



Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia



Obtenção e Caracterização de Nanoesferas Poliméricas Revestidas de Ácido Hialurônico e Associadas à Própolis como Alternativa para Tratamento da Candidíase Vulvovaginal Recorrente.

Isabelle Cristina Pinto

Ouro Preto, MG

2023

Isabelle Cristina Pinto

Obtenção e Caracterização de Nanoesferas Poliméricas Revestidas de Ácido Hialurônico e Associadas à Própolis como Alternativa para Tratamento da Candidíase Vulvovaginal Recorrente.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Rodrigues da Silva

Coorientadora: Msc. Aniely dos Reis Teixeira

Ouro Preto, MG

Março de 2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P659o Pinto, Isabelle Cristina.

Obtenção e caracterização de nanoesferas poliméricas revestidas de ácido hialurônico e associadas à própolis como alternativa para tratamento da candidíase vulvovaginal recorrente.. [manuscrito] / Isabelle Cristina Pinto. - 2023.

53 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva.

Coorientadora: Ma. Anielly dos Reis Teixeira.

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

1. Candidíase. 2. Própole. 3. Polímeros. 4. Ácido hialurônico. 5. Nanotecnologia. I. Silva, Gisele Rodrigues da. II. Teixeira, Anielly dos Reis. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 620.3

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabelle Cristina Pinto (I. C. P.)

Obtenção e caracterização de nanoeferas poliméricas revestidas de ácido hialurônico e associadas à própolis como alternativa para o tratamento da candidíase vulvovaginal recorrente

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

Aprovada em 07 de março de 2023

Membros da banca

Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestre Aniely dos Reis Teixeira - Co-orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestranda Cristiane del Bello - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestrando Matheus Rodrigues Teixeira - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Gisele Rodrigues da Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 07/03/2023



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Rodrigues da Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/03/2023, às 09:03, 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 **0487819** e o código CRC **56A52186**.

RESUMO

Sabe-se que as infecções fúngicas vaginais atingem aproximadamente 70% das mulheres adultas e, atualmente, o tratamento baseia-se na administração de fármacos antifúngicos como os imidazólicos, triazólicos e polienos. Entretanto, devido à resistência dos fungos ao tratamento convencional e à alta recorrência da Candidíase Vulvovaginal (CVV), novas alternativas de tratamento se tornam cada vez mais relevantes. Diante disso, com o objetivo de viabilizar uma opção de tratamento natural, segura e eficiente para a candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), este estudo apresenta o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas (NP) incorporadas ao extrato de própolis milagres (EPM), revestidas ou não com ácido hialurônico (AH), bem como a avaliação de sua capacidade antifúngica *in vitro* e *in vivo*. As NPs foram desenvolvidas por nanoprecipitação e sua caracterização foi feita pela determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (Dh), do índice de polidispersão (IPD) e do potencial zeta (PZ). As NPs EPM revestidas apresentaram tamanho de $169,5 \pm 0,3$ nm, IPD de $0,12 \pm 0,01$ e PZ de $-28,5 \pm 0,2$ mV, e as NPs EPM não revestidas apresentaram tamanho de $168,5 \pm 0,2$ nm, IPD de $0,128 \pm 0,02$ e PZ de $-27,8 \pm 0,58$ mV. Estes tamanhos são ideais para a penetração das NPs no tecido epitelial vaginal, e o IPD inferior a 0,3 demonstrou a homogeneidade do tamanho das partículas. O PZ próximo a 30 em módulo é um bom indicativo da estabilidade do sistema. A estabilidade das NPs foi avaliada por 30 dias, quanto ao Dh, IPD e PZ, não havendo diferença significativa entre os dias. O EPM apresentou atividade antifúngica dependente da dose, e as NPs EPM, revestidas e não revestidas, não inibiram a *C. albicans in vitro*, possivelmente devido à liberação de baixas concentrações dos compostos ativos da própolis. Entretanto, no modelo murino de CVV, as NPs EPM reduziram em 76,3% a carga fúngica dos animais infectados com *C. albicans*. Enquanto as NPs EPM AH promoveram redução de 100% da carga fúngica, evidenciando a atividade biológica do EPM associado a NP em condições fisiológicas reais. Conclui-se que ambas as formulações apresentam potencial terapêutico como alternativa no tratamento de CVVR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>C. albicans</i> : leveduras na coloração Gram e pseudohifas na coloração PAS.....	12
Figura 2. Representação das vias de infecção por <i>C. albicans</i> no tecido vaginal.....	14
Figura 3. Estruturas químicas dos principais flavonoides encontrados na própolis verde brasileira.	20
Figura 4: Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos encontrados na própolis verde brasileira.....	20
Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	23
Figura 6. Formulações de (A) NS BRA e (B) NS EPM após evaporação do solvente no rotaevaporador.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquemas posológicos para tratamento de CVV não complicada.....	16
Tabela 2. Esquemas posológicos para tratamento de CVVR	16
Tabela 3. Descrição da composição da FO e da FA para obtenção de 2,0 mL da formulação	27
Tabela 4. Grupos experimentais conforme protocolos de tratamento para avaliação <i>in vivo</i> do efeito de nanopartículas no tratamento de CVV.....	32
Tabela 5. Caracterização das nanoesferas brancas e associadas ao EPM.....	36
Tabela 6. Dh, IPD e PZ das NS BRA revestidas com diferentes concentrações de AH	39
Tabela 7. Caracterização das NS revestidas e não revestidas quanto ao Dh, IPD e PZ	40
Tabela 8. Análise do Diâmetro hidrodinâmico das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade	41
Tabela 9. Análise do índice de polidispersão das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade.....	41
Tabela 10. Análise do Potencial Zeta das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade.....	42
Tabela 11. Halos obtidos a partir do método de difusão em poço, utilizando 100uL de amostra.	43
Tabela 12. Diâmetro dos halos de inibição conforme volume de amostra.....	44
Tabela 13. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica observada nos animais tratados de forma intravaginal com nanopartículas de extrato de própolis e seus respectivos controles	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CVV	Candidíase Vulvovaginal
CVVR	Candidíase Vulvovaginal Recorrente
Dh	Diâmetro Hidrodinâmico
EP	Extrato de própolis
EPM	Extrato de Própolis Milagre
FA	Fase Aquosa
FO	Fase Orgânica
NS	Nanoesferas
NS BR	Nanoesferas Brancas
NS EPM	Nanoesferas Associadas ao Extrato de Própolis Milagre
NS EPM AH	Nanoesferas Associadas ao Extrato de Própolis Milagre Revestida com Ácido Hialurônico
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
IPD	Índice de Polidispersão
Coloração PAS	Coloração Ácido Periódico Schiff
PZ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Candidíase vulvovaginal.....	11
2.1.1. <i>Patogênese da CVV e fatores de risco para desenvolvimento de CVVR.....</i>	<i>12</i>
2.1.2. <i>Tratamentos disponíveis e desafios no manejo terapêutico da CVVR.....</i>	<i>15</i>
2.2. Novas estratégias no tratamento da CVVR	17
2.3. Extrato de Própolis	19
2.4. Nanopartículas poliméricas.....	21
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. Obtenção das nanopartículas poliméricas	27
4.1.1. <i>Preparo das nanopartículas brancas</i>	<i>27</i>
4.1.2. <i>Preparo das Nanopartículas associadas ao Extrato de Própolis</i>	<i>28</i>
4.2. Revestimento das nanoesferas com Ácido Hialurônico	29
4.3. Caracterização das nanoesferas.....	29
4.4. Estudo de estabilidade preliminar da formulação	29
4.5. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> das nanoesferas em relação à <i>Candida albicans</i>	30

4.6.	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vivo</i> das nanoesferas em relação à <i>Candida albicans</i>	30
4.6.1.	<i>Animais</i>	31
4.6.2.	<i>Microrganismos, fármacos e composto-teste</i>	31
4.6.3.	<i>Avaliação in vivo da atividade antifúngica</i>	31
4.6.3.1.	<i>Preparo do inóculo</i>	31
4.6.3.2.	<i>Obtenção do modelo animal de candidíase vulvovaginal</i>	32
4.6.3.3.	<i>Avaliação do efeito das nanopartículas no tratamento de candidíase vulvovaginal</i>	32
4.6.3.4.	<i>Análise estatística</i>	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1.	Desenvolvimento e Caracterização das Nanopartículas Não Revestidas e Revestidas de Ácido Hialurônico	34
5.1.1.	<i>Preparo e Caracterização das nanopartículas</i>	35
5.1.2.	<i>Revestimento das nanopartículas</i>	38
5.1.3.	<i>Caracterização das Nanoesferas revestidas</i>	39
5.2.	Estabilidade preliminar da formulação	40
5.3.	Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das nanoesferas	42
5.4.	Atividade antifúngica <i>in vivo</i> das nanoesferas em relação à <i>Candida albicans</i>	44
6.	CONCLUSÃO.....	47
7.	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV), inflamação vulvovaginal decorrente da infecção fúngica por *Candida* spp, é a segunda causa mais comum de vulvovaginite no mundo, perdendo apenas para a vulvovaginose bacteriana: 75% das mulheres apresentam ao menos um episódio de CVV ao longo da vida, e 5 a 10% de todas as mulheres desenvolvem a forma complicada da doença, a Candidíase Vulvovaginal Recorrente CVVR (GONÇALVES et al., 2015; SOBEL, 2016).

Enquanto é considerado comum que mulheres saudáveis tenham episódios esporádicos de CVV, existem fatores fisiológicos e não fisiológicos que podem favorecer a ocorrência da infecção, de forma a caracterizar quadros de recorrência. Existem alguns fatores como predisposição genética, gravidez, diabetes mellitus mal controlada, uso de contraceptivos hormonais, terapia de reposição hormonal, antibióticos, glicocorticoides, doenças imunossupressoras e hábitos de higiene podem ser citados como contribuintes para a CVVR (SOBEL, 2007; SARDI et al., 2021).

Atualmente existem diversas opções de tratamento para a CVV, sendo os antifúngicos imidazólicos, triazólicos e polienos os mais utilizados. Nos casos de CVV não complicadas, as opções de tratamento disponíveis são relativamente seguras e efetivas, e os casos de CVV não complicada respondem bem a vários esquemas terapêuticos. Entretanto, os casos de CVVR se apresentam como de difícil tratamento, com inabilidade de controle do processo agudo da infecção. Nesses casos os esquemas posológicos envolvem um tratamento prolongado de supressão do fungo, chegando a meses de medicação oral e manutenção do quadro patológico (BRASIL, 2022).

Diante desse contexto, o desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento da CVVR vem aumentando, associado à busca por menos efeitos colaterais e melhor tolerabilidade (SARDI et al., 2021). Algumas substâncias naturais com atividade antifúngica são indicadas como tratamentos alternativos e, dentre as possibilidades de produtos naturais para tratamento da CVVR, o extrato de própolis tem sido descrito como uma opção promissora, pois ele apresenta propriedades terapêuticas como efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunoestimulantes, cicatrizantes e antissépticos (IMHOF et al., 2005; CAPOCI et al., 2015).

Outra alternativa terapêutica que tem sido bastante explorada são os carreadores nanoestruturados, pois eles possibilitam a potencialização da atividade e redução da toxicidade de fármacos e substâncias de origem natural ao atuar na melhora de aspectos como estabilidade, liberação e permeabilidade desses compostos (GHARIB et al., 2011; KENECHUKWU et al., 2018). Neste contexto, foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas associadas ao extrato de própolis milagres, revestidas e não revestidas com ácido hialurônico, com o objetivo de se obter uma alternativa terapêutica natural, segura e eficiente para tratamento da CVVR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença caracterizada por sinais e sintomas de inflamação vulvovaginal decorrentes da infecção fúngica por *Candida* spp (SOBEL, 2007). A relevância dessa morbidade é evidenciada por dados epidemiológicos nos quais relata-se que 75% das mulheres apresentam ao menos um episódio de CVV ao longo da vida, manifestando sintomas como prurido vulvovaginal, irritação, dor, dispareunia e corrimento vaginal além de eritema vulvar, edema, escoriação e formação de fissuras (RICHTER et al., 2005; SARDI et al., 2021). Estima-se ainda que 50% das mulheres inicialmente infectadas apresentam um segundo evento de CVV e 5-10% de todas as mulheres desenvolvem CVVR (SOBEL, 2007; GONÇALVES et al., 2015).

Estudos epidemiológicos em diferentes regiões e bases populacionais evidenciam que 70 a 95% dos casos de CVV, a *C. albicans* figura como o agente etiológico. Dentre os casos não *albicans*, as espécies mais isoladas são, respectivamente, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Entretanto, deve-se destacar que apenas a presença de *C. albicans* na microbiota vaginal não caracteriza diagnóstico de CVV, visto que já foi constatado que é comum a presença dessa levedura na microbiota comensal do trato geniturinário de mulheres saudáveis, mostrando-se inclusive benéfica ao limitar o crescimento de outros fungos patogênicos oportunistas (WÄCHTLER et al., 2012; MARTINS et al., 2014). Não obstante, alterações fisiológicas ou não fisiológicas do hospedeiro podem favorecer a colonização fúngica, o que ocasiona a proliferação irregular do fungo e interfere na sua interação com a mucosa e com a microbiota vaginal, resultando no quadro de infecção e nos sintomas clínicos de vulvovaginite (CAMPOS et al., 2020; SARDI et al., 2021).

É considerado comum que mulheres saudáveis tenham episódios esporádicos de CVV, entretanto, alguns aspectos comportamentais ou relacionados a fisiologia do hospedeiro são considerados fatores de risco para a infecção por *C. albicans*, resultando em episódios frequentes de CVV. Quando esses episódios ocorrem quatro ou mais vezes em um ano, caracteriza-se o diagnóstico de Candidíase Vulvovaginal Recorrente

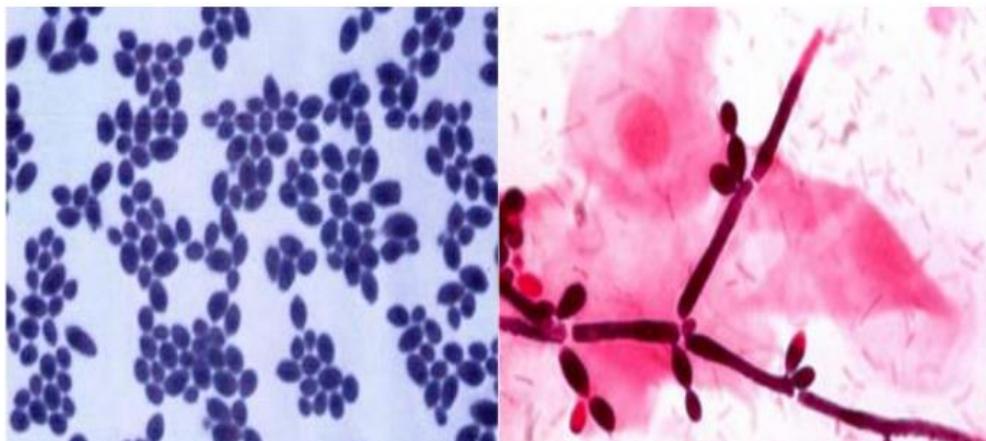
(CVVR), esses casos podem oferecer dificuldades no manejo terapêutico, sendo comum a recorrência da infecção mesmo após o fim do tratamento convencional com antifúngicos (GONÇALVES et al, 2015; SOBEL, 2016).

2.1.1. Patogênese da CVV e fatores de risco para desenvolvimento de CVVR

A *Candida* é um fungo dimórfico do filo *Ascomycota*, podendo se apresentar sobre formas leveduriformes e sobre formas filamentosas. A forma de levedura pode ser encontrada de forma comensal, no intestino e na vagina sem causar qualquer tipo de sintomas, enquanto a forma de hifa está diretamente relacionada a condição patológica, sendo considerada um fator de virulência para *C. albicans* (JACOBSEN et al, 2012; HÖFS et al, 2016).

Entende-se então que o quadro de CVV se inicia quando ocorre algum desequilíbrio entre os fatores de proteção vaginal e a virulência do fungo. Esse desequilíbrio pode ser causado por alterações fisiológicas ou não-fisiológicas, e interfere na interação simbiótica do fungo com o ecossistema vaginal, favorecendo o desenvolvimento da *C. albicans* e a transição morfológica para a forma filamentosa (KABIR, AHMAD, 2013).

Figura 1: *C. albicans*: leveduras na coloração Gram e pseudohifas na coloração PAS.



Fonte: ACHARYA, 2016

Fatores como imunossupressão, desequilíbrios na microbiota vaginal causados por uso de antibióticos, lesões superficiais na mucosa ou outros fatores externos que

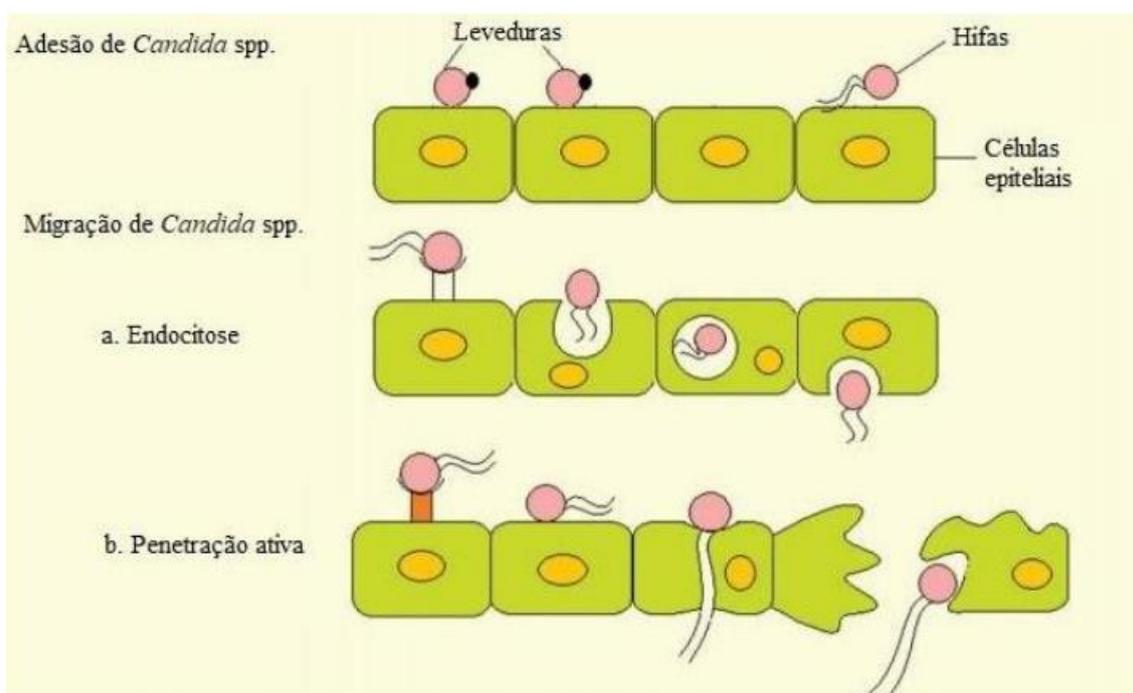
enfraqueçam os mecanismos de defesa da mucosa vaginal, além de fatores como alterações no pH vaginal e altas concentrações de glicose (como no caso de diabetes não tratada) favorecem a proliferação da *C. albicans* (WÄCHTLER et al., 2012; GONÇALVES et al., 2015). Nesse momento inicial as leveduras desempenham um papel importante no desenvolvimento da infecção, pois possibilitam uma multiplicação rápida do fungo e estabelecem interação inicial com as células epiteliais, permitindo a adesão do fungo ao epitélio – geralmente por meio de forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas com a membrana celular (HÖFS et al., 2016). Diante do microambiente propício à colonização fúngica, e já tendo sido estabelecidas interações com o epitélio, são desencadeados estímulos que ativam sinalizações vias cAMP/PKA, provocando a transição morfológica da forma de levedura para a forma de hifa (CAO et al., 2017; BASSO et al., 2018)

As hifas são consideradas as formas de maior adesão com a célula além de serem responsáveis pelo dano tecidual. Isso se dá principalmente devido a presença da proteína de superfície específica da hifa de *C. albicans*, a Als3 (HÖFS et al., 2016). Essa adesina é um membro da família de proteínas de sequência semelhante a aglutinina (Als) e medeia a ligação do fungo às células epiteliais, células endoteliais e proteínas da matriz extracelular. Também desempenha um papel importante na formação de biofilme em superfícies protéticas. A adesina Als3 se liga aos receptores da célula hospedeira, como E-caderina e N-caderina e, assim, induz as células hospedeiras a endocitar o microrganismo, além de se ligar à ferritina da célula hospedeira e permite que *C. albicans* utilize essa proteína como fonte de ferro (SHEPPARD et al., 2004; PHAN et al., 2007; LIU; FILLER, 2011). A forma de hifa também penetra ativamente no epitélio, pois seus filamentos são capazes de invadir o organismo hospedeiro, direcionando-se às profundidades do tecido se houver maior quantidade de nutrientes nestas zonas, fenômeno conhecido como tigmotropismo (PIÉRARD, PIÉRARD, 2016).

Com o processo de invasão ocorre a perda da integridade epitelial induzida pela degradação proteolítica, promovida pela secreção de enzimas como fosfatases ácidas, fosfolipases, proteinases e β -galactosidase, resultando na destruição do epitélio superficial. A produção de enzimas hidrolíticas também é um importante fator de virulência no estabelecimento da infecção, pois ajudam na aderência, na penetração do tecido e na proliferação dos fungos. Dessa forma promovendo a invasão e destruição do epitélio vaginal, fornecendo material degradado aos microrganismos como nutrientes (PAWAR,

PAWAR, AUTE, 2014; MOYES et al., 2015). O dano ao tecido epitelial combinado com a resposta imunológica do organismo, resultam nas manifestações clínicas mais comuns da CVV como prurido e queimação vulvar acompanhados de dor e irritação vaginal, levando a dispareunia e disúria, além de eritema vulvar e vaginal, edema e fissuras (SOBEL, 2007).

Figura 2. Representação das vias de infecção por *C. albicans* no tecido vaginal



Fonte: Adaptado de Johal et al., (2016)

A patogenicidade das espécies de *Candida* é mediada por uma série de mecanismos de virulência que incluem adesão, formação de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas e mudança fenotípica (SARDI et al., 2021). Existem fatores fisiológicos e não fisiológicos relacionados ao hospedeiro que podem favorecer esses mecanismos e, conseqüentemente, favorecer a colonização fúngica e manifestação da doença, aumentando a ocorrência de casos de CVV, de forma a caracterizar quadros de recorrência. Fatores como predisposição genética, gravidez, diabetes mellitus mal controlada, uso de contraceptivos hormonais, terapia de reposição hormonal, antibióticos, glicocorticoides, doenças imunossupressoras e hábitos de higiene podem ser citados como fatores contribuintes para a CVVR.

A gravidez é considerada um fator de risco para CVV devido ao aumento dos níveis hormonais, principalmente de progesterona, e ao aumento da secreção vaginal de glicogênio, causando acidificação do meio, o que reduz a população bacteriana e favorece a proliferação fúngica. Os estrogênios na gravidez também aumentam a atividade das células epiteliais vaginais para adesão de *Candida*, facilitando a transição morfológica do fungo, a formação de hifas e a invasão tecidual. Como a maioria dos contraceptivos orais contém estrogênio e progesterona, eles também promovem o crescimento de fungos (GRIGORIOU, 2006; MITBAA et al., 2017; SARDI et al., 2021).

O diabetes mellitus, quando não tratado pode aumentar a suscetibilidade à infecção fúngica, a glicemia elevada aumenta a concentração de glicose e glicogênio vaginal, causando acidificação do microambiente e favorecendo a proliferação de leveduras (GOSWAMI et al., 2000; GRIGORIOU et al., 2006). Já o uso de antibióticos sistêmicos de amplo espectro reduz a microbiota bacteriana vaginal normal, principalmente os *Lactobacillus* spp., diminuindo a competição por nutrientes e facilitando a proliferação de *C. albicans*. Fatores genéticos que afetem a imunidade inata, infecção por HIV, uso de corticosteroides, imunossupressores e agentes citostáticos também são considerados fatores que predispõem à infecção por *C. albicans* (JAEGER et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016; SOBEL, 2016).

2.1.2. *Tratamentos disponíveis e desafios no manejo terapêutico da CVVR*

Atualmente existem diversos medicamentos disponíveis em diferentes formas farmacêuticas para o tratamento da CVV. Os antifúngicos mais utilizados são os azóis, polienos (nistatina e anfotericina) e equinocandinas, que estão disponíveis nas formas farmacêuticas orais ou para aplicação vaginal (soluções, pomadas, cremes, géis e óvulos vaginais). Dentro da classe dos azóis, os mais comumente utilizados são os imidazóis (clotrimazol, nitrato de miconazol, nitrato de econazol, nitrato de fenticonazol) e os triazóis (fluconazol e itraconazol). A maioria desses medicamentos podem ser prescritos em regimes posológicos de dose única ou multidoses, de acordo com o quadro clínico do paciente (SOBEL, 2016).

A maioria dos casos de CVV não são complicadas e respondem a vários esquemas terapêuticos, entretanto cerca de 5% dos casos se apresentam como de difícil

tratamento, com inabilidade de controle do processo agudo da infecção, o que leva à instalação da forma complicada, a CVVR (BRASIL, 2022)

No Brasil, considerando o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (publicado pelo Ministério da Saúde em 2022), para os casos de CVV não complicada os tratamentos e esquemas posológicos orientados são:

Tabela 1. Esquemas posológicos para tratamento de CVV não complicada

Medicamento	Esquema posológico
Miconazol creme a 2%	Via vaginal, um aplicador cheio à noite, ao deitar-se, por 7 dias
Nistatina 100.000 UI	Via vaginal, uma aplicação à noite, ao deitar-se, por 14 dias
Fluconazol 150mg	Via oral, dose única
Itraconazol 100mg	Via oral, 2 comprimidos, 2 vezes ao dia, por 1 dia

Fonte: adaptado de BRASIL (2022).

Já para a forma recorrente da infecção (em que a paciente apresenta quatro ou mais episódios no período de um ano), bem como para outros quadros que caracterizem a forma complicada da CVV (sintomas intensos, agente etiológico não *albicans* e presença de outras comorbidades), o Ministérios da Saúde recomenda os seguintes esquemas terapêuticos:

Tabela 2. Esquemas posológicos para tratamento de CVVR

Medicamento	Esquema posológico
Miconazol creme a 2% e Fluconazol 150mg	Via vaginal, um aplicador cheio à noite, ao deitar-se, por 7 dias Via oral, 1 vez por semana, por 6 meses
Miconazol creme a 2% e Fluconazol 150mg	Via vaginal, um aplicador cheio, 2 vezes na semana, por 6 meses Via oral, 1 vez por dia, nos dias 1, 4 e 7
Miconazol óvulo vaginal e Fluconazol 150mg	Via vaginal, 1 vez por semana, durante 6 meses Via oral, 1 vez por dia, nos dias 1, 4 e 7

Fonte: adaptado de BRASIL (2022).

Nota-se que o esquema posológico para os casos de CVVR são mais longos, podendo durar vários meses, favorecendo interações medicamentosas, reações de hipersensibilidade e reações adversas, o que dificulta a adesão dos pacientes e a correta execução do tratamento (SOBEL, 2016). A baixa adesão ao tratamento da CVVR, juntamente com frequente automedicação que ocorre devido ao autodiagnóstico e a facilidade de acesso a esses medicamentos tem aumentado a exposição dos fungos aos

fármacos convencionais, ocasionando quadros de resistência adquirida (MARCHAIM et al., 2012).

Um dos mecanismos de resistência adquirida aos antifúngicos pertencentes a classe dos azóis é a mutação e aumento da expressão do gene ERG11, gene que modula a expressão e função da enzima 14-alfa-desmetilase. Essa enzima está envolvida na biossíntese de ergosterol, e é alvo intracelular dos antifúngicos azólicos. Logo, o aumento de sua expressão e outras mudanças no processo de biossíntese do ergosterol são mecanismos adquiridos de resistência aos fármacos (BENEDETTI et al, 2019).

Outro mecanismo importante de resistência aos antifúngicos está relacionado as proteínas transportadoras da membrana das leveduras: a super expressão de genes responsáveis pela modulação e função das proteínas de transporte interferem diretamente no papel das bombas de efluxo, aumentando sua atividade e diminuindo a concentração intracelular dos fármacos. A mutação nos genes da bomba de efluxo ocorre de forma reversível, de modo que o processo de reversão da resistência pode ocorrer com a diminuição da exposição aos azóis a longa prazo (ZHANG et al., 2014; HEALEY et al., 2016).

2.2. Novas estratégias no tratamento da CVVR

A maioria dos casos de CVV não são complicadas e respondem a vários esquemas terapêuticos, e os tratamentos disponíveis para esses casos são relativamente seguros e efetivos (BRASIL, 2022). Por outro lado, terapias alternativas se mostram necessárias diante dos desafios no manejo terapêutico da CVVR e outras formas complicadas da infecção decorrentes dos fatores de resistência fúngica aos fármacos, efeitos adversos e interações farmacológicas, e a baixa adesão aos longos esquemas posológicos.

O desenvolvimento de novas terapias alternativas para o tratamento da CVV vem aumentando, associado à busca por menos efeitos colaterais e melhor tolerabilidade. Algumas substâncias naturais com atividade antifúngica são indicadas como tratamentos alternativos, pois auxiliam na restauração do equilíbrio da microbiota vaginal e

demonstram capacidade de inibição sobre os fatores de virulência microbiana (SARDI et al., 2021).

Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos atuais sejam derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas baseadas no conhecimento tradicional. Notavelmente, aproximadamente 82% da população brasileira já utilizou produtos fitoterápicos em seus cuidados com a saúde (FELIX et al., 2019).

Dentre as possibilidades de produtos naturais para tratamento da CVVR, o extrato de própolis tem sido descrito como uma opção promissora. A própolis apresenta uma composição química bastante complexa, entretanto, as atividades biológicas de própolis estudadas em diferentes localidades do mundo já estão bem definidas, apresentando seus extratos padronizados com composição química determinada. Propriedades terapêuticas, como efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunoestimulantes, cicatrizantes e antissépticos, têm sido descritas na literatura (IMHOF et al., 2005; CAPOCI et al., 2015).

Entretanto, um fator limitante para utilização não apenas da própolis, mas de diversos fármacos antifúngicos veiculados em formulações tópicas convencionais é a dificuldade de permeação até as camadas mais profundas do epitélio vaginal, o que dificulta a eliminação das hifas de *C. albicans* que se encontram alojadas nas camadas basais do epitélio (SOBEL, 2016; MELO et al., 2020). Para superar as limitações das formas farmacêuticas convencionais usadas para tratar a CVVR, o desenvolvimento de sistemas vaginais não convencionais de administração de medicamentos e melhorias em suas formulações têm sido investigados.

Os carreadores nanoestruturados tem se mostrado uma interessante estratégia dentro da nanotecnologia farmacêutica, pois possibilitam a potencialização da atividade e redução da toxicidade de fármacos e substâncias de origem natural ao atuar na melhoria de aspectos como estabilidade, liberação e permeabilidade desses compostos (GHARIB et al., 2011; KENECHUKWU et al., 2018). Sendo que lipossomas e nanopartículas poliméricas estão entre os veículos de entrega mais aceitos de medicamentos com aplicações clínicas na área farmacêutica, aprovados pelo FDA como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (NASCIMENTO et al., 2016). As nanopartículas poliméricas alcançaram esse status devido à biocompatibilidade, não toxicidade aos

sistemas biológicos, biodegradabilidade, estabilidade durante o armazenamento, liberação controlada e possibilidade entrega vetorizada ao alvo, resultando em maior eficácia terapêutica (KECK, MÜLLER, 2013; HADINOTO, SUNDARESAN, CHEOW, 2013)

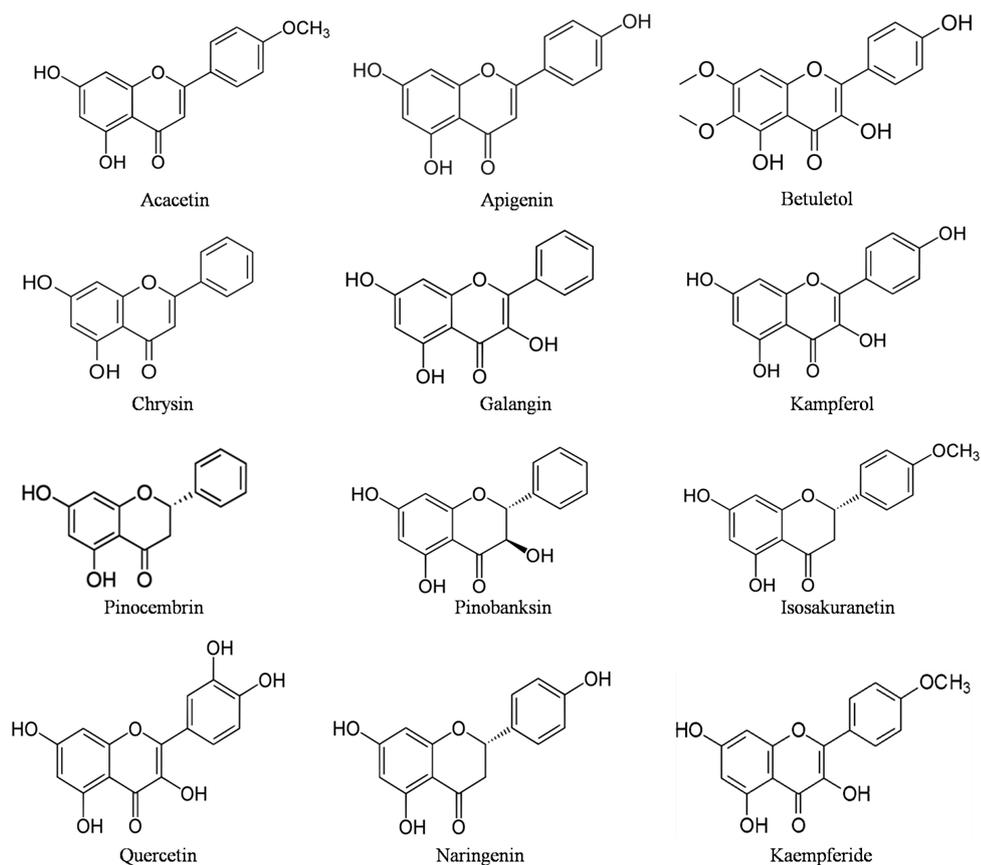
2.3. Extrato de Própolis

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas, *Apis mellífera L*, a partir de resinas coletadas por elas das folhas, flores, brotos, caules e frutos da flora circundante. A função primária da própolis é estrutural: as abelhas aplicam a resina nas paredes afim de selar a colmeia, fortalecendo as bordas dos favos e evitando a invasão de outros insetos e do clima, mas, paralelamente, a própolis atua como bactericida e fungicida, inibindo a proliferação de microrganismos na colmeia, um ambiente que, de outra forma, seria ideal para a proliferação de fungos e bactérias (GHISALBERTI, 1979; PARK et al., 2002; BANKOVA, 2005; DEVEQUI-NUNES et al., 2018).

Em termos de composição química, a própolis bruta é geralmente composta por 50% resina, 30% cera, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% outras substâncias, incluindo os derivados do ácido cinâmico, ácidos fenólicos, ácidos benzóicos substituídos, aminoácidos e flavonoides. Os ácidos fenólicos e flavonoides presentes na composição da própolis são os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, e a presença desses compostos é dependente de diversos fatores, em função da origem geográfica e da variedade de espécies vegetais as quais as abelhas terão acesso na região (SALANTINO et al., 2005; DEVEQUI-NUNES et al., 2018).

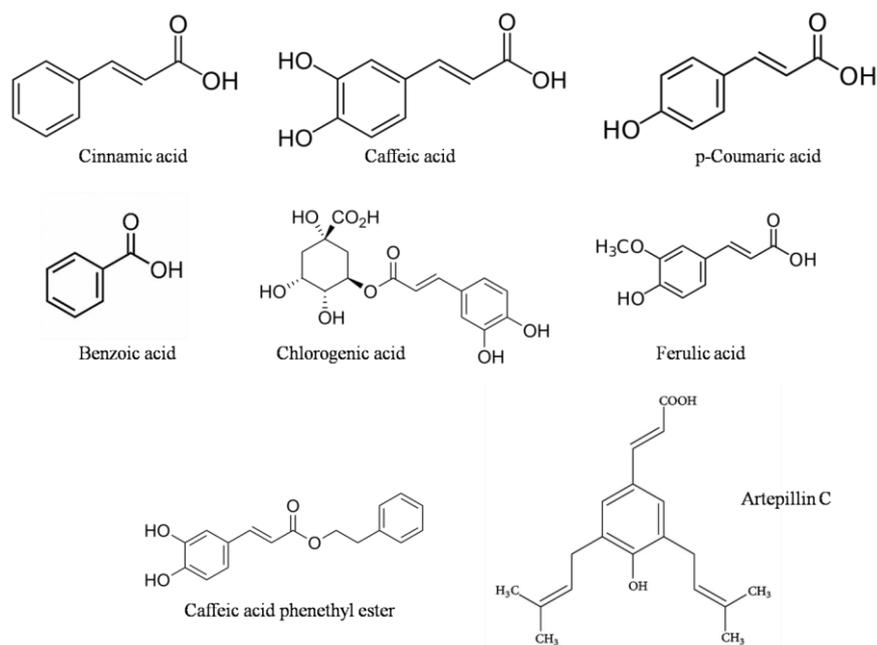
No Brasil, a espécie vegetal mais representativa como fonte botânica para obtenção da própolis é a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo, e a partir da qual as abelhas produzem a própolis verde. A própolis verde, principalmente em regiões tropicais como o Brasil, apresenta uma composição química característica, rica em compostos fenólicos prenilados como o artemillin C, bacarina, e drupanina, além de terpenóides e do ácido p-cumárico e seus derivados prenilados (BANKOVA, 2005; SALANTINO et al., 2005; MACHADO et al., 2016).

Figura 3. Estruturas químicas dos principais flavonoides encontrados na própolis verde brasileira.



Fonte: CORRÊA et al., 2020.

Figura 4: Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos encontrados na própolis verde brasileira



Fonte: CORRÊA et al., 2020.

Considerando a complexidade da composição da própolis, para que ela possa ser comercializada e utilizada, é necessário o processo de extração com a utilização de solvente adequado para obtenção de extrato com maior concentração dos compostos de interesse para a finalidade pretendida. Diferentes estudos que caracterizaram a composição química de extratos de própolis, obtidos por diferentes solventes e técnicas de extração, constataram que o extrato etanólico reúne maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides em detrimento de métodos como a extração por fluido supercrítico e extração convencional em solventes como água, acetona e metanol (SAWAYA et al., 2002; KUBILIENE et al., 2015; MACHADO et al., 2016; DEVEQUI-NUNES et al., 2018), indicando que o extrato etanólico de própolis é o mais adequado para a utilização em formulações com finalidades antifúngicas, como no caso de preparações para aplicação vaginal no tratamento de CVVR.

A atividade antifúngica da própolis em relação à *C. albicans* já está bem consolidada na literatura, sendo que estudos recentes vêm tentando descrever o mecanismo de ação deste produto natural. A atividade antifúngica do EP é bastante complexa e tem sido atribuída à atividade sinérgica entre seus componentes biológicos, principalmente entre compostos fenólicos e flavonoides (SILVA-CARVALHO et al., 2015). Um estudo realizado por Corrêa et al. (2020), utilizando extrato etanólico de própolis verde brasileira, elucidou que o EP tem atividade fungistática, inibindo e interferindo efetivamente na filamentação da *C. albicans*. Além disso, o EP causou danos à membrana e parede celular do fungo, com extravasamento de conteúdo intracelular, e inibiu o crescimento de *C. albicans* de maneira dependente da dose e do tempo, inclusive exercendo ação inibitória sobre uma cepa resistente ao fluconazol.

2.4. Nanopartículas poliméricas

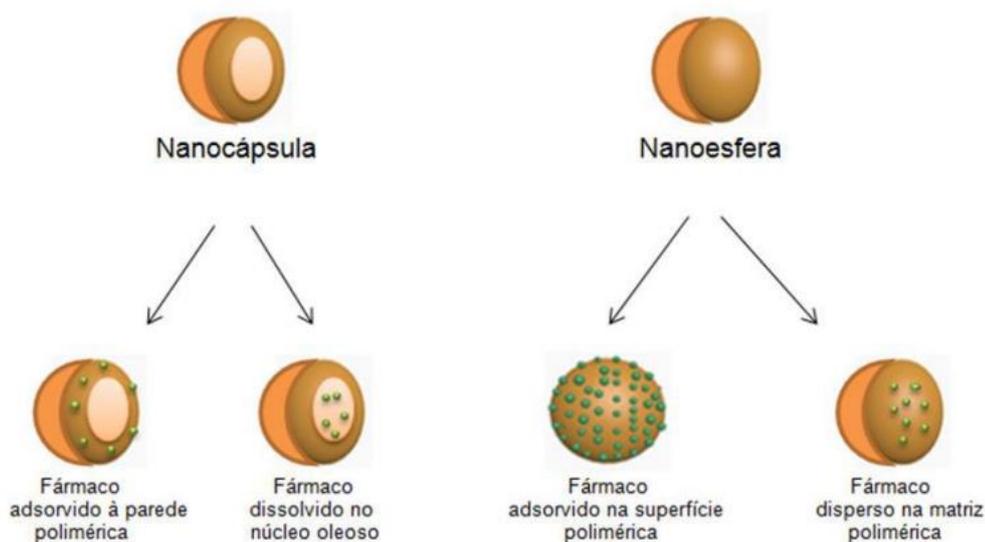
Além de buscar novos fármacos e substâncias naturais como alternativas de terapias para infecções vaginais, outro foco de pesquisa na área é o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos mais apropriados, com o objetivo de melhorar a distribuição, retenção e aceitabilidade das formulações, permitindo o controle da liberação do fármaco, com maior atividade farmacológica e menor toxicidade (KENECHUKWU et al., 2018; SARDI et al., 2021).

Formulações que empregam nanotecnologia como sistema de liberação de fármacos tem sido aplicada como forma de melhorar a eficácia dos medicamentos, pois além de possibilitar a potencialização da atividade e redução da toxicidade de fármacos e substâncias de origem natural ao atuar na melhoria de aspectos como estabilidade, liberação e permeabilidade desses compostos, os sistemas nanoestruturados também permitem uma entrega direcionada para diferentes terapias (GHARIB et al., 2011; KENECHUKWU et al., 2018).

Diferentes tipos de sistemas nanoestruturados vem sendo pesquisados e aplicados clinicamente, sendo que os lipossomas e nanopartículas poliméricas e lipídicas têm se destacado como os principais sistemas nanotecnológicos para liberação de fármacos. As nanopartículas poliméricas oferecem algumas vantagens específicas sobre os lipossomas: melhor eficiência de encapsulação, ajudam a aumentar a estabilidade de drogas e proteínas, além de apresentarem alta estabilidade frente aos fluídos biológicos e durante o período de armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001). Outra vantagem da utilização de nanopartículas poliméricas é a possibilidade de modificação da sua superfície através do revestimento com outros polímeros, biopolímeros e agentes tensoativos, melhorando sua biocompatibilidade e vetorização (KUMARI et al., 2010)

As nanopartículas geralmente variam em tamanho de 10 a 1000 nm, e o fármaco dissolvido pode ser aprisionado, encapsulado ou ligado à matriz polimérica da NP. As nanopartículas podem ainda ser classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas, de acordo com sua composição, organização estrutural e com o método utilizado em sua obtenção (SOPPIMATH et al., 2001). As nanocápsulas diferem das nanoesferas por serem uma forma de reservatório, na qual um invólucro de material sólido (o polímero) envolve um núcleo que é líquido ou semissólido à temperatura ambiente. Nas primeiras formulações de nanocápsulas, o núcleo era composto de óleo, permitindo assim uma alta carga útil de encapsulamento de um fármaco lipossolúvel. Nanocápsulas com núcleo aquoso capazes de encapsular compostos solúveis em água foram desenvolvidas mais recentemente. Já as nanoesferas são partículas de matriz, ou seja, partículas cuja massa inteira é sólida, e o fármaco pode se encontrar retido na matriz polimérica ou adsorvido na superfície da nanoesfera. No geral, as moléculas são melhores preservadas da degradação enzimática que ocorre no meio biológico quando estão aprisionadas na matriz da nanoesfera (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009; KUMARI et al., 2010).

Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: adaptado de SCHAFFAZICK et al, 2003

Uma das formas mais simples para obtenção de nano esferas é o método de nanoprecipitação, também chamado de deslocamento de solvente, que foi desenvolvido por Fessi et al. (1989). Esse é um dos meios mais fáceis para preparação de nanoesferas: além de sua simplicidade, este procedimento é reprodutível, rápido e econômico (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009).

A nanoprecipitação é realizada usando sistemas contendo três ingredientes básicos: o polímero, o solvente do polímero e o não solvente do polímero. O solvente do polímero é geralmente um solvente orgânico miscível em água e fácil de remover por evaporação – por esta razão, a acetona é o solvente polimérico mais frequentemente usado neste método. Para produzir as nanopartículas, a solução polimérica é adicionada ao não solvente. As nanopartículas se formam instantaneamente durante a rápida difusão da solução polimérica no não solvente. A suspensão coloidal resultante contém partículas de polímero com tamanho bem definido (tipicamente 200 nm de diâmetro) caracterizadas por uma distribuição estreita (FESSI et al., 1989; VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, semicristalino, de fácil processamento, biocompatível e com temperatura de fusão inferior a 60°C, e tem sido cada vez mais utilizado em sistemas de entregas de fármacos e compostos ativos (DANG; TURNER; COOMBES, 2013). Um exemplo são as nanopartículas poliméricas

carregadas com extrato de própolis vermelha, preparadas com uma combinação de PCL e pluronic usando o método de nanoprecipitação, que foram obtidas por Nascimento et al. (2016), como alternativa para terapias antileishmania. Outro estudo, realizado por Abreu et al. (2016), testou diferentes polímeros (como PCL, ácido láctico-co-glicólico (PLGA) e poli(cianoacrilato) (PCA)) na preparação de nanopartículas carreadoras de Nisina como alternativa para o tratamento de CVVR.

No delineamento de formulações para aplicação vaginal, outra estratégia descrita na literatura para melhorar a absorção de ativos carreados por nanoesferas é a modificação da superfície do nanocarreador através do revestimento com ácido hialurônico. Em estudo realizado por Melo *et al* (2020), nanopartículas de Eudragit RL100 carregadas com anfotericina B e revestidas com ácido hialurônico foram desenvolvidas e sintetizadas por nanoprecipitação afim de superar as desvantagens das formulações convencionais no tratamento da CVVR. Nesse mesmo escopo, Teixeira *et al* (2022) desenvolveu nanopartículas de PCL carregadas com miconazol revestidas com ácido hialurônico. Ambos os estudos relataram que as nanopartículas revestidas apresentaram resultados superiores na eliminação de *C. albicans* da cavidade vaginal de ratas, em relação as nanopartículas não revestidas. Isso provavelmente se deve à interação do HA na superfície das nanopartículas com os receptores CD 44 na membrana plasmática das células epiteliais vaginais, induzindo a internalização dos nanocarreadores e consequente eliminação dos microrganismos (ALHO, UNDERHILL, 1989; MELO et al, 2020; TEIXEIRA et al, 2022).

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo, mais especificamente um glicosaminoglicano composto por unidades repetidas de ácido glucurônico e moléculas de N-acetil-D-glucosamina, podendo atingir comprimento e peso molecular variável. É biossintetizado na membrana celular e encontrado em maior quantidade na pele e nos tecidos conjuntivos, além de constituir um dos componentes fundamentais da matriz extracelular. (BUZZACCARINI et al., 2021).

Devido a estudos que utilizaram o AH para obtenção e revestimento de nanocarreadores para transporte de fármacos em terapias antitumorais, sabe-se que esse biopolímero pode se ligar a receptores CD44 super expressos em células malignas, e então as nanopartículas revestidas podem ser internalizadas em células cancerígenas por meio de endocitose mediada por receptores, o que pode ajudar a combater a resistência aos

medicamentos, aumentando a absorção do medicamento e evitando as bombas de efluxo (TRAN et al., 2014; CAI et al., 2019)

O receptor CD44 é uma glicoproteína transmembrana tipo I, e o conhecimento de sua interação com o AH e aplicação clínica na terapia antitumoral aliado com o conhecimento de que esse receptor também é amplamente expresso em células epiteliais em proliferação – caso das células do epitélio vaginal (ALHO, UNDERHILL, 1989), abriu caminho para a aplicação do AH no revestimento de formulações específicas para aplicação vaginal, como no caso das nanopartículas desenvolvidas por Melo et al. (2020) e Teixeira et al. (2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanoesferas de policaprolactona (PCL) contendo extrato de própolis e revestidas de ácido hialurônico, para avaliar sua capacidade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, sendo uma forma farmacêutica alternativa para tratamento da CVVR.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar nanoesferas poliméricas contendo extrato de própolis pelo método de nanoprecipitação
- Revestir as nanoesferas com ácido hialurônico;
- Caracterizar as nanoesferas revestidas e não revestidas quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar parâmetros preliminares de um estudo piloto da estabilidade das formulações.
- Determinar a atividade antifúngica das nanoesferas *in vitro*, pela técnica de formação de halo de inibição por difusão em ágar;
- Avaliar atividade *in vivo* das nanopartículas administradas na cavidade vaginal de ratas com CVV;

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das nanopartículas poliméricas

As nanoesferas poliméricas brancas (sem fármaco), e associadas ao Extrato de Própolis Milagres (EPM), obtido comercialmente, foram preparadas utilizando o método de nanoprecipitação, conhecido também como deslocamento de solvente ou deposição interfacial, que foi descrito por Fessi et al. (1989). Adaptações foram feitas para utilização da PCL como matriz polimérica, com base na metodologia proposta por Lucena et al. (2018) para preparação de nanocápsulas e nanoesferas.

Além dos insumos para preparação das nanopartículas, que estão especificados na tabela 3, foram utilizados também agitadores magnéticos com aquecimento e um Rotaevaporador Büchi R-3 para evaporação do solvente.

Tabela 3. Descrição da composição da FO e da FA para obtenção de 2,0 mL da formulação

	Substância	Quantidade	
		NS BRA	NS EPM
Fase Orgânica	Acetona	4,0 mL	3,96 mL
	PCL	25,9 mg	25,9 mg
	Span 80	11 µL	11 µL
	EPM 500mg/mL	-	40 µL
Fase Aquosa	Água Ultrapura	8,0 mL	8,0 mL
	Tween 80	11 µL	11 µL

NS BRA. Nanoesferas Brancas; NS EPM. Nanoesferas associadas ao extrato de própolis milagres; SE EPM. Solução estoque de extrato de própolis milagres.

4.1.1. Preparo das nanopartículas brancas

Para a obtenção das nanoesferas brancas (NS BRA), inicialmente foi preparada a fase orgânica (FO), sendo que as quantidades de cada substância estão descritas na Tabela 3. A acetona e PCL foram aquecidas até a temperatura de 45-50°C em um béquer, sendo mantida sob agitação constante até a completa solubilização do polímero; em

seguida adicionou-se o Span 80, ainda sob agitação. Paralelamente, a fase aquosa (FA) foi preparada adicionando-se o Tween 80 em um béquer contendo a água ultrapura, seguido de agitação por 10 min. A FO foi então vertida sobre a FA, sob agitação constante; manteve-se a agitação por mais 10 min após o esgotamento da FO e em seguida, para evaporação do solvente, as nanopartículas foram levadas para o rotaevaporador até atingir o volume final de 2 mL de formulação.

4.1.2. Preparo das Nanopartículas associadas ao Extrato de Própolis

Inicialmente foi preparada uma solução estoque (SE) de extrato de própolis (EP) a partir do Extrato de Própolis Milagres Comercial 11%. Afim de evaporar completamente o solvente do extrato comercial, ele foi deixado em agitação por quatro dias e em seguida colocado em um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, obtendo-se então o Extrato de Própolis concentrado 100% p/p. Por fim, a partir da dissolução do extrato concentrado em etanol, foi preparada uma SE de EP na concentração de 500mg/mL, e a partir dessa SE procedeu-se a preparação das Nanoesferas Associadas ao Extrato de Própolis Milagres (NS EPM), conforme descrito abaixo.

Primeiro foi preparada a fase orgânica (FO), sendo que os volumes de solvente, tensoativo e polímero estão descritos na Tabela 3. No procedimento, a acetona foi aquecida até a temperatura de 45-50°C, para facilitar a solubilização da PCL, e foi mantida sob agitação constante até a completa solubilização do polímero; em seguida adicionou-se o Span 80 e por último adicionou-se os 40 µL da solução estoque de EPM, sempre mantendo a agitação. Paralelamente, a fase aquosa (FA) foi preparada adicionando-se o Tween 80 em um béquer contendo a água ultrapura, seguido de agitação por 10 min. A FO foi então vertida sobre a FA, sob agitação constante; manteve-se a agitação por mais 10min após toda a FO ter sido vertida e em seguida, para evaporação do solvente, as nanopartículas foram levadas para o rotaevaporador até atingir o volume final de 2 mL de formulação.

4.2. Revestimento das nanoesferas com Ácido Hialurônico

Logo após o processo de nanoprecipitação e evaporação dos solventes as NS BRA foram revestidas com AH: nesse processo foram testadas soluções aquosas com diferentes concentrações de AH (0,05; 0,1 0,25; 0,5; 1,5 e 3,0% p/v) e as nanoesferas revestidas foram caracterizadas afim de determinar a partir de qual concentração foram obtidas NS com as melhores características para a finalidade pretendida.

4.3. Caracterização das nanoesferas

As formulações foram analisadas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®) após completa evaporação do solvente e diluição de 2 µL de formulação em 1000 µL de água ultrapura à temperatura de 25 °C. O diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) e o índice de polidispersão de tamanho (PdI) das nanoesferas foram determinados pela técnica de espectrometria de correlação de fótons, a partir da aplicação de um laser de Hélio/Neônio $\lambda = 633$ nm, sendo selecionado para as análises o ângulo de retroespalhamento de 173°. O potencial zeta (PZ) foi avaliado pela técnica de microeletroforese associada à anemometria do laser Doppler; para isso as amostras diluídas foram transferidas para uma cubeta com dois eletrodos de cargas opostas, e em seguida foi aplicado um potencial elétrico de 150 V/cm. As análises foram executadas utilizando o equipamento DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®), disponível no laboratório multiusuário da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos como média \pm desvio padrão.

4.4. Estudo de estabilidade preliminar da formulação

O estudo de estabilidade preliminar foi estabelecido por meio do exame visual das formulações e da determinação do Dh, do IPD e do PZ das nanoesferas. Para isso, foram retiradas alíquotas das formulações de NS BRA e NS EPM revestidas e não

revestidas no 1º, 7º, 14º e 30º dias após o preparo dessa. As análises foram conduzidas conforme descrito anteriormente para a caracterização das NS.

As análises foram expressas em média \pm desvio padrão e avaliada por análise de variância two-way ANOVA seguida pelo teste Tukey, utilizando o programa Prisma, versão 8.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$

4.5. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* das nanoesferas em relação à *Candida albicans*

As NS EPM revestidas e não revestidas foram avaliadas quanto à sua atividade antifúngica em relação à *C. albicans*, linhagem ATCC10231. Primeiramente, foi preparada uma suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL do microrganismo em solução salina, equivalente a escala 0,5 de Mcfarland, e essa suspensão foi inoculada em placas de ágar Sabouraud. Após a inoculação da *C. albicans*, poços de 3 mm de diâmetro foram escavados no ágar com auxílio de pipetas estéreis e em diferentes poços foram depositados 100 μ L das NS EPM revestidas e não revestidas. Além disso, nos outros poços foram depositados 100 μ L de solução de EP na concentração de 10 mg/mL, 100 μ L de solução de miconazol em solução 5mg/mL como controle positivo e 100 μ L das NE BRA revestidas e não revestidas como controle negativo. As placas de ágar contendo *C. albicans* foram levadas para estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse tempo, as placas foram avaliadas de acordo com a formação ou não do halo de inibição, sendo que quando ocorreu formação de halos estes foram medidos em milímetros, desconsiderando o tamanho do poço.

4.6. Avaliação da atividade antifúngica *in vivo* das nanoesferas em relação à *Candida albicans*

Os estudos da avaliação dos parâmetros farmacodinâmicos foram realizados em colaboração com a Universidade Federal de São João del Rei, no campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis - Minas Gerais, no Laboratório de Farmacologia.

4.6.1. Animais

Foram utilizadas 35 ratas fêmeas da linhagem Wistar, com 8-10 semanas e peso corporal entre 150 e 200g. Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da UFSJ – Campus Tancredo Neves – CTAN, e foram mantidos no Biotério CT-Infra II, do Campus Centro Oeste da UFSJ. Os animais foram aclimatados por um período de 15 dias antes da realização dos experimentos, em gaiolas de propileno com cama de maravalha, sob condições ideais de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e providos de água e alimentação (Ração industrial Labina®) *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo experimental nº 020/2020.

4.6.2. Microrganismos, fármacos e composto-teste

Para a realização do estudo foi empregada a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 10231, que apresenta resistência aos azólicos fluconazol, itraconazol e voriconazol, e à equinocandina anidulafungina. Foi utilizado o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Himedia®, Brasil) para cultivo do microorganismo. Os demais fármacos empregados no estudo foram: dexametasona (Déxium®, Chemitec Agro-Veterinária®, São Paulo, Brasil) e benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino®, São Paulo, Brasil) foram obtidos comercialmente.

4.6.3. Avaliação *in vivo* da atividade antifúngica

4.6.3.1. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231 foi cultivada em meio ASD por 48 horas em estufa bacteriológica, sob temperatura mantida entre 30 - 35° C. Em seguida, as colônias foram transferidas para solução salina 0,85% e a suspensão foi ajustada a concentração de $5,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foi confirmada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 625 nm, até obter densidade ótica entre 0,08 – 0,10.

4.6.3.2. Obtenção do modelo animal de candidíase vulvovaginal

Foram utilizadas 35 ratas Wistar fêmeas, divididas em 7 grupos experimentais, contendo 5 animais por grupo, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Grupos experimentais conforme protocolos de tratamento para avaliação *in vivo* do efeito de nanopartículas no tratamento de CVV

GRUPOS	TRATAMENTO
1	PBS (Controle negativo)
2	NS BRA (Controle negativo)
3	NS BRA AH (Controle negativo)
4	Suspensão de MN 0,5mg/mL (Controle positivo)
5	Suspensão de EPM 10mg/mL
6	NS EPM
7	NS EPM AH

Todos os animais foram tratados com 0,1 mL dos compostos e controles, em dose única, por via intravaginal. NS BRA: nanoesfera branca; NS BRA AH: nanoesfera branca revestida com ácido hialurônico; NS EPM: nanoesfera de extrato de própolis; NS EPM AH: nanoesfera de extrato de própolis revestida com ácido hialurônico;

Com o objetivo de promover um estado de imunossupressão transitório, os animais receberam dexametasona (2mg/mL) por via intraperitoneal em dose única, e uma dose de benzoato de estradiol (1 mg/mL) por via subcutânea para indução hormonal do ciclo estral (dia 1). No dia da infecção (dia 2) cada animal recebeu, por via intravaginal, 0,2 mL da suspensão do inóculo de *C. albicans* e após 48 horas (dia 4) foi realizada uma lavagem da cavidade vaginal de cada animal com 0,1 mL de solução salina 0,85%, utilizando-se uma micropipeta com ponteira. O lavado vaginal foi cultivado em meio ASD para verificar o estabelecimento da infecção, que foi considerada suficiente quando apresentou, no mínimo, 10^2 UFC/placa.

4.6.3.3. Avaliação do efeito das nanopartículas no tratamento de candidíase vulvovaginal

Após confirmação da infecção (dia 5), foram iniciados os tratamentos por via intravaginal, em dose única, administrando-se nanopartículas, miconazol e própolis puros. Após 24 horas da administração dos tratamentos, procedeu-se nova lavagem da

cavidade vaginal das ratas e plaqueamento do fluido, para a determinação da carga fúngica, mediante a contagem de UFC/placa. Os resultados foram tabelados e apresentados em média do Log UFC/placa e porcentagem de redução da carga fúngica, e analisados estatisticamente.

4.6.3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados, com o cálculo da estatística e de seu respectivo “p-value”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima para $\alpha = 0,05$. O software GraphPad Prism 8 (GraphPad, EUA) foi utilizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e Caracterização das Nanopartículas Não Revestidas e Revestidas de Ácido Hialurônico

A CVV é uma infecção fúngica de alta incidência, causada por microrganismos oportunistas do gênero *Candida spp.*, e que afeta mulheres de todos os níveis sociais, configurando mais de 100 milhões de casos anualmente (INTRA et al., 2022). A alta incidência dessa morbidade, aliada aos impactos negativos na vida social e sexual das mulheres acometidas, tornam a CVV um relevante problema de saúde pública.

Atualmente existem diversos antifúngicos tópicos e orais disponíveis para o tratamento da CVV. Entretanto, com a facilidade de acesso sem prescrição e o uso indiscriminado desses antifúngicos, o surgimento de espécies de *Candida* resistentes aos fármacos se tornou um fator de complicação no manejo terapêutico da CVV, favorecendo a reincidência da infecção e caracterizando casos de CVVR (FERRIS et al., 2002; SOBEL, 2018). Existem ainda mulheres que apresentam fatores predisponentes para a infecção recorrente por *C. albicans*. Nesses casos, os tratamentos convencionais podem se mostrar pouco eficazes, sendo comum a reincidência da infecção mesmo após o término do tratamento (MARTINS et al., 2014; JOHAL et al., 2016; SOBEL, 2016).

Considerando o cenário apresentado, a investigação de novas alternativas para o tratamento da CVVR se tornou um relevante assunto de pesquisa, visando melhorar a eficácia e oferecer maior conforto para a paciente durante o tratamento. Dentre as substâncias naturais com atividade antifúngica o extrato de própolis tem se mostrado capaz de atuar na restauração do equilíbrio da microbiota vaginal e na inibição dos fatores de virulência microbiana (DOTA et al., 2011; FELIX et al., 2019). Sendo que a associação de substâncias naturais à carreadores nanoestruturados se mostra ainda mais vantajosa, pois a nanotecnologia farmacêutica possibilita a potencialização da atividade e redução da toxicidade de fármacos e substâncias de origem natural ao atuar na melhoria de aspectos como estabilidade, liberação e permeabilidade desses compostos (GHARIB et al., 2011; KENECHUKWU et al., 2018).

Considerando o cenário apresentado, visando obter uma nova alternativa para o manejo terapêutico da CVVR, foram desenvolvidas nanopartículas com um sistema de

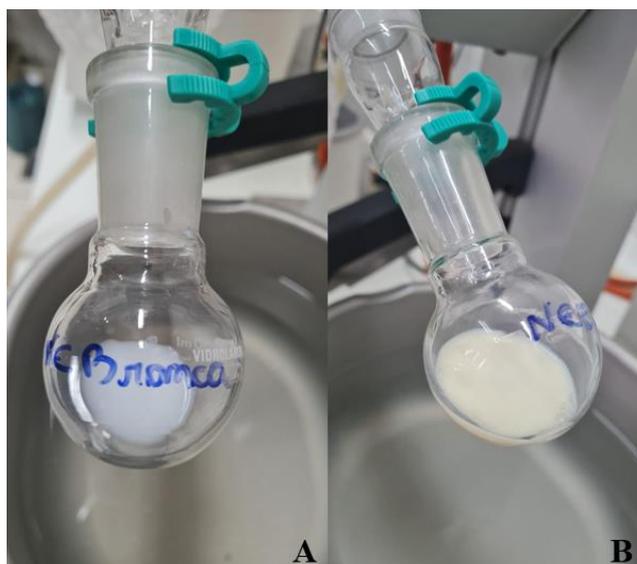
liberação para o extrato de própolis, e posteriormente essas nanopartículas foram revestidas com ácido hialurônico para melhorar a eficácia antifúngica do extrato.

5.1.1. Preparo e Caracterização das nanopartículas

Utilizando método de preparo de nanoesferas por nanoprecipitação descrito por Fessi et al (1989), com adaptações, foi desenvolvida a formulação contendo nanoesferas carregados com extrato de própolis.

Devido as suas propriedades relevantes, seu potencial de controlar a liberação de fármacos e a capacidade de incorporar agentes antimicrobianos potencializando sua função, a PCL foi o polímero de escolha para a síntese das nanoesferas (MARTÍNEZ-ABAD et al., 2013). Ademais, outros estudos evidenciaram que a utilização da PCL na produção de nanoesferas resultou em alta taxa de encapsulação (em torno de 90%) (TEIXEIRA et al., 2022). A utilização do PCL ainda se mostra vantajosa devido a suas características hidrofóbicas: como a maioria dos compostos ativos do extrato de própolis (flavonoides e ácidos fenólicos) também são pouco solúveis em água, isso facilita sua interação com o polímero e conseqüente incorporação na matriz polimérica da nanoesfera (MENDEZ-PFEIFFER et al., 2021). O Tween 80 e o Span 80 são ambas moléculas anfifílicas, que atuam como agentes protetores de coloides, comumente utilizadas para estabilizar nanopartículas, através da formação de barreiras estéricas que diminuem a agregação e o tamanho das nanopartículas. Eles ajudam a estabilizar o sistema polímero-tensoativo-água, por reduzir a tensão interfacial existente entre estas substâncias, reduzindo a tensão interfacial entre as fases. A acetona se apresenta como um solvente orgânico miscível em água e fácil de remover por evaporação, se mostrando eficaz em solubilizar a PCL (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009).

Figura 6. Formulações de (A) NS BRA e (B) NS EPM após evaporação do solvente no rotaevaporador.



Ao final do processo de evaporação do solvente, obteve-se o volume final de 2,0 mL de formulação com concentração de 10 mg/mL de extrato de própolis. A formulação contendo extrato de própolis apresentou uma coloração amarelada, devido a cor natural do extrato. As nanopartículas brancas e associadas ao extrato de própolis foram caracterizadas quanto ao D_h , IPD e PZ.

Tabela 5. Caracterização das nanoesferas brancas e associadas ao EPM

	$D_h \pm DP$ (nm)	IPD $\pm DP$	Potencial zeta $\pm DP$ (mV)
NS BR	191,0 \pm 1,35	0,156 \pm 0,014	-32,9 \pm 0,379
NS EPM	168, 5 \pm 0,2082	0,128 \pm 0,016	-27,8 \pm 0,577

Legenda: (D_h) diâmetro hidrodinâmico médio. (DP) desvio padrão. (IPD) Índice de Polidispersão

O tamanho da nanopartícula é uma característica importante para os mecanismos de transporte, pois auxilia na internalização pelas células epiteliais, aumentando a biodisponibilidade dos ativos no canal vaginal (MELO et al., 2020). O tamanho esperado para nanoesferas obtidas por nanoprecipitação é em torno de 200nm. Logo, o tamanho das nanopartículas obtidas se mostrou condizente com o descrito na literatura (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009). Ademais, sabe-se que tamanhos de partículas menores ou iguais a 300 nm são mais adequados para 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. As nanopartículas apresentaram índices de polidispersão entre 0,1 e 0,2, indicando uma distribuição homogênea das partículas (DANAEI et al., 2018).

O Potencial Zeta é um termo científico para potencial eletrocinético em sistemas coloidais, e está relacionado ao potencial eletrostático na dupla camada elétrica que envolve uma nanopartícula em dispersão (HONARY, ZAHIR, 2013). Em uma solução iônica, as nanopartículas apresentam uma carga líquida, e elas terão uma camada de íons de carga oposta fortemente ligada à sua superfície, isso é chamado de camada fixa. Uma segunda camada externa difusa é composta por íons fracamente associados. Essas duas camadas são chamadas coletivamente de dupla camada elétrica. À medida que a partícula se move (devido à difusão browniana ou força aplicada), é criada uma diferença de potencial entre os íons que estão no meio de dispersão e os íons na camada difusa (que se movem com a nanopartícula). O potencial eletrostático neste limite do “plano de deslizamento” é chamado de Potencial Zeta e está relacionado à carga da superfície da nanopartícula (CLOGSTON, PATRI, 2011; HONARY, ZAHIR, 2013)

Embora o PZ não seja igual ao potencial da camada fixa ou ao potencial elétrico da superfície na dupla camada, sua medição é atualmente a maneira mais simples e direta de caracterizar a superfície de coloides carregados, e os valores obtidos podem ser interpretados afim de avaliar a estabilidade de sistemas dispersos bem com a tendência de uma nanopartícula de permear membranas (XU, 2008; CLOGSTON, PATRI, 2011)

Sabe-se que o PZ é um indicativo do grau de repulsão entre as partículas adjacentes com carga semelhante: um alto PZ (negativo ou positivo) conferirá estabilidade, ou seja, as partículas resistirão à agregação. Assim, partículas com alto potencial zeta são eletricamente estabilizadas, sendo que valores maiores que 30 mV em módulos são associados a sistemas mais estáveis e com menor tendência a flocular (DOOSTMOHAMMADI et al., 2011; CLOGSTON, PATRI, 2011).

Sabe-se também que partículas catiônicas (PZ com valores positivos) geralmente exibem mais toxicidade, estando associadas à ruptura da parede celular (CLOGSTON, PATRI, 2011). Desta forma, em se tratando de nanopartículas para aplicação biológica, PZ com valores negativos podem ser mais vantajosos. Não obstante, as superfícies celulares são recobertas por moléculas de proteoglicanos sulfatados carregadas negativamente, e valores de potencial PZ fortemente aniônicos (muito maiores que -30

mV), embora confirmam excelente estabilidade a formulação, podem dificultar que a nanopartícula se aproxime das células do tecido alvo devido a forças repulsivas. A repulsão pode impossibilitar as interações das nanopartículas com os receptores de membrana e, conseqüentemente, dificultar sua internalização (XU, 2008; CLOGSTON, PATRI, 2011; HONARY, ZAHIR, 2013)

5.1.2. *Revestimento das nanopartículas*

O Ácido Hialurônico foi escolhido como revestimento para as nanoesferas poliméricas principalmente devido a sua capacidade de interagir com o receptor CD44, que é uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície epitelial vaginal. (CAI et al., 2019). Estudos prévios, realizados por Melo e colaboradores(2020), ao investigar o potencial de nanopartículas de Eudragit RL100 associadas a Anfotericina B para o tratamento de CVV, contataram que as nanopartículas revestidas com AH demonstraram superioridade terapêutica em relação a não revestidas em modelo *in vivo*. Essa superioridade deve-se a capacidade do receptor CD44 se ligar ao hialuronato na matriz extracelular, dessa forma a interação do AH com o receptor CD44 permite que as nanopartículas sejam internalizadas pelas células epiteliais através de endocitose mediada por receptor, aumentando a biodisponibilidade do fármaco de forma a eliminar a forma fúngica e hifas de *Candida ssp* (ALHO & UNDERHILL, 1989; CAI et al., 2019). Esse benefício é de grande interesse, visto que um fator contribuinte para a CVVR é a reemergência de espécies de *Candida* das camadas mais profundas dos tecidos vaginais, espécies essas que não foram eliminadas por meio de tratamentos convencionais (SOBEL, 2016)

Logo, afim de potencializar a atividade antifúngica da formulação e obter as melhores características para a finalidade pretendida, foram testadas diferentes concentrações de AH no revestimento das NS BRA, conforme descrito por Melo et al. (2020), com adaptações. As nanopartículas revestidas em cada umas das concentrações de AH foram caracterizadas, conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6. Dh, IPD e PZ das NS BRA revestidas com diferentes concentrações de AH

Concentração de AH (%p/v)	Dh ± DP (nm)	IPD ± DP	Potencial Zeta ± DP (mV)
0,05	192,6 ± 1,253	0,152 ± 0,007	-30,1 ± 0,850
0,1	224 ± 1,823	0,222 ± 0,007	-47,8 ± 0,781
0,15	199,5 ± 2,02	0,431 ± 1,02	-57,5 ± 0,1
0,2	202,9 ± 2,5	0,443 ± 0,4	-55,4 ± 0,41
0,25	211,2 ± 2,47	0,421 ± 0,10	-53,2 ± 0,42
0,5	275,2 ± 3,01	0,588 ± 0,01	-64 ± 0,5
1,5	842,6 ± 3,41	0,683 ± 0,8	-60,4 ± 0,7
3,0	*	*	*

Legenda: (D_h) diâmetro hidrodinâmico médio. (DP) desvio padrão. (IPD) Índice de Polidispersão. *Alta concentração de AH levou a formação de um gel, impossibilitando a caracterização

Nota-se que as nanoesferas revestidas por AH nas concentrações 0,05% a 0,5% apresentaram tamanhos considerados adequados (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009). Entretanto, observa-se também que com a aumento de AH o IPD das nanopartículas também aumentou, sendo que a partir de 0,15% p/v de AH o sistema passa a se apresentar polidisperso, com IPD superior a 0,3, o que não é uma característica desejável para a finalidade pretendida (MELO et al., 2019) Tanto as NS revestidas a 0,05% quanto as revestidas à 0,1% de AH podem ser consideradas monodispersas, visto que o IPD encontrado em ambas é inferior a 0,3. Não obstante, o valor de PZ das NS revestidas a 0,1% p/v indicam nanopartículas muito aniônicas, o que pode dificultar sua internalização pelas células do epitélio vaginal (XU, 2008; CLOGSTON & PATRI, 2011). Dessa forma, as nanoesferas revestidas a 0,05% de AH se mostraram mais adequadas em questão de tamanho, polidispersão e potencial zeta em relação às outras concentrações testadas.

5.1.3. Caracterização das Nanoesferas revestidas

Uma vez que foi constatado que o as nanoesferas mostravam melhores características quando revestidas com AH à 0,05% (p/v), as NS EPM também foram revestidas nessa concentração e caracterizadas quando ao Dh, IPD e Potencial Zeta. Os resultados estão expressos na Tabela 7, juntamente das caracterizações das NS não revestidas.

Tabela 7. Caracterização das NS revestidas e não revestidas quanto ao Dh, IPD e PZ

	Dh ± DP (nm)	IPD ± DP	Potencial Zeta ± DP (mV)
NS BR	191,0 ± 1,35	0,156 ± 0,014	-32,9 ± 0,379
NS BR + AH	192,6 ± 1,253	0,152 ± 0,007	-30,1 ± 0,850
NS EPM	168,5 ± 0,2082	0,128 ± 0,016	-27,8 ± 0,577
NS EPM + AH	169,5 ± 0,3035	0,119 ± 0,01	-28,5 ± 0,115

Conforme o esperado não foi observado aumento significativo no tamanho das nanopartículas após o revestimento a 0,05% de AH. Também não foram observadas mudanças na dispersão do sistema, que continuou monodisperso (IPD abaixo de 0,3) tanto no caso das NS BRA AH quanto nas NS EPM AH.

Nota-se que o potencial zeta das NP revestidas continua próximo ou superior ao das NP não revestidas, o que já era esperado e é explicado pela presença dos grupos aniônicos inerentes do AH, sendo condizente com os resultados encontrados por Melo e colaboradores (2020) e com os dados apresentados na Tabela 6, onde pode-se observar que à medida que concentração de AH no revestimento era aumentada, o PZ se tornava mais negativo. Não obstante, pode-se dizer que a mudança no PZ das NP revestidas se mostra benéfico, pois se aproxima de 30 mV em módulo, contribuindo para assegurar estabilidade física do sistema (XU, 2008; CLOGSTON & PATRI, 2011).

5.2. Estabilidade preliminar da formulação

Foi avaliada a estabilidade das nanopartículas não revestidas e revestidas por 0,05% (p/v) de AH nos dias 1, 7, 14 e 30 após o seu preparo, mantidas a temperatura de 8°C. Nos tempos pré-estabelecidos, as formulações foram analisadas visualmente e não foram observadas alterações visíveis nem formação de precipitados. Também foram analisados o Dh, IPD e PZ, e os dados obtidos podem ser observados nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Análise do Diâmetro hidrodinâmico das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
NSB	191,0 ± 1,35	195,0 ± 0,66	193,8 ± 1,37	191,7 ± 0,264
NSB AH	192,6 ± 1,253	193,2 ± 3,014	193,3 ± 1,518	194,9 ± 1,997
NS EPM	168,5 ± 0,2082	169,8 ± 0,7638	168,6 ± 0,7000	168,3 ± 0,4041
NS EPM AH	169,5 ± 0,3035	172,3 ± 1,138	171,5 ± 1,069	170,3 ± 0,978

Estabilidade das nanoesferas revestidas e não revestidas analisadas em dias diferentes com intervalos de tempos: T1, T7, T14 e T30. As amostras foram armazenadas a 8°C durante toda a análise e avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico das NS, os resultados estão expressos em nm (nanômetros). Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey's de comparações múltiplas com $p < 0,05$.

As análises estatísticas dos dados mostraram que não há diferença significativa entre os dias (as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$), portanto não houve diferença entre os tamanhos, IPD e potenciais zeta nos dias 1º ao 30º, quando armazenadas em geladeira, à temperatura de 8°C. A formulação continuou a apresentar tamanho esperado para nanoesferas obtidas por nanoprecipitação, em torno de 200nm, que é um tamanho adequado para faixa preconizada em aplicações dérmicas e transdérmicas (VAUTHIER, BOUCHEMAL, 2009).

Tabela 9. Análise do índice de polidispersão das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
NSB	0,156 ± 0,014	0,167 ± 0,009	0,162 ± 0,013	0,173 ± 0,013
NSB AH	0,152 ± 0,007	0,169 ± 0,021	0,182 ± 0,015	0,174 ± 0,010
NS EPM	0,128 ± 0,016	0,109 ± 0,01	0,110 ± 0,005	0,112 ± 0,010
NS EPM AH	0,119 ± 0,011	0,126 ± 0,016	0,134 ± 0,008	0,146 ± 0,010

Estabilidade das nanoesferas revestidas e não revestidas analisadas em dias diferentes com intervalos de tempos: T1, T7, T14 e T30. As amostras foram armazenadas a 8°C durante toda a análise e avaliadas quanto ao índice de polidispersão das NS. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey's de comparações múltiplas com $p < 0,05$.

O Potencial Zeta das nanoesferas permaneceu estável no período avaliado e, conforme esperado para os valores encontrados, não foi observado nenhuma coalescência ou agregação globular. Isso também corrobora com os valores de IPD obtidos, que demonstra que a formulação continuou a se apresentar como um sistema monodisperso.

Tabela 10. Análise do Potencial Zeta das nanoesferas em diferentes dias para avaliação da estabilidade

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 30
NSB	-32,9 ± 0,379	-33,1 ± 0,321	-33,2 ± 0,200	-33,3 ± 0,416
NSB AH	-30,1 ± 0,850	-35,7 ± 0,493	-34,0 ± 0,379	-36,6 ± 1,42
NS EPM	-27,8 ± 0,577	-31,6 ± 0,416	-29,6 ± 0,603	-30,8 ± 0,400
NS EPM AH	-28,5 ± 0,115	-29,3 ± 0,985	-32,5 ± 0,929	-33,3 ± 0,252

Estabilidade das nanoesferas revestidas e não revestidas analisadas em dias diferentes com intervalos de tempos: T1, T7, T14 e T30. As amostras foram armazenadas a 8°C durante toda a análise e avaliadas quanto ao potencial zeta das NS, os resultados estão expressos em mV. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey's de comparações múltiplas com $p < 0,05$.

Pode-se concluir então que as nanopartículas se mostraram estáveis por 30 dias consecutivos à temperatura de 8°C, sem mudanças estatisticamente significativas no diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta.

5.3. Atividade antifúngica *in vitro* das nanoesferas

A produtora das amostras de extrato de própolis utilizado nesse estudo, Mel Milagres, forneceu dados de que a própolis utilizada para obtenção do extrato foi coletada em colmeias localizadas em região com predominância de *Baccharis dracunculifolia*, na Zona da Mata do estado de Minas Gerais. Foi demonstrado que a própolis coletada em regiões semelhantes, principalmente em regiões tropicais como o Brasil, com predominância do alecrim-do-campo, apresenta uma composição química característica, rica em compostos fenólicos prenilados como o artemillin C, bacarina, e drupanina, além de terpenóides e do ácido p-cumárico e seus derivados prenilados (BANKOVA, 2005; SALATINO et al., 2005; MACHADO et al., 2016).

O Extrato de Própolis Milagres foi produzido seguindo os regulamentos técnicos do Ministério da Agricultura, apresentando 11% de concentração de extrato seco, assim como muitos outros produtos comerciais. O extrato final produzido é hidroalcolico, sendo utilizado álcool cereal 80% ficando no processo de maceração até atingir o máximo de diluição (mínimo de 7 dias), em seguida realizada a filtração simples (MILAGRES, 2022). Logo, apesar de não ter sido realizados os testes de caracterização do EP, pode-se inferir que o EP utilizado nesse estudo apresenta os requisitos para ser utilizado como potencial antifúngico.

A atividade antifúngica das nanoesferas e do EP foi avaliada contra cepas de *C. albicans* por meio do método de difusão em ágar. Conforme pode ser observado na Tabela 11, a solução preparada a partir do EPM apresentou halo de inibição de $12,01 \pm 1,78$ mm, o que configura uma atividade antifúngica promissora quando comparado com o halo de $16,01 \pm 2,33$ mm formado pela solução de 5% de MN, que foi utilizada como controle positivo. Conforme esperado, a solução de AH 0,05% p/v e as NS BRA revestidas e não revestidas não apresentaram formação de halo de inibição, uma vez que não possuem propriedades antifúngicas. Também pode-se observar na tabela que não houve formação de halo mediante 100 μ L de amostra das NS EPM e NS EPM AH, que foram depositados nos poços, o que contrasta com a evidência de atividade antifúngica demonstrada pelo halo de inibição formado pelo EPM livre.

Tabela 11. Halos obtidos a partir do método de difusão em poço, utilizando 100 μ L de amostra

Amostras	Tamanho do Halo \pm DP (mm)
Solução MN 0,5 mg/mL	$16,01 \pm 2,33$
Solução EPM 10mg/mL	$12,01 \pm 1,78$
Solução AH 0,05% p/v	-
NS BRA	-
NS BRA AH	-
NS EPM	-
NS EPM AH	-

Considerando os resultados apresentados na tabela 8, um novo teste foi feito para detecção de halos de inibição, afim de obter melhores resultados em relação as NS EPM revestidas e não revestidas. Pelo método da difusão de poços, diferentes volumes da formulação foram adicionados aos poços, com a finalidade de verificar se existe relação entre a quantidade de EPM e a formação de halo.

Conforme esperado, e já descrito anteriormente em outros estudos que investigaram a atividade antifúngica do extrato de própolis (CORRÊA et al., 2020), o EPM inibiu o crescimento de *C. albicans* de maneira dependente da dose, o que pode ser observado na Tabela 10, na qual o tamanho do halo de inibição do EPM aumenta proporcionalmente ao volume de extrato depositado no poço. Entretanto, as NS EPM revestidas e não revestidas não apresentaram halos de inibição, mesmo utilizando maiores volumes da formulação.

Tabela 12. Diâmetro dos halos de inibição conforme volume de amostra

Amostra	Diâmetro do Halo (mm)						
	50µl	100µl	150µl	200µl	220µl	250µl	300µl
Solução EPM 10mg/mL	10	12	13	14	14	14	15
Solução MN 0,5 mg/mL	14	15	15	16	18	18	19
NS BRA	-	-	-	-	-	-	-
NS BRA AH	-	-	-	-	-	-	-
NS EPM	-	-	-	-	-	-	-
NS EPM AH	-	-	-	-	-	-	-

Considerando os resultados encontrados para o EPM livre, uma possível causa para a ausência de halo de inibição das amostras de EPM associado às nanoesferas pode ser a maior interação dos compostos ativos da própolis com a matriz polimérica, devido a hidrofobicidade desses compostos, causando dificuldade de liberação do extrato no meio de cultura. Além disso, sabe-se que nanopartículas poliméricas promovem a liberação controlada de moléculas aprisionadas e, portanto, a baixa atividade antimicrobiana no método de difusão em ágar pode ser atribuída ao processo de liberação prolongada, permitindo um crescimento inicial dos microrganismos que impossibilita a formação de halo (GASPAR et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Não obstante, na avaliação da atividade antifúngica em modelo experimental *in vivo*, as nanopartículas não revestidas e revestidas apresentaram resultados expressivos, conforme pode ser observado na tabela 11.

5.4. Atividade antifúngica *in vivo* das nanoesferas em relação à *Candida albicans*

Para a avaliação do efeito antifúngico das NP EPM revestidas e não revestidas, e seus respectivos controles, em relação à *C. albicans*, foi empregado um modelo experimental *in vivo* que envolve a indução prévia de um estado de imunossupressão transitório, além de tratamento hormonal dos animais para a indução da fase estrogênica do ciclo estral, de modo a garantir a infecção das ratas (CONTI et al., 2014). Os animais

foram então tratados com as NPs e controles, e os resultados obtidos se encontram na Tabela 11, onde pode ser observado o número de animais infectados e sua carga fúngica no T0 (dia do tratamento) e T24 (24 horas após os tratamentos), além da porcentagem da redução da carga fúngica de T24 em relação a T0.

Conforme esperado todos os animais dos grupos utilizados como controle e tratados com PBS, NS BRA e NS BRA AH continuaram infectados até o final do experimento, sem redução significativa na carga fúngica. No grupo 4, que recebeu a solução de miconazol 0,5 mg/mL (controle positivo), observou-se a redução de 100% da carga fúngica, com a cura de todos os animais.

Os animais do grupo 5, que foram tratados com a solução de EPM 10 mg/mL, apresentaram redução de 22,7% da carga fúngica em T24, porém todos os animais permaneceram infectados. Esse resultado é condizente com dados obtidos em outros estudos, que evidenciam a baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade dos compostos ativos da própolis (CORRÊA et al., 2020), sendo necessária a associação do EP às tecnologias farmacêuticas que possibilitem superar barreiras de solubilidade, permeação cutânea e biodisponibilidade para potencialização de suas atividades biológicas (DOTA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016; MENDEZ-PFEIFFER et al., 2021). Esses estudos também corroboram com os resultados obtidos *in vivo* para as nanoesferas carregadas com EP: o grupo 6, tratado com NS EPM não revestidas, apresentou 76% de redução na carga fúngica, e 3 dos 5 animais do grupo se apresentaram curados, evidenciando a potencialização da atividade biológica do extrato de própolis quando associados às nanopartículas poliméricas.

Por fim, pode-se considerar que os resultados mais promissores foram em resposta ao tratamento com as NP EPM AH, com 100% de redução da carga fúngica e com todos os animais considerados curados em T24, após dose única de tratamento. Outros trabalhos que desenvolveram nanopartículas poliméricas revestidas com ácido hialurônico, no estudo da atividade antifúngica *in vivo* da formulação, também observaram resultados superiores das nanopartículas revestidas em relação as não revestidas (MELO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2022). Isso se deve à interação do HA na superfície das nanopartículas com os receptores CD44 na membrana plasmática das células epiteliais vaginais, induzindo a internalização dos nanocarreadores e consequente eliminação dos microrganismos (ALHO, UNDERHILL, 1989; MELO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2022).

Tabela 13. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica observada nos animais tratados de forma intravaginal com nanopartículas de extrato de própolis e seus respectivos controles

GRUPOS	TRATAMENTO	T0		T24		Redução ^a (%)
		Log UFC/placa ± DP	Animais infectados/N	Log UFC/placa ± DP	Animais infectados/N	
1	PBS	3,89 ± 0,02	5/5	3,90 ± 0,02	5/5	0
2	NS BRA	3,63 ± 0,15	5/5	3,77 ± 0,12	5/5	0
3	NS BRA AH	3,77 ± 0,17	5/5	3,47 ± 0,40	5/5	7,9
4	MN 0,5 mg/ml	3,91 ± 0,01	5/5	0,00 ± 0,00*	0/5	100
5	EPM 10mg/mL	3,65 ± 0,21	5/5	2,82 ± 0,18	5/5	22,7
6	NS EPM	3,88 ± 0,11	5/5	0,92 ± 0,05*	2/5	76,3
7	NS EPM AH	3,70 ± 0,20	5/5	0,00 ± 0,00*	0/5	100

T0 = início do tratamento (dose única); T24 = 24 horas após o início do tratamento; ^a Porcentagem de redução da carga fúngica comparada ao T0; * Diferença estatisticamente significativa comparada ao T0 (p < 0,05). N = número de animais (5).

6. CONCLUSÃO

Nanopartículas de PCL incorporadas com EPM, revestidas ou não com ácido hialurônico, foram sintetizadas pelo método da nanoprecipitação, buscando estudar uma alternativa terapêutica natural e segura para o tratamento da CVVR. O diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas se mostraram adequados para aplicação vaginal. O AH foi utilizado como revestimento, e pode-se supor ele que promoveu a interação com os receptores CD44 das células epiteliais vaginais, e favoreceu a internalização das NP, pois houve uma cura de 100% dos animais tratados. Adicionalmente, as nanopartículas mostraram-se estáveis por 30 dias consecutivos, sem mudanças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados.

O EPM apresentou efeito inibitório dependente da dose, entretanto, as NP EPM revestidas e não revestidas não apresentaram efeito antifúngico *in vitro*. Isso pode ser devido ao processo de liberação prolongada das NP, permitindo um crescimento inicial dos microrganismos que impossibilita a formação de halo. A maior interação dos compostos ativos com a matriz polimérica também pode dificultar a liberação e difusão desses compostos no meio de cultura.

Entretanto, na avaliação da atividade antifúngica em modelo experimental *in vivo*, as nanopartículas não revestidas e revestidas apresentaram resultados expressivos, indicando atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*. Portanto, as formulações podem ser consideradas como uma alternativa terapêutica para o tratamento da CVVR.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** - Anvisa, v. 1, p. 154, 2010.

ANVISA. Consulta a Registro de Medicamentos, 2021. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/sistemas/consulta-a-registro-de-medicamento>> Acesso em: 3 de out. de 2022.

ABREU, Letícia Coli Louvise et al. Development and characterization of nisin nanoparticles as potential alternative for the recurrent vaginal candidiasis treatment. **Aaps Pharmscitech**, v. 17, p. 1421-1427, 2016.

ALHO, Anna Mafia; UNDERHILL, Charles B. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *The Journal of cell biology*, v. 108, n. 4, p. 1557-1565, 1989.

BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BASSO, V. et al. From genes to Networks: The Regulatory Circuitry Controlling *Candida albicans* Morphogenesis. **Springer Nature Switzerland**, p. 1-39, 2018.

BENEDETTI, V. P. et al. ERG11 gene polymorphisms and susceptibility to fluconazole in *Candida* isolates from diabetic and kidney transplant patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis, p. 1-215, 2022.

CAI, Jia et al. A potential carrier for anti-tumor targeted delivery-hyaluronic acid nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 208, p. 356-364, 2019.

CAMPOS, L. M. et al. Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110609, out. 2020.

CAO, C. et al. Global regulatory roles of the cAMP/PKA pathway revealed by phenotypic, transcriptomic and phosphoproteomic analyses in a null mutant of the PKA catalytic subunit in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 105, n.1, p. 46-64, 2017.

CAPOCI, Isis Regina Grenier et al. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: MCNEIL, S. E. (Ed.). **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**. New York: Humana Press, 2011. p.63-70.

CORRÊA, Jakeline L. et al. Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 256, p. 112791, 2020.

DEVEQUI-NUNES, Danielle et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018.

DOOSTMOHAMMADI, Ali et al. Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2311-2316, 2011.

DOTA, K.F.D. et al. Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, p. 1-8, 2011.

FELIX, T.C.; BRITO, D.V.D.R.; SANTOS, R.P. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 2, p. 133–141, 2019.

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

GASPAR, Livia Maria do Amorim Costa et al. Development and characterization of PLGA nanoparticles containing antibiotics. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 20, p. 1-9, 2018.

GHARIB, A.; FAEZIZADEH, Z.; MOHAMMAD, A.H. Preparation and antifungal activity of spray-dried amphotericin B-loaded nanospheres. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 351–355, 2011.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Crítica Rev Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GOSWAMI, R. et al. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. **Journal of Infection**, v. 41, n. 2, p. 162-166, 2000.

GRIGORIOU, Odysseas et al. Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v. 126, n. 1, p. 121-125, 2006

GUIMARÃES, Diana; CAVACO-PAULO, Artur; NOGUEIRA, Eugénia. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 601, p. 120571, 2021.

HADINOTO, Kunn; SUNDARESAN, Ajitha; CHEOW, Wean Sin. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 427-443, 2013.

HEALEY, K. R. et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. **Nature Communications**, v. 7, 29 mar. 2016.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, 1 mar. 2016.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

IMHOF, M. et al. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. **International journal of gynecology & obstetrics**, v. 89, n. 2, p. 127-132, 2005.

INTRA, J. et al. Prevalence and species distribution of microorganisms isolated among non-pregnant women affected by vulvovaginal candidiasis: A retrospective study over a 20 year-period. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 3, p. 101278, ago. 2022.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, jan. 2012.

JAEGER, Martin et al. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis. **Current infectious disease reports**, v. 15, p. 136-142, 2013.

JOHAL, H.S.; GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A.K. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 550–563, 2016.

KABIR, M.A.; AHMAD, Z. *Candida* infections and their prevention. **ISRN Preventive Medicine**, v. 2013, p. 01-13, 2013.

KECK, Cornelia M.; MÜLLER, Rainer H. Nanotoxicological classification system (NCS)—a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 445-448, 2013.

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.

KUBILIENE, Loreta et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.

- KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.
- LIU, Y.; FILLER, S.G. Candida albicans Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. **Eukaryotic Cell**, v.10, n. 2, p. 168–173, 2011.
- 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.
- MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.
- MAGALDI, S. et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 39-45, 2004.
- MARTINS, N. et al. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, v. 177, p 223–240, 2014.
- MARCHAIM, D. et al. Fluconazole-resistant candida albicans vulvovaginitis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407–1414, dez. 2012.
- MELO, C.M. et al. Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, p. 1-35, 2019.
- MENDEZ-PFEIFFER, Pablo et al. Nanocarriers as drug delivery systems for propolis: A therapeutic approach. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, p. 102762, 2021.
- MITBAA, L.; FAKHFAKH, N.; KALLEL, A.; BELHADJ, S.; SALAH, N.B.; BADA, N.; KALLEL, K. Vulvovaginal candidiasis: etiology, symptomatology and risk factors. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 01, p. 01-06, 2017.
- MOYES, D. L.; RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J. R. Candida albicans-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 338–346, 1 jan. 2015.
- NASCIMENTO, Ticiano Gomes et al. Polymeric nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. **Nanoscale research letters**, v. 11, p. 1-16, 2016.
- OTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. **Mycoses**, v. 44, p. 375-378, 2001.

PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PAWAR, P.R.; PAWAR, V.A.; AUTE, R.A. Comparative study on hidrolitic enzymes produced by diferente morphological forms of *Candida albicans*. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 66-68, 2014.

PHAN, Q.T. et al. Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. *PlosBiology*, v.5, p. 543-557, 2003.

PIÉRARD, G.E.; PIÉRARD, S.L. Nail histomycology, onychochromobiology, and fungal thigmotropism. **The Open Access Journal of Science and Technology**, v. 4, p. 01-6, 2016.

RICHTER, S.S. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida Species* causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2155–2162, 2005.

SALATINO, Antonio et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SARDI, J.C.O. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology and risk factors, pathogenesis, resistance, and new therapeutic options. **Current Fungal Infection Reports**, v.15, p. 32–40, 2021.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Letters in applied microbiology**, v. 35, n. 3, p. 203-207, 2002.

SHEPPARD, D.C. et al. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30480–30489, 2004.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SILVA-CARVALHO, Ricardo; BALTAZAR, Fátima; ALMEIDA-AGUIAR, Cristina. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2015, 2015.

SILVA, Isabelle Souza de Mélo et al. Encapsulation of red propolis in polymer nanoparticles for the destruction of pathogenic biofilms. **Aaps Pharmscitech**, v. 21, p. 1-9, 2020.

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

SOBEL, J.D. GYNECOLOGY Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics & Gynecolog**, p. 15-21, 2016

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.

SOPPIMATH, Kumaresh S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

TEIXEIRA, Aniely Dos Reis et al. Miconazole-Loaded Nanoparticles Coated with Hyaluronic Acid for the Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. Available at SSRN 4280741.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed. 2012.

TRAN, Tuan Hiep et al. Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. **Carbohydrate polymers**, v. 114, p. 407-415, 2014.

VAUTHIER, Christine; BOUCHEMAL, Kawthar. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

WÄCHTLER, B. et al. *Candida albicans* - Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. **PlosOne**, v. 7, n. 5, p. 1-9, 2012.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112-115, 2008.

ZHANG, J. Y. et al. Vulvovaginal candidiasis: Species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 584–591, 2014.