comparadas, a formulação que continha PCL em sua composição, obteve o processo de degradação mais lento, mantendo a estabilidade da formulação por mais tempo que as demais (KHAYATA et al., 2012).

6.4 Eficiência de encapsulação (EE%) do miconazol

Para determinar a eficiência de encapsulação do miconazol na nanopartícula foi necessário quantificar a concentração de miconazol livre e associado através da técnica de centrifugação em filtro Amicon, o qual consiste na centrifugação e separação das fases nanodispersas. Dessa forma, a quantidade do fármaco associado é determinada pela diferença entre o teor total e o teor livre (SANTOS, 2012).

O estudo eficiência de encapsulação do miconazol nas nanoesferas revestidas e não revestidas demonstraram alta eficiência com valores de 92,54% e 84,56% para NSMN e NSMN+AH, respectivamente. Tal resultado corroboram com estudos realizados por MELO e colaboradores (2019), o qual ao avaliarem a eficiência de encapsulamento de nanopartículas Eudragit RL 100 incorporadas com anfotericina B e revestidas com ácido hialurônico, obtiveram uma eficiência próxima a 87%. Assim como realizado por SANAP e MOHANTA (2012), ao analisar quanto a eficiência de encapsulação de nanoestruturados incorporados por nitrato de miconazol, obtiveram alta eficiência, no valor de 92,13%.

Dessa forma, os valores de EE% podem estar relacionados a alta lipofilia do miconazol junto a presença do PCL, uma vez que ambos são de natureza hidrofóbicas e, portanto, apresentam grande afinidade, mantendo a quimiotática entre eles (ABDEL-RASHID et al.,

2022). Além disso, o menor valor de EE% encontrado da NSMN+AH, é possivelmente devido a menor interação entre as cadeias hidrofílicas do AH com núcleo hidrofóbico do PCL, uma vez que o AH apresenta maior afinidade em componentes hidrofílicos (BARBAULT-FOUCHER et al., 2002).

Sendo assim, o encapsulamento do miconazol possivelmente melhora a eficácia terapêutica do fármaco, uma vez que as nanoesferas são capazes de prolongar o tempo do fármaco no local de ação, promovendo um gradiente crescente da concentração do fármaco, o que favorece sua absorção e biodisponibilidade (COSTA et al., 2019).

6.5 Análise da atividade antifúngica *in vitro* das nanopartículas produzidas contra cepas de *Candida albicans*

A atividade antifúngica das nanopartículas foi testada contra a cepas de *C. albicans* usando a técnica de difusão em poço, apresentando valores conforme mostrado na Tabela 6. Para o teste, foi usada a solução de miconazol a 0,5 mg/mL como controle positivo, confirmando seu efeito antifúngico com halo de inibição de 16 mm de diâmetro. A solução de ácido hialurônico 0,05% (p/v) e nanoesferas brancas com e sem revestimento foram utilizadas como controle negativo, uma vez que não possuem propriedades antifúngicas e consequentemente não apresentaram halos de inibição. Por outro lado, as nanopartículas revestidas por AH e não revestidas incorporadas de miconazol a 0,5 mg/mL também inibiram a *C. albicans* formando halos de inibição comparáveis àqueles obtidos pela solução de miconazol a 0,5 mg/mL.

Tabela 6. Avaliação da atividade antifúngica das nanoesferas pelo método de difusão em ágar

Amostras	Diâmetro do halo (mm)
Nanoesferas Branca	-
Nanoesferas Branca revestida	-
Solução de ácido hialurônico 0,05% p/v	-
Solução de Miconazol 0,5 mg/mL	16
Nanoesferas contendo Miconazol 0,5mg/mL	13
Nanoesferas contendo Miconazol 0,5mg/mL revestidas	12

Figura 5. Halos de inibição em placas de ágar semeadas com *C. albicans*



1: Solução de ácido hialurônico; 2: Nanoesfera de miconazol; 3: Nanoesfera de miconazol revestida; 4: Nanoesfera branca; 5: Nanoesfera branca revestida.

Entretanto, é notável que o halo de inibição da solução de miconazol apresentou-se maior quando comparado as formulações compostas por miconazol com e sem o revestimento. Isso se deve ao fato de que a solução de miconazol permitir que o fármaco fique em contato diretamente com as cepas de *C. albicans*, permitindo a disponibilidade imediata do fármaco nos poços permanecendo inalterado durante o tempo de incubação. Em contrapartida, as nanoesferas proporcionaram uma liberação controlada de miconazol durante o tempo de incubação, ou seja, a liberação do fármaco foi liberada gradualmente, promovendo a formação de halos de inibição menores (SOUZA et al., 2018).

Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com pesquisas realizadas anteriormente, como o estudo realizado por MELO e colaboradores (2019). A fim de produzir nanopartículas à base de Eudragit RL100 carregadas de anfotericina B revestidas com ácido hialurônico para o tratamento da CVV, foi avaliada a atividade destas nanopartículas frente a cepas de *C. albicans* pelo método de difusão em ágar, o que resultou em zona de inibição maior na solução de anfotericina B (18,33 mm) quando comparada àquelas produzidas pelas nanopartículas com e sem o revestimento (14,83 mm e 12,50 mm, respectivamente) (MELO et al., 2019).

Dessa forma, considerando o ambiente biológico, o efeito antifúngico do miconazol em solução provavelmente seria menor, uma vez que a depuração da quantidade total do fármaco induziria a sua redução no alvo de ação, levando ao acúmulo temporal insuficiente, dificultando a erradicação das leveduras (SOUZA et al., 2018). Por outro lado, quando vetorizado, o miconazol é liberado do nanocarreador gradualmente para o sítio alvo por um período

prolongado, atingindo regiões mais profundas do tecido epitelial vaginal, eliminando o fungo e prevenindo a CVV recorrente (SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2019).

7 CONCLUSÃO

Nanopartículas incorporadas de miconazol e revestidas ou não com ácido hialurônico foram sintetizadas pelo método da nanoprecipitação. Os valores de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas foram ideais no que tange a aplicação vaginal local e a presença do ácido hialurônico pode ser benéfica, pois sugere que a ligação aos receptores CD44 das células epiteliais vaginais, possivelmente melhora a vetorização do miconazol no interior destas células infectadas pela *C. albicans*. A encapsulação do miconazol nas nanopartículas atingiu valores superiores a 90%, demonstrando a eficiência do método de preparo destes nano sistemas. Adicionalmente, as nanopartículas mostraram-se estáveis sob baixas temperaturas (aproximadamente 8 °C) por 30 dias consecutivos, pois os parâmetros de caracterização se mantiveram sem alterações significativas. Finalmente, as nanopartículas foram eficazes na eliminação da *C. albicans in vitro*, pois foram capazes de eliminar este microrganismo em condições experimentais. Apesar da obtenção de resultados preliminares e da necessidade de realizar novos experimentos para aumentar o conhecimento acerca das nanopartículas incorporadas de miconazol e recobertas do ácido hialurônico, sugere-se que tais nano sistemas poderiam ser utilizados como adjuvantes no tratamento da candidíase vulvovaginal e candidíase vulvovaginal recorrente, quando os tratamentos convencionais já estabelecidos não estiverem sendo eficazes.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RASHID, R. S. et al. Polymeric versus lipid nanocapsules for miconazole nitrate enhanced topical delivery: *in vitro* and *ex vivo* evaluation. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 294–304, 2022.
- ACHARYA, P.S. et al. Fibroblast migration is mediated by CD44-dependent TGF β activation. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 9, p. 1393- 1402, 2008.
- AGARWAL, R.; KATARE, O.P. Preparation and *in vitro* evaluation of miconazole nitrateloaded topical liposomes. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 48–60, 2002.
- AMARAL, A.C. et al. Miconazole loaded chitosan-based nanoparticles for local treatment of vulvovaginal candidiasis fungal infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 409–415, 2019.
- AL-MAGHRABI, P.M. et al. Influence of formulation variables on miconazole nitrate -loaded lipid based nanocarrier for topical delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, p. 1-12, 2020.
- ARDIZZONI, A. et al. Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 22, p. 2329–2338, 2011.
- BARASCH, A.; GRIFFIN, A.V. Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials. **Future microbiol.**, v. 3, n.3, p. 265-269, 2008.
- BARBAULT-FOUCHER, S. et al. Design of poly- ϵ -caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 365–375, 2002.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, 2012.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BUZZACCARINI, G. et al. Hyaluronic acid in vulvar and vaginal administration: evidence from a literature systematic review. **Climacteric**, [s.l.], p. 1-13, 2021.

CALVO, N.L. et al. Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, p. 181-191, 2018.

CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. Zeta Potential Measurement. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**, v. 697, p. 63-70, 2011.

CHO, E.J. et al. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 2093–2110, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi, M38, 3ed. 2002.

COSTA, A.F. et al. Development, characterization, and *in vitro*–*in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 52-62, 2019.

COSTE, A. et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. **American society for microbiology**, v. 6, n. 10, p. 1889-1904, 2007.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v.10, n. 57, p. 1-17, 2018.

DE CARO, V.; GIANNOLA, L.T.; DI PRIMA, G. Solid and semisolid innovative formulations containing Miconazole-Loaded solid lipid microparticles to promote drug entrapment into the buccal mucosa. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1361, 2021.

DELGADO, J.M.F. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa, 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Tecnologia Biomédica, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

DESAI, K.; SAMBAREY, P. Comparison of Single Dose Sertaconazole *versus* Three Dose Clotrimazole Regime in Treatment of Uncomplicated Vulvovaginal Candidiasis- A Prospective Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 13, n. 1, p. 12-14, 2019.

ELMOSLEMANY, R.M. et al. Propylene glycol liposomes as a topical delivery dystem for miconazole nitrate: comparison with conventional liposomes. **American association of pharmaceutical scientists**, v. 13, n. 2, p. 723-731, 2012.

FERRIS, D.G. et al. Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. **The american college of obstetricians and gynecologists**, v. 99, n. 3, p. 419-125, 2002.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

HAGHDOOST, N.S. et al. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 4, p. 298-305, 2016.

HORNIG, S. et al. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. **J. Mater. Chem.**, v. 19, p. 3838–3840, 2009.

ILKIT, M.; GUZEL, A.B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n.3, p. 250-261, 2011.

PAL, S.L. et al. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n.6, p. 228-234, 2011.

JOHAL, H. S. et al. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. **Drug Delivey**, [s.l.], p. 1-14, 2014.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. Farmacologia básica e clínica. 13 ed. Porto Alegre: **McGraw-Hill**, 2017. 1202 p.

KENECHUKWU, F.C. et al. Novel intravaginal drug delivery system based on molecularly PEGylated lipid matrices for improved antifungal activity of miconazole nitrate. **BioMed Research International**, [s.l.], p. 1-19, 2018.

KHAYATA, N. et al. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 254-259, 2012.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 327–341, 2004.

LUCENA, P.A. et al. *In vivo* vaginal fungal load reduction after treatment with itraconazole-loaded polycaprolactone-nanoparticles. **J. Biomed. Nanotechnol**, v. 14, p. 347–1358, 2018.

- LUDWIG, D.B. et al. Antifungal activity of chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles containing amphotericin B. **Mycopathologia**, v. 183, n. 4, p. 659-668, 2018.
- MARTÍNEZ-ABAD, A. et al. Antibacterial performance of solvent cast polycaprolactone (PCL) films containing essential oils. **Food Control**. v. 34, n.1, p. 214-220, 2013.
- MATSUMOTO, H. et al. Evaluation of pathogenicity of *Candida albicans* in Germination – ready States using a silkworm infection model. **Medical Mycology Journal**, v. 54, p. 131-140, 2013.
- MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165–196, 2001.
- MELO, C.M. et al. Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], p.1-35, 2019.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.
- OLIVEIRA, R.P.; OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA, J.M. New strategies for local treatment of vaginal infection. **Advanced Drug Delivery Review**, [s.l.], p. 1-51, 2015.
- OURIQUE, A.F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.
- PAROLIN, C. et al. Anti-*Candida* activity of hyaluronic acid combined with *Lactobacillus crispatus* lyophilised supernatant: a new antifungal strategy. **Antibiotics**, v. 10, n. 628, p. 1-9, 2021.
- PEIRA, E. et al. Positively charged microemulsions for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 119–123, 2008.
- PIÉRARD, G.E. et al. Miconazole, a pharmacological barrier to skin fungal infections. **Expert Opin. Pharmacother**. v. 13, n. 8, p. 1187-1194, 2012.
- RIVAS, C.J.M. et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n.1, p. 66-81, 2017.

SADIQUE, A. et al. Miconazole Nitrate Microemulsion: Preparation, Characterization and Evaluation for Enhancement of Antifungal Activity. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 1578-1586, 2018.

SANAP, G.; MOHANTA, G.P. Design and Evaluation of Miconazole Nitrate loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for improving the Antifungal therapy. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 1, p. 046-054, 2013.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SANTOS, S. S. Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas para o tratamento da candidíase vulvovaginal. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.

SOBEL, J.D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018.

SOUZA, R.O. et al. Amphotericin B-Loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibers: An Alternative Therapy Scheme for Local Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 2674-2685, 2018.

THEOCHARIS, A.D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery review**, v. 97, p. 4-27, 2016.

WANG, Z. et al. CD44 Directed nanomicellar payload delivery platform for selective anticancer effect and tumor specific imaging of triple negative breast cancer. **Nanomedicina**, v. 14, n. 4, p. 1441-1454, 2018.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n.10, p.1217-1256, 2010.

ZAMBONI, F.; WONG, C.K.; COLLINS, M.N. Hyaluronic acid association with bacterial, fungal and viral infections: Can hyaluronic acid be used as an antimicrobial polymer for biomedical and pharmaceutical applications?. **Bioactive Materials**, v.19, p. 458–473, 2022.