

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Verônica Ferrari Cervi

**FILMES DE PULLULAN CONTENDO NANOCARREADORES DE  
ÓLEO DE ROMÃ: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O  
TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS E VAGINAIS**

Santa Maria, RS  
2020



Verônica Ferrari Cervi

**FILMES DE PULLULAN CONTENDO NANOCARREADORES DE ÓLEO DE ROMÃ: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS E VAGINAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letícia Cruz  
Co-orientador: Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari

Santa Maria, RS  
2020



This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Cervi, Verônica Ferrari

FILMES DE PULLULAN CONTENDO NANOCARREADORES DE ÓLEO DEROMÁ: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS E VAGINAIS / Verônica Cervi.- 2020.

167 p.; 30 cm

Orientadora: Letícia Cruz

Coorientadora: Marcel Henrique Marcondes Sari Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa

Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. óleo vegetal 2. nanocápsula 3. dermatite atópica 4. candidíase vulvovaginal I. Cruz, Letícia II. Marcondes Sari, Marcel Henrique III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, VERÔNICA CERVI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.



Verônica Ferrari Cervi

**FILMES DE PULLULAN CONTENDO NANOCARREADORES DE ÓLEO DE ROMÃ: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS E VAGINAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 6 de novembro de 2020:**



---

**Leticia Cruz, Dra. (UFSM)**  
**(Presidente/Orientadora)**



---

**Adriana Raffin Pohlmann, Dra. (UFRGS)**



---

**Luana Mota Ferreira, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria, RS**  
**2020**





*Dedico este trabalho à minha família. À minha mãe, que esteve comigo do começo ao fim dessa jornada, e ao meu pai, que mesmo não pertencendo mais a este plano, me acompanha para sempre.*



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a Deus por me provar constantemente que eu jamais estive desamparada, mesmo nos momentos em que questioneei tudo.

Aos meus pais, Jorge Antônio e Maria Helena, pelo amor, apoio e compreensão. Obrigada por serem meus exemplos, incentivarem meus estudos, promoverem um ambiente familiar de segurança e afeto. Por serem minha base, muito obrigada.

À minha orientadora Letícia, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade concedida há oito anos atrás. Pela construção de uma relação de respeito, admiração e amizade. Obrigada pelos bons exemplos, ensinamentos, pela compreensão e por todo o incentivo.

Ao meu co-orientador Marcel, que além de peça fundamental neste trabalho, é um grande amigo. Obrigada pela disponibilidade incansável, pela amizade valiosa e por todo o carinho e compreensão que tens comigo. Sou imensamente grata pela oportunidade de aprender contigo através do exemplo incrível de ser humano que és, pela confiança que tens em mim, e pela convivência bem-humorada e construtiva que possuímos.

À minha querida IC Camila, fiel escudeira! Obrigada pela dedicação excepcional e por toda a ajuda durante este período. Também agradeço pela amizade que construímos, por tudo que tivemos oportunidade de aprender juntas, e por tornar os momentos de trabalho no laboratório muito agradáveis.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, por ter sido minha segunda casa durante tanto tempo. Agradeço à todas as pessoas que já fizeram e ainda fazem parte deste grupo maravilhoso por cruzarem meu caminho de maneira tão particular. Em especial, agradeço à Bárbara, Carina, Charlene, Daiane, Fernanda P., Jéssica, Mailine, Natháli, Taíne e Vinicius pelo convívio e pela troca de conhecimentos tão válidos. Agradeço também à professora Scheila pelos ensinamentos e pela amizade.

A todos os meus amigos que estiveram presentes durante esse período, agradeço pelo apoio e por tornarem a vida mais leve com suas companhias. Obrigada pelos momentos especiais e importantes que compartilhamos juntos. Sobretudo, gostaria de fazer um agradecimento especial à Fernanda D. (Fê), pelo papel essencial que ocupa em minha vida. Nossa amizade significa muito para mim, e sou muito grata pela nossa sintonia, pelo carinho e por toda a compreensão.

Às professoras Ethel e Cristiane, e sua aluna Carolina, da Universidade Federal de Pelotas, pela parceria desenvolvida neste trabalho com o modelo animal de dermatite atópica. Agradeço ao professor Fábio e seus alunos Lucas e Bruna, pelas análises realizadas no

equipamento de ensaio universal e no goniômetro. Também agradeço ao professor Roberto e sua aluna Ticiane, pelos experimentos *in vitro* de atividade antifúngica. Agradeço à professora Cristiane de Bona da Silva pelo empréstimo do Zetasizer.

Aos membros da banca examinadora, Adriana e Luana, que gentilmente aceitaram o convite para compor minha banca e pelo comprometimento em avaliar meu trabalho. Agradeço também à Daniele, pela participação.

Agradeço à CAPES, pelo fomento. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, instituição à qual tenho imensa felicidade em ter minha história escrita, pelo incentivo à ciência como ferramenta transformadora de indivíduos, e por fornecer o ambiente necessário para o desenvolvimento deste trabalho, que tanto me orgulho.

## RESUMO

### FILMES DE PULLULAN CONTENDO NANOCARREADORES DE ÓLEO DE ROMÃ: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DESORDENS CUTÂNEAS E VAGINAIS

AUTORA: Verônica Ferrari Cervi

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Letícia Cruz

CO-ORIENTADOR: Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari

O objetivo deste estudo foi desenvolver filmes de Pullulan (PUL) contendo nanocarreadores de óleo de romã visando aplicação cutânea para o tratamento de dermatite atópica e pela via vaginal para manejo de candidíase vulvovaginal (CVV). Os filmes de PUL foram desenvolvidos pelo método de deposição do solvente, e os plastificantes selecionados foram sorbitol (6,5%) e PEG 400 (1,5%). A metodologia de preparo das nanocápsulas de Eudragit RS100<sup>®</sup> (PSONC) e óleo de romã foi a deposição interfacial do polímero pré-formado, e para fins comparativos, nanoemulsões de óleo de romã (PSONE) foram preparadas pelo método da emulsificação espontânea. Os nanocarreadores apresentaram diâmetro médio de  $248 \pm 16$  nm para PSONE e  $181 \pm 6$  nm para PSONC, índice de polidispersão abaixo de 0,2 e potencial zeta de  $-25,63 \pm 1,1$  mV para PSONE e  $+43,13 \pm 0,7$  mV para PSONC. O pH se manteve na faixa ácida,  $6,77 \pm 0,27$  e  $5,31 \pm 0,17$ , respectivamente. Os filmes apresentaram elevadas propriedades oclusivas ( $57,6 \pm 0,8\%$ ,  $66,3 \pm 0,8\%$ ) e seu potencial de irritação foi avaliado pelo teste da membrana córneo-alantóide (HET-CAM), que evidenciou a biocompatibilidade das formulações. A performance biológica dos filmes foi testada em um modelo animal de dermatite atópica induzida por dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos adultos fêmea da raça *Balb/c*, com duração de 30 dias (CEEA: 23357-2018). Os animais foram induzidos com DNCB, e, no décimo quarto dia de protocolo, tratados nos respectivos grupos: não induzido; induzido DNCB não tratado; óleo de romã puro; filme veículo; filme contendo nanoemulsão de óleo de romã (PSONEF); filme contendo nanocápsula de óleo de romã (PSONCF) e controle positivo de hidrocortisona. O indutor e os tratamentos foram aplicados no dorso dos animais. No último dia de protocolo, o nível das lesões foi avaliado macroscopicamente e o teste de hipersensibilidade mecânica (filamento de Von-frey) foi realizado. Após, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras de pele, nas quais foram conduzidas avaliações de marcadores oxidativos e resposta inflamatória como a mieloperoxidase (MPO), espécies reativas (RS) e a superóxido dismutase (SOD). Os resultados obtidos demonstraram que a PSONCF promoveu a modulação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo, agindo na melhora das lesões e na redução da nocicepção. Após a performance promissora da PSONCF, o clotrimazol (CTZ) foi incorporado a esta formulação como um fármaco modelo visando a aplicação vaginal da formulação no tratamento da candidíase. A incorporação da suspensão de nanocápsulas de CTZ ao filme de PUL aumentou sua homogeneidade em relação ao filme contendo o fármaco livre e manteve sua estabilidade durante 120 dias. A liberação e a permeação *in vitro* foram avaliadas através da metodologia do saco de diálise e de células de Franz, onde a nanoencapsulação do fármaco promoveu sua liberação controlada (60% em 24 h). Ainda, as propriedades mucoadesivas da suspensão de nanocápsulas foram avaliadas pelo método da interação com a mucina, onde a mudança de carga do potencial zeta ( $+32,00 \pm 1,56$  mV para  $-5,20 \pm 0,07$  mV) e o aumento do diâmetro médio de partículas ( $171 \pm 0,4$  nm para  $747 \pm 79$ ) evidenciou o grande potencial bioadesivo da suspensão. Além disso, a força mucoadesiva e o tempo de desintegração dos filmes foram analisados, comprovando que o filme é mucoadesivo e de rápida desintegração (10 min), sendo considerado compatível e seguro para aplicação vaginal. Por fim, o teste de difusão em ágar foi realizado a fim de observar a atividade antifúngica da formulação frente a *Candida albicans*. A nanoencapsulação, bem como a incorporação no filme polimérico foi capaz de manter a atividade antifúngica *in vitro* do CTZ contra *Candida albicans*. Como conclusão, os filmes desenvolvidos foram considerados adequados e promissores para aplicação cutânea e vaginal no tratamento da dermatite atópica e candidíase vulvovaginal.

**Palavras-chaves:** óleo vegetal, nanoemulsão, nanocápsula, dermatite atópica, candidíase vulvovaginal.



## ABSTRACT

### **PULLULAN FILMS CONTAINING POMEGRANATE SEED OIL NANOCARRIERS: AN INTERESTING APPROACH FOR THE TREATMENT OF CUTANEOUS AND VAGINAL DISORDERS**

AUTHOR: Verônica Ferrari Cervi  
ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Letícia Cruz  
CO-ADVISOR: Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari

The aim of this study was to develop Pullulan films (PUL) containing pomegranate seed oil nanocarriers for the cutaneous treatment of atopic dermatitis and vaginal application for the management of vulvovaginal candidiasis (VVC). PUL films were developed using the solvent casting method, and the selected plasticizers were sorbitol (6.5%) and PEG 400 (1.5%). The selected methodology for the preparation of Eudragit RS100<sup>®</sup> nanocapsules containing pomegranate seed oil (PSONC) was the interfacial deposition of the pre-formed polymer. For comparative purposes, nanoemulsions (PSONE) were prepared by the spontaneous emulsification method. The nanocarriers average diameter were  $248 \pm 16$  nm for PSONE and  $181 \pm 6$  nm for PSONC, the polydispersity index was below 0.2 and the zeta potential values were  $-25.63 \pm 1.1$  mV for PSONE and  $+43.13 \pm 0.7$  mV for PSONC. The pH remained in the acid range, with values of  $6.77 \pm 0.27$  and  $5.31 \pm 0.17$ , respectively. The films demonstrated high occlusive properties ( $57.6 \pm 0.8\%$ ,  $66.3 \pm 0.8\%$ ) and their irritation potential were evaluated by the chorio-allantoic membrane test (HET-CAM), which confirmed the formulations biocompatibility. The biological performance of the films was tested in an animal model of atopic dermatitis induced by dinitrochlorobenzene (DNCB) in Balb / c female mice, with 30 days of duration (CEEA: 23357-2018). The animals were induced with DNCB, and, on the fourteenth day of the protocol, treated in the groups: naive; untreated DNCB-induced; pure pomegranate seed oil; vehicle film; pomegranate oil nanoemulsion film (PSONEF); pomegranate oil nanocapsule film (PSONCF) and hydrocortisone positive control. Induction and treatments were performed on the dorsal skin. On the last day of the protocol, the skin lesions levels were assessed and the mechanical hypersensitivity test (Von-frey filament) was performed. Afterwards, the animals were euthanized and oxidative stress and inflammatory parameters such as myeloperoxidase (MPO), reactive species (RS) and superoxide dismutase (SOD) were assessed. The results demonstrated that the formulation containing pomegranate seed oil nanocapsules (PSONCF) promoted the modulation of the inflammatory response and oxidative stress, improving the skin lesions and reducing nociception. Thus, clotrimazole (CTZ) was incorporated into the best formulation (PSONCF) as a model drug to treat VVC. The incorporation of CTZ nanocapsules to the PUL film increased its homogeneity and maintained its stability for 120 days. *In vitro* release and permeation tests were also evaluated using the dialysis bag and the Franz cell methodology, where the nanoencapsulation promoted CTZ controlled release (60% of the drug in 24). Furthermore, the mucoadhesive properties of the nanocapsule suspension were evaluated by the mucin interaction method, where the inversion of the zeta potential ( $+32.00 \pm 1.56$  mV to  $-5.20 \pm 0.07$  mV) and the increase in the mean diameter ( $171 \pm 0.4$  nm to  $747 \pm 79$ ) displayed the bioadhesive potential of the formulation. In addition, the mucoadhesive strength and disintegration time of the films were assessed, demonstrating that the film is mucoadhesive and rapidly disintegrating (10 min), considered compatible and safe for vaginal application. Finally, the agar diffusion test was carried out in order to observe the antifungal activity of the formulation against *Candida albicans*. The nanoencapsulation, as well as the incorporation in the polymeric film was able to keep the *in vitro* antifungal activity of CTZ against *Candida albicans*. In conclusion, the developed films were considered suitable and promising for cutaneous and vaginal application in the treatment of atopic dermatitis and vulvovaginal candidiasis.

**Key-words:** vegetable oil, nanoemulsions, nanocapsules, atopic dermatitis, vulvovaginal.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da dissertação. ....	33
<b>Figura 2.</b> Produção de filmes pelo método de “ <i>solvent casting</i> ” .....	36
<b>Figura 3.</b> Mecanismo básico de mucoadesão. ....	40
<b>Figura 4.</b> Balança analítica modificada para aparato de mucoadesão. ....	41
<b>Figura 5.</b> Ensaio <i>in vitro</i> .....	42
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do Pullulan. ....	44
<b>Figura 7.</b> Imagem de uma das formas de manifestação da dermatite atópica. ....	49
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do CTZ. ....	53
<b>Figura 9.</b> Nanoemulsão e Nanocápsula .....	55
<b>Figura 10.</b> A fruta romã. <i>Punica granatum</i> .....	58
<b>Figura 11.</b> Filme mucoadesivo de desintegração rápida. ....	146
<b>Figura 12.</b> Imagem de conclusão contendo os principais resultados do trabalho .....	146

### **Manuscrito 1. *Pullulan film incorporated with nanocapsules improves pomegranate seed oil anti-inflammatory and antioxidant effects in the treatment of atopic dermatitis in mice:***

<b>Fig. 1.</b> Schematic representation of the experimental design.....	75
<b>Fig. 2.</b> Macroscopic appearance of the films.....	83
<b>Fig. 3.</b> Morphological features by SEM analysis of the side section of PSONEF (A), PSONCF (B) and VEHICLE (C) films after cryofracture.....	83
<b>Fig. 4.</b> Contact angle analysis of the upper and underside of all film formulations. ....	84
<b>Fig. 5.</b> Occlusion factor in 6, 24 and 48 hours .....	85
<b>Fig. 6.</b> Hen’s Egg Test on the chorioallantoic membrane assay .....	86
<b>Fig. 7.</b> Effect of the free PSO and the films formulations on the severity of the skin lesions in mice .....	87
<b>Fig. 8.</b> Effect of the free PSO and the film formulations on the development of a mechanical hyper sensibility induced by DNCB in mice .....	89
<b>Fig. 9.</b> Effect of the free PSO and film formulations on the MPO activity (A), RS levels (B) and SOD activity (C) in the dorsal skin of mice .....	90

### **Manuscrito 2. *A novel nanotechnological mucoadhesive and fast-dissolving film for vaginal delivery of Clotrimazole: design, physicodynamic characterization and in vitro antifungal action:***

<b>Figure 1.</b> <i>In vitro</i> release of CTZ from CTZ-NC, CTZ-PUL, CTZ-NC-PUL and CTZ solution in acetate buffer pH 4.5 + EtOH 30%. ....	119
<b>Figure 2.</b> Hen’s Egg Test on the chorioallantoic membrane assay .....	120
<b>Figure 3.</b> Percentage of adherence in the falling liquid method. ....	121
<b>Figure 4.</b> Mucoadhesive strength evaluation of CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL .....	122
<b>Figure 5.</b> Permeation studies in cow vaginal mucosa.....	122
<b>Figure 6.</b> Antifungal activity against <i>Candida albicans</i> . ....	123



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estudos que demonstram o PUL como agente formador de filme, sozinho ou em combinação com outros polímeros.....	44
<b>Tabela 2.</b> Características observadas no filme de PUL frente às diferentes composições das nanocápsulas.....	136

### **Manuscrito 1. *Pullulan film incorporated with nanocapsules improves pomegranate seed oil anti-inflammatory and antioxidant effects in the treatment of atopic dermatitis in mice:***

<b>Table 1.</b> Pre formulation studies .....	81
<b>Table 2.</b> Nanostructures characterization.....	81
<b>Table 3.</b> Films characterization. Influence of different concentrations of Sorbitol on films physical characteristics.....	83
<b>Table 4.</b> Effect of the formulations and the DNCB treatments on the locomotor and exploratory activity parameters.....	88

### **Manuscrito 2. *A novel nanotechnological mucoadhesive and fast-dissolving film for vaginal delivery of Clotrimazole: design, physicodynamic characterization and in vitro antifungal action:***

<b>Tab. 1.</b> Homogeneity evaluation of the films. Weight, thickness and drug content of the film square.....	119
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	<i>Atopic dermatitis</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTZ	Clotrimazol
CTZ-NC	Nanocápsulas de clotrimazol
CTZ-NC-PUL	Filmes de nanocápsulas de clotrimazol
CTZ-PUL	Filme de clotrimazol
CVV	Candidíase vulvovaginal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNCB	Dinitroclorobenzeno
EtOH-PUL	<i>Ethanol polymeric film</i>
HC	<i>Hydrocortisone</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
MPO	Mieloperoxidase
NE	Nanoemulsão
NC	Nanocápsulas
OFT	<i>Open field test</i>
PEG 400	Polietilenoglicol
PSO	<i>Pomegranate seed oil</i>
PSONE	<i>Pomegranate seed oil nanoemulsion</i>
PSONEF	<i>Pomegranate seed oil nanoemulsion film</i>
PSONC	<i>Pomegranate seed oil nanocapsules</i>
PSONCF	<i>Pomegranate seed oil nanocapsules film</i>
PSO-NC-PUL	Filme de Pullulan com nanocápsulas de óleo de romã
PUL	Pullulan
RS	Espécies reativas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
	Tween 80®
VVC	<i>Vulvovaginal candidiasis</i>



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>35</b>
4.1	FILMES POLIMÉRICOS .....	35
4.1.1	Aspectos gerais e métodos de preparo .....	35
4.1.2	Caracterização dos filmes poliméricos.....	37
4.1.3	Composição e aplicações .....	43
4.2	VIA CUTÂNEA .....	47
4.2.1	Características da pele e filmes poliméricos para aplicação cutânea .....	47
4.2.2	Dermatite atópica.....	48
4.3	VIA VAGINAL .....	50
4.3.1	Características da via e filmes poliméricos de aplicação vaginal .....	50
4.3.2	Candidíase: definição, características clínicas e tratamentos.....	51
4.4	NANOTECNOLOGIA .....	54
4.4.1	Óleo de Romã .....	57
	<i>MANUSCRITO 1: Pullulan film incorporated with nanocapsules improves pomegranate seed oil anti-inflammatory and antioxidant effects in the treatment of atopic dermatitis in mice. ....</i>	<i>61</i>
	<i>MANUSCRITO 2: A novel nanotechnological mucoadhesive and fast-dissolving film for vaginal delivery of Clotrimazole: design, physicodynamic characterization and in vitro antifungal action.....</i>	<i>107</i>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>147</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>149</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>165</b>





## 1. INTRODUÇÃO

Filmes poliméricos são formas farmacêuticas sólidas de natureza flexível, estáveis, de fácil produção, transporte e ótimo custo benefício (KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014). Possuem boa aceitabilidade pelo paciente, sendo excelentes candidatos para aplicação sítio específica de formulações, promovendo maior tempo de residência no local de ação e reduzindo a frequência de administrações necessárias (KARKI et al., 2016; MORALES; MCCONVILLE, 2011). Sua composição pode ser de origem natural ou sintética, onde substâncias como os polissacarídeos se destacam por características como bioadesividade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (A. EL-GENDY, 2012; HAN, 2013; KOLA; KUMAR, 2013; LIEW; TAN; PEH, 2014). Dentre estes está o Pullulan (PUL), um polissacarídeo natural de origem fúngica conhecido pela sua alta hidrofiliçidade e versatilidade (K.R.; PONNUSAMI, 2017). Estudos abordam a escolha do PUL como agente filmógeno tanto no setor alimentício como no farmacêutico (TONG; XIAO; LIM, 2008; ZHU; SHENG; TONG, 2014). Nos trabalhos que abordam sua utilização na área farmacêutica como plataforma para a liberação de ativos terapêuticos, os filmes poliméricos de PUL se destacam por serem bioadesivos e de rápida desintegração (KARKI et al., 2016, SHAHZAD et al, 2018; TROVATTI et al, 2012; VUDDANDA et al, 2017).

Devido à sua versatilidade, a associação de filmes a nanoestruturas tem sido relatada como uma abordagem terapêutica inovadora para o tratamento de diferentes doenças, como hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertensão, inflamações pós-cirúrgicas, entre outros (AHMED et al., 2020; CHANDRA et al., 2018; KRAISIT et al., 2018, MORSI et al, 2017). A nanotecnologia aplicada às ciências farmacêuticas engloba diferentes sistemas nanoestruturados, que apresentam vantagens frente a formas convencionais, como por exemplo o aumento da solubilidade e biodisponibilidade de ativos, o direcionamento para um alvo terapêutico, o controle da liberação e a diminuição de efeitos adversos (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; SHESHALA et al., 2019).

Óleos vegetais têm sido cada vez mais estudados para compor diferentes sistemas nanoestruturados, os quais têm demonstrado um papel importante nas propriedades conferidas pelos mesmos, como citado anteriormente. Em nosso grupo de pesquisa, tem-se buscado investigar extensivamente as propriedades terapêuticas do óleo de romã associado a diferentes sistemas nanoestruturados, com o intuito de explorar suas potenciais propriedades farmacológicas (BASSIRI-JAHROMI, 2018; MIZRAHI et al., 2014; SIANO et al., 2016).

Estes trabalhos vêm revelando elevada ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral para as formulações desenvolvidas, tanto *in vitro* como *in vivo* (FERREIRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; MARCHIORI et al., 2017). Além disso, sistemas nanoestruturados, como nanocápsulas e nanoemulsões, podem promover maior permeação de ativos em diferentes tecidos e mucosas do organismo, o que se deve principalmente ao seu tamanho reduzido, carga do polímero utilizado e aumento da área de superfície (LADEMANN et al., 2007; ROBERTS et al., 2017).

A literatura relata a aplicação de filmes poliméricos em diferentes vias de administração, como a oral, cutânea e vaginal (BARTKOWIAK et al., 2018; PRAJAPATI et al., 2018; VOSS et al., 2018a). A via cutânea apresenta administração conveniente e sem dor, evita o metabolismo de primeira passagem para ativos que podem ter sua biodisponibilidade prejudicada pela administração oral e pode tanto promover absorção local quanto sistêmica de fármacos (IQBAL; ALI; BABOOTA, 2018). A utilização de filmes poliméricos na pele é vantajosa pois essa forma farmacêutica é de fácil aplicação e retirada, sensorial agradável e pode ser aplicada diretamente no alvo terapêutico (KARKI et al., 2016). Ainda, adversidades como a função de barreira e a dificuldade de difusão de ativos através de suas camadas podem ser contornadas com a vinculação dessas matrizes a sistemas nanoestruturados, como nanocápsulas e nanoemulsões (CARTER; NARASIMHAN; WANG, 2019).

Neste contexto, destaca-se a dermatite atópica, uma condição imunológica crônica que afeta 30% das crianças e 10% dos adultos no mundo todo, se caracterizando como um grave problema de saúde pública (THOMSON; WERNHAM; WILLIAMS, 2018). Seus principais sintomas são o surgimento de eczemas pruriginosos, escoriações e vermelhidão (THOMSEN, 2014). A terapia primária escolhida na clínica consiste em corticosteroides tópicos cuja potência varia de acordo com o grau de severidade das lesões (KAPUR; WATSON; CARR, 2018). Entretanto, efeitos adversos como atrofia cutânea, supressão adrenal e aumento do risco de infecção bacteriana estão relacionados com seu uso crônico (THOMSEN, 2014). Desta forma, a busca por novas alternativas terapêuticas se torna imprescindível.

Já a via vaginal é normalmente utilizada para o tratamento de doenças que afetam o trato vaginal de forma local, sendo considerada um desafio terapêutico por possuir peculiaridades fisiológicas, como o epitélio rugoso, grande área de superfície e tortuosidade (ENSIGN; CONE; HANES, 2014). Justamente neste contexto, os filmes poliméricos têm ganhado destaque nos últimos anos, e estudos apontam uma grande aceitabilidade de pacientes a essas formas farmacêuticas para via vaginal, pela facilidade de inserção e fixação do produto no local, sem a ocorrência de vazamentos e desconforto (NEL et al., 2011). Seu uso já foi relatado com e sem

a incorporação de sistemas nanoestruturados para o tratamento e profilaxia de infecções virais, bacterianas e fúngicas (CALVO et al., 2019; DOBARIA; BADHAN; MASHRU, 2009; REGEV et al., 2019).

Dentre as infecções que mais acometem o trato geniturinário feminino, está a candidíase vulvovaginal (CVV). A CVV é uma infecção que tem como principal agente patogênico o fungo *Candida albicans* (ACHKAR; FRIES, 2010). Os sintomas mais comuns da doença incluem dor e desconforto ao urinar, prurido e ardência, inchaço e corrimento vaginal anormal (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; CARAMELLA, 2015). O tratamento inclui combinações de uma gama de agentes antifúngicos administrados por via oral e local, de maneira concomitante (GONÇALVES et al., 2016; PAPPAS et al., 2015; SOBEL, 2007). As formas farmacêuticas mais comumente empregadas no tratamento da CVV são as semissólidas, como cremes e géis, e sua administração geralmente requer o auxílio de um dispositivo de aplicação plástico, que é considerado desconfortável, além de aumentar os custos de produção e contribuir para a poluição ambiental (BUNGE et al., 2017). Além disso, formas farmacêuticas semissólidas possuem baixa estabilidade em comparação com formulações sólidas e aumentam o volume dos fluidos vaginais, interferindo na microbiota nativa e contribuindo para o avanço de infecções (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018). Portanto, filmes poliméricos configuram uma escolha inteligente para veicular ativos, visto que são portáteis, discretos e de fácil manejo. Ainda, combinam as propriedades de uma forma sólida e semissólida, se transformando em gel uma vez em contato com a umidade da mucosa vaginal, possuindo elevada aderência, garantindo a permanência no local de ação e conseqüentemente, aumentando a eficácia terapêutica (BUNGE et al., 2017).

Desta forma, este trabalho objetivou o desenvolvimento de filmes poliméricos utilizando PUL como agente filmógeno, a fim de explorar a versatilidade de aplicações desta forma farmacêutica por diferentes vias de administração. Ainda, buscou-se incorporar nanocarreadores de óleo de romã à essa plataforma, devido à relevância de suas propriedades farmacológicas e aos resultados promissores posteriormente obtidos nos trabalhos de nosso grupo de pesquisa. Além disso, o clotrimazol (CTZ) foi empregado como fármaco modelo para o estudo da aplicação dos filmes pela via vaginal. Frente ao exposto, essa dissertação está estruturada em dois manuscritos diferentes, os quais discorrem individualmente sobre a aplicação cutânea dos filmes contendo nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de romã em um modelo animal de dermatite atópica, bem como a investigação de um filme contendo nanocápsulas de CTZ para aplicação no tratamento da CVV.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes de PUL contendo nanocápsulas de óleo de romã e avaliá-los em modelo *in vivo* de dermatite atópica, bem como incorporar o CTZ em formulação selecionada e testar *in vitro* a atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Quanto ao desenvolvimento de filmes para aplicação cutânea:*

- Preparar nanocápsulas de Eudragit RS100<sup>®</sup> contendo óleo de romã;
- Preparar nanoemulsões de óleo de romã para fins comparativos;
- Caracterizar os sistemas nanoestruturados quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Preparar filmes de PUL contendo os sistemas nanoestruturados;
- Escolher a composição quali/quantitativa dos filmes em relação à concentração e natureza dos plastificantes;
- Caracterizar os filmes quanto a diâmetro médio de recuperação, índice de polidispersão, morfologia, peso, espessura e resistência à dobradura;
- Avaliar a força de tensão, porcentagem de alongamento, módulo de elasticidade e ângulo de contato dos filmes poliméricos;
- Determinar o fator de oclusão *in vitro* dos filmes;
- Avaliar o potencial de irritação cutânea dos filmes *in vitro*;
- Avaliar os filmes desenvolvidos em modelo animal de dermatite atópica induzida por dinitroclorobenzeno.

*Quanto ao desenvolvimento de filmes para aplicação vaginal:*

- Incorporar o CTZ como fármaco modelo de estudo nas nanocápsulas de Eudragit RS100<sup>®</sup> contendo óleo de romã;

- Caracterizar a formulação de nanocápsulas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação;
- Preparar filmes de PUL contendo nanocápsulas de CTZ, bem como o CTZ na sua forma não-associada às nanocápsulas;
- Avaliar o teor e a homogeneidade dos filmes;
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* do CTZ a partir da suspensão de nanocápsulas e a partir dos filmes;
- Avaliar a estabilidade das suspensões de nanocápsulas e dos filmes em diferentes condições de armazenamento;
- Avaliar o potencial de irritação vaginal dos filmes *in vitro*;
- Avaliar o tempo de desintegração dos filmes *in vitro*;
- Investigar a porcentagem de adesão dos filmes à mucosa vaginal *in vitro*;
- Determinar a capacidade mucoadesiva das suspensões de nanocápsulas bem como a força de mucoadesão dos filmes;
- Estudar o perfil de permeação do CTZ a partir dos filmes em mucosa vaginal bovina;
- Determinar *in vitro* o efeito antifúngico dos filmes contra a *Candida albicans*.

### 3. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento desta dissertação está apresentado na forma de dois artigos científicos que serão submetidos à periódicos internacionais. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se descritos nos próprios manuscritos.

Em anexo a esta dissertação, encontra-se a carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, correspondente aos experimentos realizados no manuscrito 1.

**Figura 1.** Estrutura da dissertação.



Fonte: Próprio Autor.





## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 FILMES POLIMÉRICOS

#### 4.1.1 Aspectos gerais e métodos de preparo

Filmes poliméricos são caracterizados por uma fina camada de polímero que pode ou não conter plastificantes. Por apresentarem natureza flexível, são formulações adequadas para ação sítio específica em locais sensíveis, como feridas, lesões abrasivas e mucosas, sendo também menos relacionados a episódios de irritação tecidual devido ao seu sensorial agradável (KARKI et al., 2016; MORALES; MCCONVILLE, 2011). Os filmes também podem antecipar o tempo de início de ação de fármacos, reduzir a frequência de administração, contornar o metabolismo extensivo mediado por enzimas, além de serem de fácil produção, transporte e ótimo custo-benefício (KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014). Em geral, apresentam precisão e exatidão de dose, taxa de dissolução rápida e maior estabilidade e, dependendo do material utilizado em sua produção, podem ser altamente bioadesivos, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (ACHOURI et al., 2013; KARKI et al., 2016).

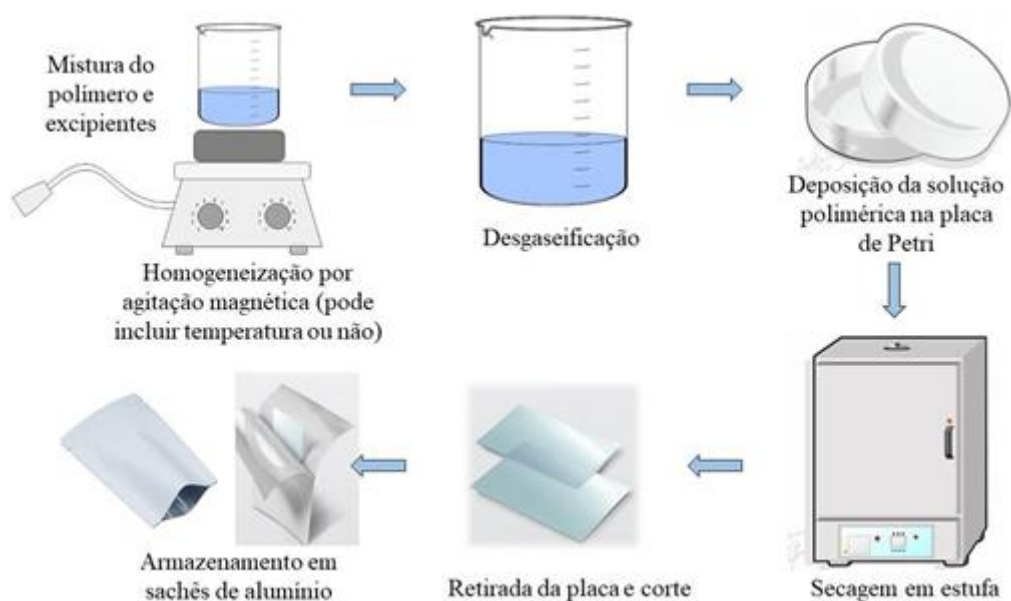
O histórico de comercialização dessa forma farmacêutica atingiu seu ápice com os filmes orodispersíveis, tendo origem em 2001, com as fitas refrescantes de Listerine<sup>®</sup>, desenvolvidas pela empresa Pfizer. A partir de então, filmes de ondasetrona (fármaco antiemético), zolmitriptano (fármaco antiemético), sildenafil (fármaco utilizado no tratamento da disfunção erétil), entre outros, foram desenvolvidos e comercializados dando enfoque na ação imediata do produto (WASILEWSKA, WINNICKA, 2019). Muitos destes produtos foram descontinuados, ao passo que novas aplicações para filmes poliméricos foram surgindo no mercado farmacêutico. Atualmente, a empresa Apothecus Pharmaceutical Corp. comercializa o VFC<sup>®</sup>, um filme contraceptivo vaginal solúvel composto por uma substância espermicida capaz de manter atividade por até 3 horas (APOTHECUS PHARMACEUTICAL CORP, 2020).

Dentre as principais técnicas utilizadas para a produção de filmes poliméricos estão a deposição do solvente, extrusão a quente e a impressão 3D (BASSI; KAUR, 2017; PREIS; BREITKREUTZ; SANDLER, 2015). O método da deposição do solvente (*solvent casting method*) foi desenvolvido há mais de 100 anos pela indústria da fotografia, sendo utilizado em

escala industrial para produção de plásticos, resinas e materiais sintéticos em geral, e posteriormente introduzido na indústria farmacêutica (SIEMANN, 2005). Sendo assim, é a metodologia mais utilizada por ser considerada fácil, prática e de baixo custo (**Figura 2**) (KNOOP; HOWELL, 1987; RUSSO et al., 2016).

A técnica tem início na escolha do solvente, quando a solubilidade da substância ativa e do polímero, bem como sua compatibilidade, precisam ser levadas em consideração. O uso de solventes orgânicos é muito questionado, não só por apresentar problemas em relação a armazenamento e disposição de resíduos, mas principalmente porque solventes orgânicos podem ser prejudiciais à saúde e ao meio ambiente (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Desta forma, o uso de água como solvente pode ser vantajoso, mas depende das propriedades físico-químicas da substância ativa e dos excipientes utilizados na formulação.

**Figura 2.** Produção de filmes pelo método de “*solvent casting*”. A etapa de desgaseificação pode ser omitida do processo, dependendo dos componentes da formulação.



Fonte: Próprio Autor.

Após a escolha do solvente, uma dispersão polimérica é preparada, na qual fatores como viscosidade, miscibilidade, temperatura e velocidade de agitação precisam ser monitorados. Posteriormente, a dispersão polimérica passa por uma etapa de desgaseificação, a fim de eliminar bolhas de ar, submetendo a solução ao banho de ultrassom ou permitindo que permaneça em repouso. Por fim, a dispersão é transferida para uma superfície ou molde de escolha e levada para etapa de secagem em estufa, onde o controle da temperatura, tempo de secagem e umidade devem ser observados. Na sequência da produção, os filmes são retirados

de seu molde, cortados e devidamente armazenados, para posterior caracterização (DIXIT; PUTHLI, 2009; KARKI et al., 2016).

#### **4.1.2 Caracterização dos filmes poliméricos**

A fim de verificar parâmetros de controle de qualidade e caracterização físico-química, filmes poliméricos podem ser avaliados quanto à espessura e variação de peso, homogeneidade e teor de ativo, propriedades mecânicas e físicas, morfologia de superfície, mucoadesão, permeação e liberação do fármaco, entre outros. A medida da espessura e do peso são importantes pois se correlacionam diretamente com a dosagem de ativo, e variam de acordo com a quantidade de polímeros, plastificantes e outros materiais presentes na composição do filme (KARKI et al., 2016). Além disso, garantir uma espessura homogênea é importante pois reflete em uma administração sensorialmente confortável para o paciente. Em geral, a espessura ideal de filmes varia de 50  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$  (NAIR et al., 2013), e pode ser medida com o auxílio de um micrômetro ou paquímetro digital, ou através de técnicas de microscopia (CHANDRA et al., 2018).

As propriedades mecânicas desempenham um papel fundamental na integridade física do filme polimérico, e sua avaliação geralmente se baseia em metodologias como a ASTM D882, da Sociedade Americana para Testes e Materiais (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2018; MORALES; MCCONVILLE, 2011; ULLOA et al., 2019). É importante que o filme possua resistência à tensão e flexibilidade suficientes para ser retirado do recipiente de secagem e manuseado com facilidade sem sofrer danos (LIEW; TAN; PEH, 2014). Características como a concentração e tipo de agente formador de filme utilizado, o processo de manufatura, a espessura do filme e a presença de substâncias ativas devem ser cuidadosamente controladas, pois influenciam diretamente em tais parâmetros (BASSI; KAUR, 2017; DAWABA et al., 2018). Desta forma, as propriedades mecânicas podem ser avaliadas em termos de resistência à dobradura, força de tensão, módulo de Young e percentual de alongamento que correspondem à flexibilidade, resistência, rigidez e plasticidade do filme.

A resistência à dobradura determina a flexibilidade do filme através da avaliação da quantidade de vezes que é possível dobrá-lo no mesmo lugar em um ângulo de 180° sem rachar ou quebrar (WASILEWSKA; WINNICKA, 2019). Deste modo, o teste representa a fragilidade do filme e auxilia na escolha da forma de armazenamento e manuseio do material. A literatura

indica que um filme capaz de dobrar até 300 vezes possui excelente flexibilidade (MUKHERJEE; BHARATH, 2013).

A força de tensão é definida como o estresse máximo aplicado ao filme até o rompimento e reflete a resistência do material (KARKI et al., 2016). Sua medida é realizada permitindo que o filme sofra deformação em uma taxa constante, onde o estresse máximo necessário para rompê-lo corresponde à força de tensão, normalmente expressada em Newtons (IRFAN et al., 2016). Desta forma, quanto maior a força de tensão, ou seja, a força aplicada necessária para romper o filme, mais resistente é o material. Este parâmetro pode ser calculado através da carga aplicada correspondente ao momento de ruptura, dividido pela área do filme, como mostra a equação abaixo:

$$\text{Eq. (1): Força de tensão} = \frac{\text{Carga na ruptura}}{\text{Espessura do filme} \times \text{Comprimento do filme}} \times 100$$

O módulo de Young ou módulo elástico determina a rigidez do filme, indicando sua resistência à deformação. Em suma, filmes que exibem elevada força de tensão apresentam um alto valor de módulo de Young, sendo mais firmes, rígidos e pouco flexíveis (WASILEWSKA; WINNICKA, 2019). O módulo de Young é representado pela razão entre o estresse aplicado e a tensão da região de deformação elástica, utilizando o cálculo a seguir:

$$\text{Eq. (2): Módulo de Young} = \frac{\text{Inclinação da curva de estresse e tensão}}{\text{Espessura do filme} \times \text{velocidade}} \times 100$$

Onde a velocidade se refere à velocidade de análise do texturômetro ou equipamento onde o ensaio é realizado.

O alongamento é um tipo de deformação capaz de refletir a plasticidade do material analisado, onde o aumento da porcentagem de alongamento indica um material mais plástico e conseqüentemente mais flexível (IRFAN et al., 2016). A amostra submetida a uma tensão sofre estiramento ou distensão, que é expressa pela porcentagem de alongamento, calculada da maneira a seguir:

$$\text{Eq. (3): \% de Alongamento} = \frac{\text{Diferença no comprimento final}}{\text{Comprimento inicial}} \times 100$$

Onde a diferença no comprimento final corresponde ao aumento do comprimento causado pela deformação em relação ao comprimento inicial do filme.

Nesse sentido, a literatura descreve a influência da composição de filmes poliméricos nas características mecânicas dos mesmos, como o desenvolvimento de um filme composto por

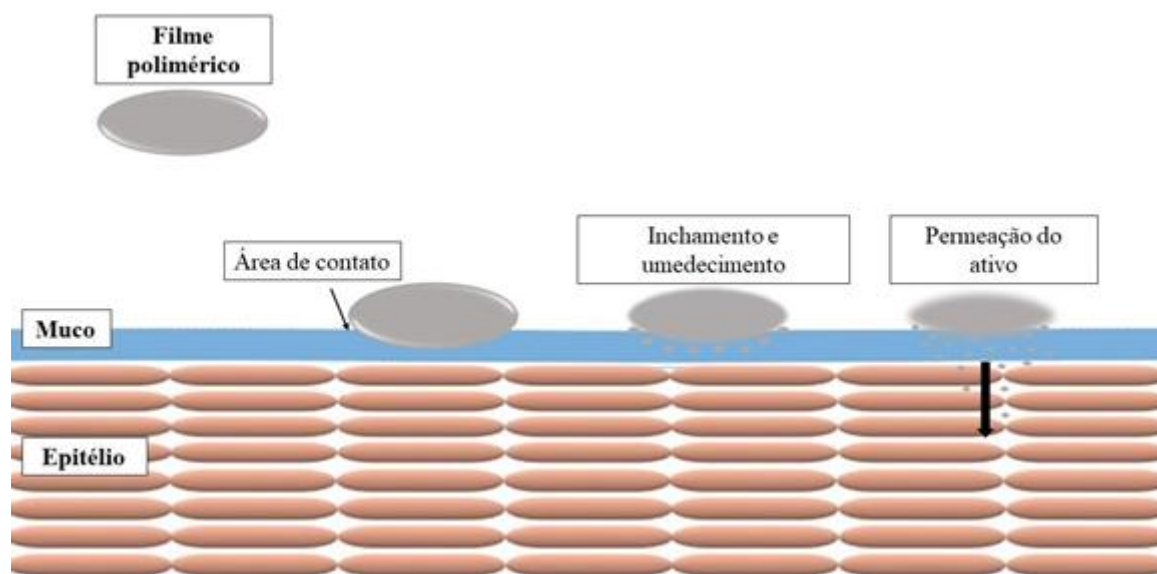
goma *k*-carragenina, xantana e gelana para aplicação cutânea e engenharia tecidual, com o intuito de estudar a sinergia entre as três gomas (BALASUBRAMANIAN; KIM; LEE, 2018). Propriedades mecânicas como força de tensão e porcentagem de alongamento foram avaliadas por uma máquina de ensaios universais. Os autores relatam que tais propriedades foram influenciadas pela interação e compatibilidade entre os polímeros, nos quais filmes mais frágeis (com menor porcentagem de alongamento) correspondiam a forças de interação baixa entre os componentes da blenda. Em geral, concentrações diferentes dos polímeros foram utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas do filme, dependendo da interação molecular de seus componentes.

Outra avaliação importante é a morfologia de superfície do filme, que deve ser homogênea e contínua a fim de garantir uma distribuição uniforme da substância ativa na matriz polimérica (MORALES; MCCONVILLE, 2011). A secagem do filme, considerada etapa crítica do processo de produção, pode contribuir para a formação de agregados devido às forças intermoleculares, de tal forma que o filme fique com uma superfície rugosa e indesejada (KARKI et al., 2016). Técnicas como microscopia óptica, de varredura e de transmissão permitem que características como a textura da superfície (lisa ou áspera), espessura e distribuição de partículas e ativos (agregados ou espalhados) sejam observadas (NAIR et al., 2013).

Também é necessário avaliar a adesão, que consiste em um processo que pode ser definido pela fixação de uma superfície à outra (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Quando essa adesão ocorre entre um tecido biológico e uma superfície sintética, é denominada de bioadesão. Mais especificamente, se esse tecido biológico é uma mucosa, o termo utilizado é “mucoadesão” (MANSURI et al., 2016). O muco é uma secreção viscosa e aderente que tem função lubrificante, hidratante e protetora, composto majoritariamente por água e mucina (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Além disso, essa substância viscoelástica também possui lipídios, proteínas e mucopolissacarídeos, sendo encontrado em diferentes cavidades úmidas do organismo, como a oral, nasal e vaginal (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). A mucoadesão representa o grau de interação entre o polímero e o epitélio da mucosa, desempenhando um papel fundamental na efetividade da administração de fármacos (NAIR et al., 2013). Existem diversas teorias que buscam explicar os mecanismos pelos quais ocorrem a interação entre a interface da formulação e o muco, estudando as propriedades que os afetam. São elas as teorias da (1) molhabilidade; (2) adsorção; (3) eletrônica; (4) fratura; (5) intertravamento por difusão e (6) teoria mecânica (MANSURI et al., 2016). De todo modo, o

mecanismo básico da mucoadesão envolve o contato íntimo entre o material bioadesivo e a membrana (onde ocorre o processo de inchamento ou umedecimento da formulação em estudo), e a interação do material bioadesivo com o tecido ou a superfície do muco (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). A **figura 3** apresenta esse mecanismo para filmes poliméricos.

**Figura 3.** Mecanismo básico de mucoadesão.

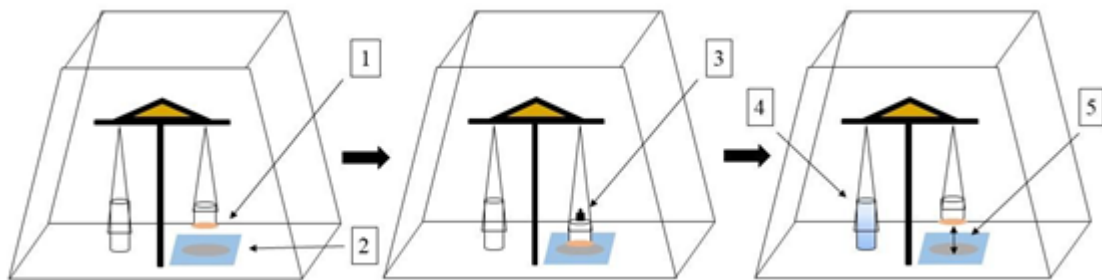


Fonte: Próprio Autor.

A capacidade mucoadesiva de filmes poliméricos *in vitro* pode ser determinada através do trabalho ou da força máxima necessária para separar o filme da superfície biológica em estudo. Em geral, os equipamentos e aparatos utilizados para essa avaliação estimam quali ou quantitativamente a força externa necessária para separar a formulação da membrana biológica (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; DI PRIMA; CONIGLIARO; DE CARO, 2019). A medida mecânica da força de mucoadesão é baseada em parâmetros como estresse de cisalhamento, força de retirada, força de tensão e tempo de separação, e os métodos utilizados para obtenção de tais parâmetros são escolhidos de acordo com sua aplicabilidade e reprodutibilidade (NAIR et al., 2013). Um dos métodos descritos na literatura é o da balança de dois pratos modificado (GUPTA; GARG; KHAR, 1992), como mostra a **figura 4**. A configuração do aparato possui diferentes descrições, mas resumidamente, o material biológico é fixado na parte final de uma tampa de plástico, enquanto o filme é alocado em uma placa de Petri embaixo da tampa (podendo ser umedecido ou não). Ambos são colocados em contato por um tempo determinado e uma força é aplicada, geralmente com o auxílio de um peso de balança

com valor padrão. Na sequência, o peso é retirado e um recipiente fixado no outro lado da balança é gradualmente preenchido com água em uma velocidade constante. O volume de água necessário para separar as duas superfícies corresponde à força de mucoadesão (KALYANWAT; SHRIVASTAVA; PATHAK, 2016; S. PENDEKAL; K. TEGGINAMAT, 2012).

**Figura 4.** Balança analítica modificada para aparato de mucoadesão. (1) membrana biológica; (2) filme polimérico; (3) peso; (4) água; (5) momento do desprendimento.



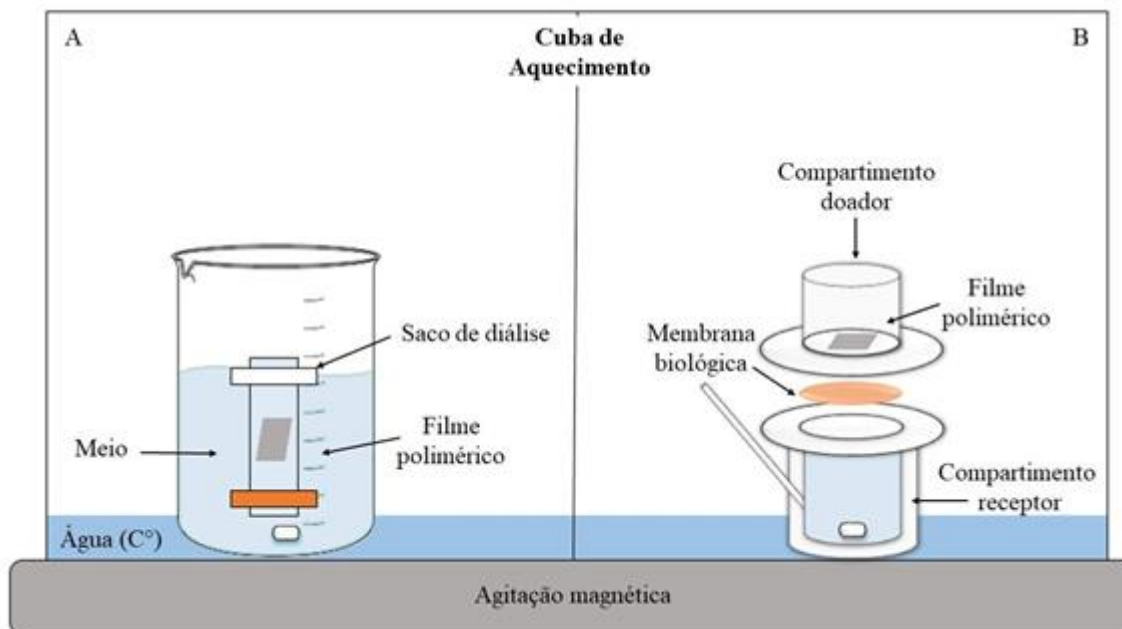
Fonte: Próprio Autor.

Em relação às avaliações qualitativas, o teste do polegar é um método muito conhecido que fornece uma inferência preliminar da força de adesão, sendo utilizado como ferramenta inicial no desenvolvimento de filmes bioadesivos (MINGHETTI; CILURZO; CASIRAGHI, 2004; MUSAZZI et al., 2018). Neste, o polegar é pressionado contra o filme durante um período de tempo e a dificuldade de remoção deste contato corresponde a medida da bioadesividade, que é mensurada em uma escala pré-determinada de valores. O tempo de contato e a pressão aplicada podem ser modificados, permitindo a avaliação semiquantitativa da facilidade, rapidez e força com as quais o filme é capaz de se aderir ao polegar. Geralmente atribui-se uma pontuação correspondente a cada nível dessas características (MUSAZZI et al., 2018).

A liberação e permeação de ativos também são requisitos importantes no desenvolvimento de filmes poliméricos. Os estudos de liberação determinam a entrega cumulativa da substância ativa ao longo de determinado período de tempo, enquanto a avaliação da permeação permite compreender o perfil de disposição de compostos através de diferentes camadas do tecido biológico alvo e possível absorção sistêmica (NAIR et al, 2013). O experimento de liberação *in vitro* para filmes não possui metodologia padronizada, mas sim adaptável, onde técnicas que utilizem aparatos de dissolução, saco de diálise e células de Franz podem ser empregadas dependendo da finalidade e características da formulação (LI et al.,

2018; NAIR et al., 2013; PRAJAPATI et al., 2018). A **figura 5** apresenta a configuração da liberação em saco de diálise e permeação em células de Franz.

**Figura 5.** Ensaios *in vitro*: (A) liberação em saco de diálise; (B) permeação em célula de Franz.



Fonte: Próprio Autor.

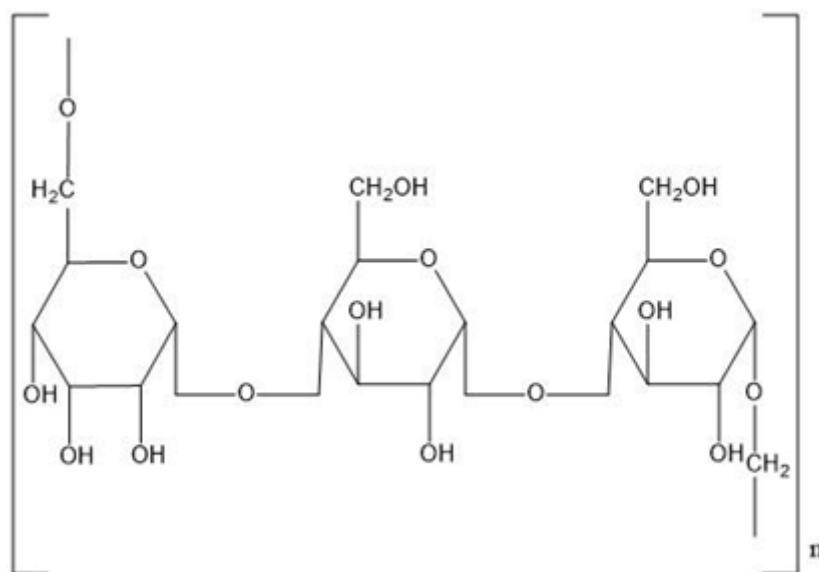
A membrana de diálise é o método mais versátil e conhecido para avaliar a liberação de ativos de formas farmacêuticas (D'SOUZA, 2014). Neste método, a formulação é colocada dentro de uma membrana de porosidade conhecida onde o meio escolhido depende da via de administração pretendida, o qual é geralmente composto por um tampão de pH específico, mantido sob aquecimento e agitação constantes (D'SOUZA, 2014; NAIR et al., 2013). A versatilidade do método permite que alíquotas do meio sejam facilmente obtidas em intervalos de tempo pré-determinados, e a literatura relata diversas modificações que podem ser realizadas na metodologia, em termos de diferença na configuração, tamanho e volume do béquer, porosidade da membrana, temperatura e pH do meio utilizado, entre outros (DIXIT; PUTHLI, 2009; MORALES; MCCONVILLE, 2011; SHESHALA et al., 2019). Já a permeação pode ser realizada em células de Franz, sendo um dos métodos mais descritos para este ensaio. O sistema é constituído por um meio doador (onde o filme é colocado) e um meio receptor (composto geralmente por tampão de pH específico dependente da vida de administração) (KRAISIT et al., 2018). A membrana biológica (pele ou mucosas) é acoplada ao centro do dispositivo de Franz em contato com o filme, sendo mantida sob agitação e posteriormente tratada para extração da substância ativa e sua quantificação (CHANDRA et al., 2018).



### 4.1.3 Composição e aplicações

Os principais materiais formadores de filmes são os polímeros (de origem natural ou sintética), proteínas, resinas, e lipídios (HAN, 2013). Polissacarídeos são polímeros de alta carga molecular, formados por monossacarídeos que possuem diferentes grupos funcionais. Devido às suas propriedades únicas, são extensivamente utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Deste modo, constituem a base da formulação de filmes e devem ser não tóxicos, não irritantes e com determinado grau de pureza (KOLA; KUMAR, 2013). Diferentes tipos de polímeros se encontram disponíveis para a produção de filmes, sendo os mais comumente usados: hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (CHAN et al., 2016; LAI et al., 2018), carboximetilcelulose (LAFFLEUR; ATAI, 2017); álcool polivinílico (PVA) (VOSS et al., 2018a; ZHANG et al., 2015); Pullulan (PUL) (HORINAKA; HASHIMOTO; TAKIGAWA, 2018; REZAEI; GANJI, 2018; TROVATTI et al., 2012), 2012); quitosana (BARTKOWIAK et al., 2018; LI et al., 2017); alginato de sódio (PEREIRA et al., 2014); goma carragenina (ALVES; COSTA; COELHO, 2010; SOGUT et al., 2019); goma xantana (DAWABA et al., 2018); goma gelana (JALIL et al., 2019; PAOLICELLI et al., 2018) e gelatina (ABRUZZO et al., 2017; CASTRO et al., 2017; TEJADA et al., 2017). Estas substâncias podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação, a fim de obter propriedades específicas que corroborem com a aplicação do filme produzido.

Em relação aos polissacarídeos, um dos polímeros mais utilizados na produção de filmes é o PUL, que foi obtido pela primeira vez em 1938 por Baur, através da fermentação do fungo *Aureobasidium Pullulan* (CAROLAN; CATLEY; MCDUGAL, 1983; K.R.; PONNUSAMI, 2017). Caracteriza-se por um polissacarídeo não iônico e linear, composto por unidades de maltotriose, composta por 3 unidades de glicose ligadas umas às outras por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). Cada unidade de maltotriose está unida a outras por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (**Figura 6**). Por causa de sua estrutura molecular, é muito solúvel em água, mesmo em altas concentrações (HORINAKA; HASHIMOTO; TAKIGAWA, 2018). A tabela 1 apresenta trabalhos nos quais filmes poliméricos foram desenvolvidos com o PUL como agente filmógeno.

**Figura 6.** Estrutura química do Pullulan.

Fonte: Próprio Autor – elaborado no software ChemDraw.

**Tabela 1.** Estudos que demonstram o PUL como agente formador de filme, sozinho ou em combinação com outros polímeros.

Polímeros	Plastificantes	Objetivos	Referências
PUL e ácido hialurônico	NA	Filmes para cicatrização de feridas	(LI et al., 2018)
PUL	PEG 400	Filmes orais de zolmitriptano para o tratamento da enxaqueca	(PRAJAPATI et al., 2018)
PUL, HPMC, goma okra e goma moringa	PEG 400	Filme orodispersível de citalopram a partir de uma blenda de polímeros sintéticos e naturais	(SHAHZAD et al., 2020)
PUL, alginato e carboximetilcelulose	Glicerol	Filme comestível para embalagem de alimentos a partir de uma blenda polimérica	(TONG; XIAO; LIM, 2008)
PUL e celulose nanofibrilada	Glicerol	Melhora das propriedades mecânicas e térmicas de um filme para embalagens e eletrônicos	(TROVATTI et al., 2012)
PUL	Glicerol, Vitamina E TPGS e triacetina	Melhora das propriedades mecânicas de um filme orodispersível com aplicação farmacêutica	(VUDDANDA et al., 2017)
PUL, quitosana, carboximetilcelulose	Glicerol	Interação e compatibilidade entre polissacarídeos em um filme comestível para embalagem de alimentos	(WU et al., 2013)
Carboximetil-gellana e PUL	Glicerol	Filmes comestíveis para embalagem de alimentos com ótimas propriedades mecânicas e de barreira	(ZHU; SHENG; TONG, 2014)

**Abreviações:** TPGS - Succinato de D- $\alpha$ -Tocoferil polietilenoglicol 1000; NA – não aplicável.

Na **tabela 1** é possível observar que muitos estudos abordam a aplicação de filmes de PUL na indústria alimentícia como embalagem comestível de alimentos. Entretanto, são

escassos os trabalhos que abordam sua aplicação farmacêutica e biomédica e, desta forma, é interessante destacar alguns deles. Prajapati e colaboradores (2018) desenvolveram filmes de PUL em concentração de 4% para a administração oral de zolmitriptano (fármaco antiemético). Os resultados obtidos indicaram que os filmes foram compatíveis com a mucosa oral, palatáveis e de fácil administração. O aumento da concentração de plastificante (PEG 400 em concentração de 2%) aumentou o tempo de desintegração *in vivo* do filme (16-24 segundos), que foi considerado rápido e adequado, visto que aprimora a biodisponibilidade do fármaco para o tratamento da enxaqueca. Já Shahzad e colaboradores (2020) desenvolveram filmes orodispersíveis de citalopram formados por uma combinação de polímeros sintéticos e naturais. A goma okra foi testada em aproximadamente 1,3%; a moringa em 4%, o HPMC em uma faixa de concentração de 1,2% - 3,6% e o PUL em 4%. Os filmes desenvolvidos foram avaliados quanto a características físico-químicas e propriedades mecânicas e, como resultado, apresentaram estabilidade térmica e tempo de desintegração menor do que 30 segundos (adequados para filmes orodispersíveis).

Em relação a filmes para administração cutânea, Li e colaboradores (2018) desenvolveram filmes de PUL copolimerizado com ácido hialurônico, em concentração de 1,8%, para cicatrização de feridas. Os filmes obtidos não apresentaram citotoxicidade *in vitro*, foram biocompatíveis, não irritantes e obtiveram ação cicatrizante *in vivo*, sendo considerados adequados e seguros para aplicação terapêutica na pele.

Filmes poliméricos devem possuir características mecânicas, elásticas e flexibilidade adequadas, e tais propriedades geralmente são promovidas pela adição de substâncias plastificantes à formulação (LIEW; TAN; PEH, 2014). Plastificantes são um grupo de compostos auxiliares que tem como objetivo melhorar a performance de diferentes formas farmacêuticas. São materiais orgânicos inertes que podem modificar o perfil de liberação de fármacos, melhorar propriedades mecânicas e físicas, bem como as características sensoriais de produtos farmacêuticos (KARKI et al., 2016). Quando incorporados em uma matriz polimérica, aumentam a flexibilidade do polímero através da separação molecular, por interferir em ligações de hidrogênio, sendo classificados como hidrofílicos ou lipofílicos, poliméricos ou não poliméricos e líquidos ou sólidos (A. EL-GENDY, 2012). Em relação aos filmes, os plastificantes devem ser compatíveis com o polímero de escolha, sendo substâncias como PEG 200 e 400, sorbitol e glicerol alguns dos mais utilizados (LIEW; TAN; PEH, 2014; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001). A concentração de plastificantes utilizados no desenvolvimento de um filme polimérico é de extrema importância pois determina e influencia

diretamente em suas características físicas e nas propriedades mecânicas. O glicerol e o sorbitol já foram avaliados como plastificantes para filmes biodegradáveis de amido de mandioca (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007), onde verificou-se que em baixas concentrações ( $\leq 15\%$ ) o efeito dessa composição foi antiplastificante, na qual os filmes apresentaram baixa capacidade de hidratação e pouca flexibilidade pois o plastificante não está em concentração suficiente para criar mobilidade molecular. Em concentrações acima de 15%, os filmes apresentaram os efeitos esperados de plastificação. Já Tian e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do sorbitol (0, 1, 3, 5, 8 %) como plastificante em filmes de PVA. Os resultados obtidos indicaram que a presença do sorbitol diminuiu os níveis de cristalinidade do PVA, facilitando o processo de fusão dos componentes na dispersão polimérica. Ainda, a capacidade de retenção de água e a porcentagem de alongamento aumentaram proporcionalmente com a concentração do sorbitol, e a força de tensão e módulo de elasticidade diminuíram, demonstrando que o sorbitol possui um efeito plastificante adequado.

Em 2018, Sun e colaboradores também avaliaram as propriedades mecânicas de filmes de *k*-carragenina e HPMC (80:20) testando diferentes concentrações de plastificantes como glicerol, sorbitol e PEG-400 (40, 50 e 60%). Este estudo evidenciou a influência direta exercida pelos plastificantes sobre as propriedades mecânicas, sobre as quais os autores descreveram sua capacidade de enfraquecer as forças intramoleculares e intermoleculares entre polímeros, formando novas ligações de hidrogênio e aumentando a distância entre suas cadeias. O aumento de espaço e movimento para as cadeias poliméricas tornou os filmes mais flexíveis, aumentando a porcentagem de alongamento e reduzindo os valores de força de tensão.

Em relação à aplicação dos filmes, a literatura relata uma vasta possibilidade de vias de administração, como a via oral (LAI et al., 2018; PRAJAPATI et al., 2018), bucal (ABRUZZO et al., 2012; AVACHAT; GUJAR; WAGH, 2013; KRAISIT et al., 2018; LI et al., 2017; MORALES; MCCONVILLE, 2011), cutânea (ALVES et al., 2016; FAJARDO et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; PIRES et al., 2018; VOSS et al., 2018b; ZHANG et al., 2015), ocular (CHAN et al., 2016), vaginal (BARTKOWIAK et al., 2018; CUNHA-REIS et al., 2016; DOBARIA; BADHAN; MASHRU, 2009; GRAMMEN et al., 2014; YOO; ACHARYA; LEE, 2009), inserção cirúrgica (SONVICO et al., 2018), entre outros. Neste trabalho, iremos abordar a aplicação de filmes poliméricos pela via cutânea e pela via vaginal.

## 4.2 VIA CUTÂNEA

### 4.2.1 Características da pele e filmes poliméricos para aplicação cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano, constituindo até 15% do peso corporal de um adulto (KANITAKIS, 2002). É a barreira de proteção física e química do corpo contra agentes externos, prevenindo a perda de água e promovendo a regulação térmica (PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016). Sua composição apresenta três principais camadas: (1) epiderme (e apêndices associados, folículos pilosos e glândulas sudoríparas); (2) derme (separada da epiderme pela junção dérmica epidérmica) e (3) hipoderme (KANITAKIS, 2002).

Nas últimas décadas, o interesse da indústria farmacêutica pela administração cutânea de ativos emergiu como uma alternativa promissora à administração oral e sistêmica (IQBAL; DILNAWAZ, 2019). Os principais motivos do aumento de demanda na pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas para essa via são crescimento da incidência de casos de doenças de pele e a estagnação do mercado das formas farmacêuticas orais (KALPANA et al., 2010). Existem dois tipos diferentes de administração cutânea, a dérmica (aplicação na superfície da pele com ação local do fármaco) e a transdérmica (transporte do fármaco pelas camadas da pele para absorção sistêmica) (BENSON et al., 2019).

A aplicação cutânea de formas farmacêuticas oferece diversas vantagens frente às outras vias, como uma aplicação conveniente e sem dor, aumento da adesão do paciente e da eficácia para fármacos com baixa biodisponibilidade oral, além da possibilidade de evitar o metabolismo de primeira passagem e diminuir efeitos adversos sistêmicos (GOYAL et al., 2016; IQBAL; ALI; BABOOTA, 2018). O sucesso e a eficácia no tratamento de doenças cutâneas dependem da forma farmacêutica escolhida. O veículo é o responsável por características como a consistência do produto, propriedades oclusivas e penetração da substância ativa (ESPOSITO et al., 2019). Desta forma, formulações semissólidas como pomadas, cremes, géis, óleos e pastas podem ser utilizadas. Entretanto, tais formulações são geralmente associadas a diversas limitações, que incluem baixa capacidade de permeação de ativos e efeitos adversos locais (KULKARNI; SHAW, 2016). Por essas razões, o desenvolvimento de novas formulações é imprescindível.

Os filmes poliméricos se destacam como uma nova abordagem para a via cutânea por possuírem fácil aplicação, flexibilidade e sensorial agradável, podendo prevenir efeitos indesejados e agir no local de ação (KARKI et al., 2016). É interessante salientar que os

adesivos transdérmicos convencionais, cremes e pomadas podem causar dor e desconforto durante o processo de cicatrização devido ao elevado potencial oclusivo, além do desconforto causado pela retirada de curativos. Já os filmes poliméricos podem possuir diferentes níveis de porosidade, permitindo a transpiração cutânea e a eficácia do processo de cicatrização (GUO et al., 2011).

A literatura científica relata o uso de filmes e membranas ativas no tratamento de diversas condições patológicas, tais quais: cicatrização de lesões (LI et al., 2018; PIRES et al., 2018), queimaduras (BAOYONG et al., 2010; PEREIRA et al., 2014), úlceras diabéticas (HUSSAIN et al., 2017) e outras injúrias acometidas na pele, os quais ressaltam sua capacidade de reepitelização, reconstrução da pele, angiogênese, atividade antibacteriana (FAJARDO et al., 2013; ZHANG et al., 2015) e melhora no processo de cura (MOFAZZAL JAHROMI et al., 2018). Dentre as doenças acometidas na pele que podem ser tratadas com esse tipo de formulação, está a dermatite atópica.

#### **4.2.2 Dermatite atópica**

A dermatite atópica, também conhecida como eczema atópico, é a doença inflamatória crônica que mais comumente acomete a pele, sendo caracterizada por lesões pruríticas, edema, vermelhidão, escoriação, pápulas e nódulos subcutâneos (THOMSEN, 2014). Ela faz parte da tríade de sintomas descritos como atopia (asma, rinite alérgica e dermatite), associada à resposta alérgica para pequenas quantidades de epítomos encontradas no ambiente, como pólen, poeira e alergênicos alimentares (KAPUR; WATSON; CARR, 2018). Estudos sugerem que a dermatite atópica se origina de um defeito de barreira na pele, que facilita o desenvolvimento de condições atópicas, sendo suas manifestações iniciais mais comuns na infância. A Organização Mundial de Alergias (2018) afirma que até 30% das crianças e 10% dos adultos possuem dermatite atópica no mundo, caracterizando um sério problema socioeconômico e de saúde.

**Figura 7.** Imagem de uma das formas de manifestação da dermatite atópica.



Fonte: Navarro-Triviño; Cassini Gómez de Cádiz; Ruiz-Villaverde, 2020.

Por se tratar de uma doença sem cura, o manejo clínico da dermatite atópica se baseia na (1) informação e educação dos pacientes a respeito da condição patológica e do uso apropriado das terapias disponíveis; (2) no cuidado com a pele, com banhos regulares e o uso de hidratantes e, por fim, (3) terapias farmacológicas (KAPUR; WATSON; CARR, 2018). Dentro das abordagens medicamentosas, os corticosteroides tópicos constituem a primeira linha de escolha terapêutica, tendo como principais representantes cremes, géis e pomadas de betametasona, hidrocortisona, desonida, entre outros (THOMSEN, 2014). Os corticosteroides são escolhidos de acordo com a classe, sendo leves (classe I), moderados (classe II), fortes (classe III) e muito fortes (classe IV), e dependem do grau de lesão de cada indivíduo. Atuam principalmente na redução da inflamação aguda e crônica, prevenindo a erupção de novas lesões, controle de edema e prurido (THOMSEN, 2014). Entretanto, o tratamento tópico com corticosteroides apresenta diversos efeitos adversos locais e sistêmicos, como atrofia da pele, surgimento de microvasos e estrias, supressão adrenal e aumento do risco de infecções (DE LA O-ESCAMILLA; SIDBURY, 2020). Desta forma, novas terapias vêm sendo estudadas buscando contornar as limitações do tratamento da dermatite.

Modelos animais têm sido utilizados ao longo dos anos a fim de compreender os diferentes mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dermatite atópica, dividindo-se em três categorias principais: (I) modelos consanguíneos, (II) camundongos geneticamente modificados e (III) modelos induzidos pela aplicação tópica de substâncias irritantes (KIM; KOBAYASHI; NAGAO, 2019). Nos modelos induzidos por substâncias alergênicas,

moléculas irritantes são utilizadas para provocar uma resposta do sistema imune após exposição, resultando em hipersensibilidade de contato e eczemas (KAPLAN; IGYÁRTÓ; GASPARI, 2012). Dentre as substâncias irritantes utilizadas nos modelos de indução tópica, está o 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). O modelo do DNBCB é amplamente descrito na literatura, sendo escolhido principalmente por permitir um controle da dose da substância utilizada para indução e funcionar para uma grande variedade de roedores (CHAN et al., 2013; CHEN et al., 2017).

Filmes poliméricos já foram avaliados frente ao modelo do DNBCB, como descrito por Alves e colaboradores (2016), que desenvolveram filmes de PVA, quitosana e tutano nos quais parâmetros como coceira, severidade das lesões e ensaios bioquímicos foram realizados, obtendo resultados promissores apenas com o biomaterial. Mais tarde, Voss e colaboradores (2018) incorporaram um composto orgânico de selênio derivado da quinolona (4-PSQ) neste mesmo filme e avaliaram suas propriedades antioxidantes no tratamento da dermatite atópica, no mesmo modelo animal. Os resultados demonstraram melhora terapêutica similar ou maior que a dexametasona (controle positivo), comprovando a eficácia do 4-PSQ. Em nosso trabalho, o modelo animal de DNBCB foi utilizado para avaliar os filmes desenvolvidos frente a eficácia no tratamento da dermatite atópica.

### 4.3 VIA VAGINAL

#### 4.3.1 Características da via e filmes poliméricos de aplicação vaginal

A via vaginal é comumente usada para a administração local de ativos, apresentando diversas vantagens tais como: evitar o metabolismo de primeira passagem, reduzir a incidência e severidade de efeitos adversos gastrointestinais e hepáticos; minimizar desconforto e inconveniência como observado nas vias parenterais e aumentar a possibilidade de autoadministração e retirada de formas farmacêuticas, promovendo liberdade e conforto para o paciente (BALOGLU et al., 2009). Fisiologicamente, as paredes vaginais são compostas por um epitélio rugoso recoberto por muco cervicovaginal, que funciona como uma barreira física contra agentes infecciosos e possui impacto considerável na penetração e distribuição de fármacos (KATZ; YUAN; GAO, 2015). O muco é composto por enzimas, outras proteínas, carboidratos, aminoácidos, álcoois, glicoproteínas especializadas (mucinas) e uma microbiota,



sendo influenciado por mudanças de pH, níveis hormonais, métodos contraceptivos, idade e tratamentos antimicrobianos (ENSIGN; CONE; HANES, 2014).

Devido à pressão intra-abdominal que colapsa o tecido rugoso, bem como a grande área de superfície e a tortuosidade do canal vaginal, atingir uma distribuição adequada da substância ativa na administração de uma formulação pode ser desafiador, e depende de inúmeros fatores (ENSIGN; CONE; HANES, 2014). Desta forma, visando a administração vaginal de fármacos, o veículo é um dos principais objetos de estudo, sendo necessário que atenda corretamente as características anatômicas e fisiológicas da vagina (BALOGLU et al, 2009).

Tradicionalmente, soluções, emulsões, suspensões, comprimidos vaginais, supositórios e formulações semissólidas são as formas farmacêuticas mais utilizadas nesta via (BALOGLU et al, 2009). Entretanto, essas formas convencionais apresentam problemas, como por exemplo, baixo tempo de retenção no local de ação, desconforto na aplicação, vazamento e falta de exatidão de dose, devido à distribuição não uniforme durante aplicação (FRIEND, 2010). Portanto, filmes poliméricos vêm se destacando como alternativa às formas farmacêuticas convencionais de aplicação vaginal. Filmes possuem um formato que propicia a aplicação (geralmente em tiras quadradas ou retangulares) com uma superfície homogênea e macia, dobrável e de fácil inserção no canal vaginal (MACHADO et al., 2015). Usualmente, são compostos por polímeros bioadesivos solúveis em água que dispersam ou dissolvem uma vez colocado em contato com a cavidade e o muco vaginal, liberando a substância ativa rapidamente e promovendo a aderência da formulação no local de ação (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; IQBAL; DILNAWAZ, 2019).

A literatura já descreve o desenvolvimento de filmes poliméricos de aplicação vaginal para o tratamento e profilaxia de diversas doenças, como a síndrome da imunodeficiência adquirida, entre outras doenças virais sexualmente transmissíveis (GRAMMEN et al., 2014; NOTARIO-PÉREZ et al., 2019; REGEV et al., 2019), disfunções sexuais e hormonais (YOO; ACHARYA; LEE, 2009) e, principalmente, infecções fúngicas e bacterianas (CALVO et al., 2019; DOBARIA; BADHAN; MASHRU, 2009). Dentre as principais infecções fúngicas que acometem o trato vaginal, está a candidíase.

#### **4.3.2 Candidíase: definição, características clínicas e tratamentos**

A *Candida spp.* é a causa mais comum de infecções fúngicas que acometem as mucosas do organismo de maneira invasiva e não-invasiva, sendo a *Candida albicans* o agente mais

comum dentro da espécie. Este fungo se caracteriza como dimórfico e comensal, capaz de colonizar a pele e os tratos gastrointestinal e reprodutivo. O trato reprodutor é um dos sistemas mais afetados, sendo a CVV a segunda maior causa de vaginose bacteriana, diagnosticada em até 40% dos casos de atendimento a mulheres com desconforto vaginal (ACHKAR; FRIES, 2010).

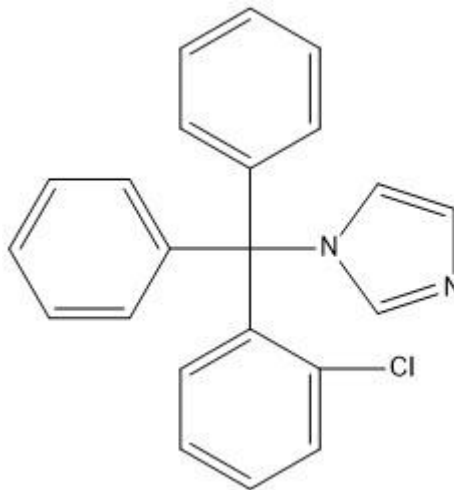
Esse fungo faz parte da colonização natural da mucosa vaginal, não sendo associado a condições patológicas em mulheres imunocompetentes. Uma vez que existem sintomas de inflamação sem a presença de outro agente etiológico infectante, o caso é considerado positivo para CVV (CHATZIVASILEIOU; VYZANTIADIS, 2019). Os principais sintomas são irritação e aumento de fluidos, sensação de queimação, coceira e inchaço na região vaginal (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, 2015). O tratamento se dá geralmente com o uso tópico de cremes e pomadas, bem como a ingestão oral de fármacos como o CTZ, fluconazol, itraconazol e nistatina (WORKOWSKI; BOLAN, 2015). Os azóis são uma classe de fármacos que atuam na inibição da síntese do ergosterol. Estes fármacos atuam (1) na inibição de enzimas associadas ao citocromo p450, o que causa bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol e desestabiliza a membrana fúngica, alterando sua permeabilidade e (2) na produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio dentro da célula fúngica, danificando a estrutura de suas organelas (MOREIRA, 2010).

A literatura relata alguns trabalhos utilizando fármacos desta classe incorporados a filmes poliméricos. Dobaria e colaboradores (2009) desenvolveram filmes de Itraconazol utilizando hidroxipropilcelulose (25%) como polímero e PEG 400 (12,5%) como plastificante pelo método de evaporação do solvente. Como resultado, os filmes obtidos foram bioadesivos, apresentaram características sensoriais e organolépticas apropriadas e foram compatíveis com o epitélio e microbiota vaginal. Já em 2019, Calvo e colaboradores desenvolveram filmes de quitosana e HPMC contendo tioconazol, além de testar a eficácia *in vitro* contra *Candida albicans*, bem como sua citotoxicidade. Como conclusão, os filmes foram considerados homogêneos e bioadesivos, com propriedades mecânicas adequadas. Os estudos *in vitro* demonstraram que os filmes foram mais eficazes que a forma livre e do que a formulação tradicional de óvulo de tioconazol, e apesar de apresentarem certo grau de citotoxicidade, os filmes compostos apenas por quitosana foram hemocompatíveis. Em geral, a blenda de ambos os polímeros apresentou características mais promissoras para aplicação no tratamento da CVV.

Sendo um dos fármacos mais utilizados no tratamento da CVV, o CTZ é o alvo de nosso estudo (**Figura 8**). A literatura apresenta poucos trabalhos abordando filmes poliméricos contendo CTZ. Um mesmo grupo de pesquisa desenvolveu filmes bioadesivos de

hidroxipropilcelulose, óxido de polietileno e policarbofila com CTZ pelo método de extrusão a quente com o objetivo de tratar a candidíase oral (PRODDUTURI et al., 2007; REPKA; PRODDUTURI; STODGHILL, 2003). Como resultados, os autores apontam que a extrusão foi uma técnica viável para a obtenção dos filmes, que foram considerados estáveis, bioadesivos e uniformes. Em 2015, um estudo comparativo foi realizado com o mesmo filme polimérico contendo CTZ ou nistatina, onde a atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans* foi avaliada. Como conclusão, os agentes antifúngicos diminuíram a adesão celular e apresentaram atividade antifúngica efetiva contra a cândida, sendo promissores para a administração como filmes adesivos antifúngicos dentais (PARK et al., 2015)

**Figura 8.** Estrutura química do CTZ.



Fonte: Próprio Autor – elaborado no software ChemDraw.

Por fim, em 2016, filmes bioadesivos de CTZ foram desenvolvidos objetivando o tratamento da CVV (MISHRA; JOSHI; MEHTA, 2016). A hidroxipropilcelulose e alginato de sódio foram usados como polímeros, enquanto o PEG 400 e o propilenoglicol foram testados como plastificantes. Como resultados, os filmes foram bioadesivos e permitiram a difusão de mais de 70% do fármaco em até 6 horas, apresentando inibição do crescimento de *Candida albicans* sem interferir na colonização de *Lactobacillus* presentes na microbiota vaginal.

Dentro do contexto apresentado, é importante ressaltar que a administração de fármacos tanto para via cutânea como para via vaginal ainda é um desafio com limitações a serem contornadas. A pele é uma barreira de proteção efetiva que impede o acesso de moléculas e microrganismos externos e a perda excessiva de água (NASTITI et al., 2017). Compostos que

difundem através do estrato córneo de maneira bem-sucedida geralmente são lipofílicos e possuem baixo peso molecular, dificultando demais substâncias ativas que não se adequam a tais critérios de atingir partes mais profundas da pele (BENSON et al., 2019). Conforme mencionado anteriormente, os principais obstáculos encontrados para a administração de fármacos pela via vaginal são a permeação no muco e adesão da formulação ao epitélio, bem como o tempo de residência da formulação no local de ação, que pode ser prejudicado pelo fluxo natural do trato vaginal (ENSIGN, CONE; HANES, 2014). Desta forma, sistemas nanoestruturados vem sendo investigados a fim de contornar esses problemas (GOYAL et al., 2016; NASTITI et al., 2017; PROW et al., 2011).

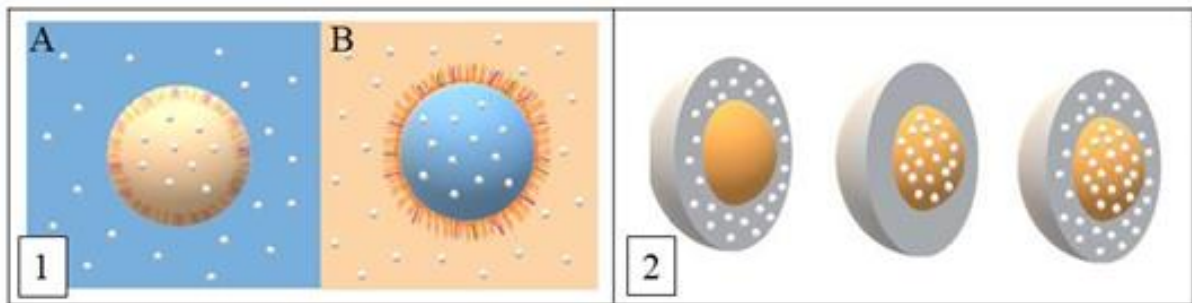
#### 4.4 NANOTECNOLOGIA

O termo “nanotecnologia farmacêutica” compreende um ramo multidisciplinar emergente em crescimento exponencial, com produtos já sendo comercializados. A nanotecnologia é uma das tecnologias-chaves do século 21, possuindo importantes implicações no desenvolvimento de novos procedimentos e sistemas para diagnóstico e tratamento de diversas doenças (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018). Enquanto as formas farmacêuticas convencionais exibem baixa biodistribuição, eficácia limitada, efeitos adversos, degradação química e falta de seletividade, produtos farmacêuticos baseados em nanotecnologia são constantemente propostos na literatura pois oferecem vantagens em relação aos medicamentos convencionais, as quais são atribuídas principalmente ao seu pequeno tamanho estrutural e comportamento molecular ( $> 1$  um) (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; SHESHALA et al., 2019). Tais vantagens podem ser resumidas nos seguintes aspectos: (1) aumento da área de superfície de contato; (2) capacidade de direcionamento para um alvo terapêutico; (3) aumento da solubilidade aparente de ativos; (4) aumento da biodisponibilidade de fármacos; (5) diminuição da dose; (6) início de ação terapêutica mais rápido e prolongado, e, por consequência, (7) aumento da adesão do paciente (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018).

Termos como nanofármacos ou materiais nanoestruturados têm sido empregados para descrever esses sistemas que incluem micelas, nanotubos de carbono, nanopartículas poliméricas, metálicas e lipídicas, nanocápsulas, nanogéis, nanofibras, nanoemulsões, entre outros (DAUDT et al., 2013) (**Figura 9**). Diversos trabalhos já relataram o preparo de filmes poliméricos contendo diferentes tipos de nanocarreadores, como por exemplo nanopartículas lipídicas sólidas (GARCÍA-BETANZOS et al., 2016), nanoesferas (BHAKAY et al., 2016;

CHANDRA et al., 2018; DE MOURA et al., 2008; KRULL et al., 2016), micelas (AHMED et al., 2020), carreadores lipídicos nanoestruturados (MALGARIM CORDENONSI et al., 2019) nanoemulsões (HOSNY, 2019; NUNES et al., 2018) e nanocápsulas (CONTRI et al., 2016). O uso de filmes poliméricos contendo sistemas nanoestruturados também é descrito para diferentes vias de administração, como a vaginal (DAS NEVES et al., 2012; GU; YANG; HO, 2015; MACHADO et al., 2016; MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2018; TRAORE et al., 2018), transdérmica (KURAKULA et al., 2016), bucal (KRAISIT et al., 2018), sublingual (PATEL; SHAH, 2015) e ocular (MORSI et al., 2017).

**Figura 9.** (1A) Nanoemulsão Água/Óleo; (1B) Nanoemulsão Óleo/Água; (2) Nanocápsulas com o fármaco adsorvido na parede polimérica, dissolvido no núcleo ou ambos.



Fonte: Próprio Autor.

As nanoemulsões fazem parte dessa classe farmacêutica, sendo compostas por duas fases imiscíveis, onde uma fase interna, de tamanho nanométrico (20 - 500 nm), se encontra dispersa em uma fase externa. São estabilizadas por uma camada interfacial de emulsificantes e co-emulsificantes, possuindo uma distribuição uniforme e propriedades físico-químicas e biológicas diferentes de emulsões convencionais (RAI et al., 2018). As duas fases miscíveis geralmente são de natureza aquosa e oleosa, e são categorizadas em três tipos: óleo em água (O/A); onde a fase oleosa está dispersa em uma fase aquosa contínua, água em óleo (A/O); onde a fase aquosa está dispersa em uma fase oleosa contínua e emulsões múltiplas; onde micro domínios de fases oleosas e aquosas estão interdispersas no sistema (DING et al., 2015; MISHRA; JOSHI; MEHTA, 2016).

Estes sistemas podem ser produzidos por técnicas de emulsificação de alta e baixa energia, possuindo alta estabilidade cinética e sendo mais resistentes a fenômenos de cremagem, sedimentação e floculação em comparação com emulsões tradicionais (MAALI; MOSAVIAN, 2013; ROBERTS et al., 2017; SOLANS; SOLÉ, 2012). Desta forma, nanoemulsões são produzidas como formas farmacêuticas líquidas e sua incorporação em

filmes poliméricos é pouco descrita na literatura. Pires e colaboradores (2017) desenvolveram nanoemulsões de óleos essenciais de copaíba, melaleuca e limão e incorporaram estes sistemas em filmes de alginato de sódio para aplicação cutânea. As nanoemulsões foram avaliadas quanto a tamanho de gotícula e potencial zeta, enquanto os filmes foram avaliados frente a espessura, morfologia e permeabilidade ao vapor de água. Como resultado, os filmes produzidos com nanoemulsões de menor tamanho de gotícula apresentaram maior capacidade de retenção de água, evidenciando a influência da nanoemulsão no sistema. Os resultados da análise morfológica também evidenciaram diferenças entre os filmes com nanoemulsão, que apresentaram rugosidades e aglomerados não observados nos filmes de alginato puro. Em 2018, o mesmo grupo de pesquisa utilizou as nanoemulsões de óleo essencial de limão em filmes a base de gelatina para o uso em embalagem de alimentos, obtendo resultados igualmente promissores.

Por fim, Hosny (2019) desenvolveu nanoemulsões de mesilato de saquinavir para incorporação em filmes transdérmicos de PVA como uma alternativa à administração oral do fármaco. No estudo, o sistema foi otimizado com sucesso e a presença das nanoemulsões nos filmes foi capaz de melhorar a permeação do fármaco na pele em modelo *in vitro*. Ainda, avaliações farmacocinéticas apontaram que a concentração plasmática máxima foi mantida, criando uma base promissora para estudos pré-clínicos adicionais e confirmando a melhora da biodisponibilidade e da performance terapêutica do fármaco.

Outro sistema muito explorado na nanotecnologia no âmbito farmacêutico são as nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares compostos por um invólucro polimérico sólido ao redor de um núcleo oleoso, onde o fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou/e adsorvido à parede polimérica (DAUDT et al., 2013). As principais técnicas de preparo são a polimerização interfacial, nanoprecipitação, polimerização *in situ*, deposição interfacial do polímero pré-formado, emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação do solvente (DIMER et al., 2013). Estes sistemas apresentam características promissoras como aumento da estabilidade de fármacos instáveis à luz e ao pH (LIU et al., 2019; PEGORARO et al., 2017), diminuição da citotoxicidade de substâncias ativas (MARCHIORI et al., 2017), liberação sítio-específica (PIOTROWSKI et al., 2015), controle da liberação (MINAEI et al., 2019), entre outros. Devido às características como forma, tamanho e carga de superfície do polímero, as nanocápsulas podem facilitar a permeação de ativos por diferentes tecidos através do contato íntimo e da deposição de partículas (ROBERTS et al., 2017).

Em 2016, Contri e colaboradores desenvolveram nanocápsulas contendo apenas o óleo de rosa mosqueta como componente farmacologicamente ativo, a fim de avaliar o efeito da

nanoencapsulação na oxidação induzida por UV, bem como incorporar os sistemas em géis e filmes de quitosana para aplicação tópica. A parede polimérica foi constituída de Eudragit RS100<sup>®</sup>, e os resultados obtidos demonstraram que as nanocápsulas permitiram a incorporação do óleo em formulações de base aquosa (gel e filme), melhorando sua homogeneidade e diminuindo a variação de tamanho de gotícula. Ainda, a nanoencapsulação do óleo promoveu sua proteção frente a oxidação. Como conclusão, as formulações de gel e filmes contendo as nanocápsulas apresentaram propriedades promissoras e uma combinação de vantagens importantes para a aplicação cutânea. Estudos como esse elucidam a importância da escolha apropriada de matérias-primas na composição da fase oleosa de nanoemulsões e do núcleo de nanocápsulas, onde produtos de origem natural e sintética podem ser utilizados. Além disso, é interessante que o componente oleoso apresente rica composição em compostos farmacologicamente ativos, pois isso torna o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados ainda mais promissor para uso terapêutico. O óleo de romã é um exemplo de matéria-prima vegetal que é vastamente estudada por possuir diferentes atividades farmacológicas de potencial aplicação no manejo clínico de diversas doenças.

#### 4.4.1 Óleo de Romã

A romã (*Punica granatum*) é uma fruta pertencente à família Punicaceae, nativa do Oriente Médio. Divide-se em sementes, polpa e casca, e possui uma gama de compostos fenólicos tais como antocianinas, quercetinas, taninos e ácidos fenólicos (JARDINI; MANCINI FILHO, 2007) (**Figura 10**). Seu uso popular é conhecido e eficaz no tratamento de problemas intestinais como cólica, diarreia e colite, além de demonstrar propriedades diuréticas, vermífugas e adstringentes (NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998; WERKMAN et al., 2008).

**Figura 10.** A fruta romã. *Punica granatum*



Fonte: Próprio Autor.

Na literatura, o óleo de romã e seus componentes isolados já vem sendo abordados como uma alternativa na terapia de doenças neurodegenerativas (AL-SABAHI et al., 2017; AMRI et al., 2017, SIANO et al, 2016), esclerose múltipla (BINYAMIN et al., 2015) e isquemia de ovário (YAYLA et al., 2018) devido à sua atividade antioxidante, bem como o seu uso no tratamento da diabetes tipo 1 (ANUSREE et al., 2018), devido à ação anti-inflamatória. Ainda, principalmente devido a indução de mecanismos anti-proliferativos e pró-apoptóticos, demonstrados tanto *in vitro* como *in vivo*, a literatura relata seu potencial terapêutico contra o câncer de mama, próstata, cólon, pele, carcinoma hepatocelular, leucemia, glioblastoma, bexiga, pâncreas e pulmão (BASSIRI-JAHROMI, 2018; COSTANTINI et al., 2014; PANTH; MANANDHAR; PAUDEL, 2017). O óleo de romã possui alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados tais como ácido  $\alpha$ -linoleico, além de vitamina E e fitosteróis (DE MELO et al., 2016), mas sua atividade farmacológica é atribuída principalmente ao ácido punícico, seu componente majoritário (BEDEL et al., 2017; KHAJEBISHAK et al., 2019; SHABBIR et al., 2017). A ação anti-inflamatória do óleo de romã se dá pela inibição da atividade das enzimas ciclooxigenase (COX) 1 e 2. Já a propriedade antioxidante baseia-se na eliminação de radicais livres, o que promove atenuação de doenças cujo estresse oxidativo esteja envolvido (LANSKY; NEWMAN, 2007; SIANO et al., 2016).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa buscou estudar extensivamente o emprego do óleo de romã em formulações de base nanotecnológica e avaliar sua performance *in vitro* e *in vivo*. Em 2017, a silibinina foi associada a nanocápsulas de óleo de romã a fim de



potencializar as propriedades antioxidantes dessa substância ativa, bem como contornar seus problemas de solubilidade (MARCHIORI et al, 2017). Como resultados desse trabalho, a capacidade *scavenger in vitro* da silibinina foi evidenciada e a viabilidade celular de monócitos e linfócitos mantida nos testes de cito e genotoxicidade. As nanocápsulas também foram consideradas veículos seguros e viáveis para a silibinina e o óleo de romã. Ainda em 2017, a mesma formulação foi incorporada a hidrogéis de goma gelana para o tratamento de dano cutâneo induzido por radiação UVB *in vivo*. Os resultados indicaram que 72 h após a indução, o único hidrogel que manteve a atividade anti-inflamatória *in vivo* foi o de nanocápsulas contendo óleo de romã sem silibinina, o que corrobora com outros estudos onde a nanoencapsulação do óleo melhorou seus efeitos quando aplicado na pele.

Além de sua aplicação como agente formador de filme, o PUL também já foi descrito como agente estabilizante de sistemas nanoestruturados, formando formulações com elevada estabilidade (CHASSOT et al, 2016). Em 2015, foram desenvolvidas nanoemulsões de óleo de romã contendo cetoprofeno usando PUL como polímero emulsificante. Esta formulação melhorou a fotoestabilidade e solubilidade do fármaco modelo, além de apresentar atividade antiglioma *in vitro* superior à forma livre do ativo, sendo também adequada para a administração intravenosa (FERREIRA et al., 2015). Na sequência, em 2016, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanoemulsões compostas apenas de óleo de romã, as quais apresentaram propriedades físico-químicas adequadas e elevada estabilidade, baixa toxicidade para células sanguíneas humanas, ação antioxidante *in vitro*, além de potencial ação antitumoral *in vitro* contra uma linhagem de células de glioblastoma multiforme (MOTA FERREIRA et al., 2016). Ainda em 2016, demonstrou-se o efeito antinociceptivo em modelo animal de dor inflamatória aguda dessa mesma formulação (FERREIRA et al., 2016), o que sugere que a mesma apresenta uma série de propriedades de grande interesse para aplicação terapêutica. Devido ao êxito obtido nos trabalhos que utilizaram PUL como agente estabilizante de sistemas nanoestruturados e sua compatibilidade com a matriz polimérica do filme composto pela mesma substância, o PUL foi empregado não só como agente filmógeno, mas também como agente estabilizante dos nanocarreadores no desenvolvimento deste trabalho.

Existem poucos trabalhos na literatura onde componentes da romã foram alvo de estudo para o desenvolvimento de filmes. Sogut e colaboradores (2019) utilizaram o óleo de romã como componente bioativo devido suas propriedades antimicrobiana e antioxidante em um filme de *k*-carragenina e proteína do soro do leite isolada para o desenvolvimento de embalagens. O glicerol e sorbitol foram utilizados como plastificantes e o óleo de romã foi

incorporado ao filme em uma concentração de 1%. Como resultado, os autores relatam que além de apresentar atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, a incorporação do óleo ao filme promoveu um efeito plastificante, modificando suas características mecânicas e tornando o filme mais adequado para a aplicação proposta em embalagens (SOGUT et al., 2019).

Recentemente, Costa e colaboradores (2020) exploraram as propriedades cicatrizantes e antimicrobianas do extrato da casca da romã em um filme de álcool polivinílico (PVA), amido e ácido poliacrílico (PAA) usado como curativo para feridas. A atividade antimicrobiana e cicatrizante *in vitro*, bem como a biocompatibilidade e citotoxicidade da formulação de escolha foram avaliadas. Como resultados, o preparo do filme foi adequado e a concentração de 1,25% de extrato se mostrou mais promissora, sendo não hemolítica e apresentando atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, a adição do extrato à formulação facilitou a interação dos polímeros da blenda, contribuindo com sua miscibilidade e estabilidade. Por fim, o filme não apresentou toxicidade e foi eficaz na atividade cicatrizante *in vitro*, sendo considerado promissor para aplicação como curativo temporário no tratamento de feridas (COSTA et al., 2020).

Frente ao exposto, se torna evidente a necessidade do desenvolvimento de novas plataformas para a liberação de ativos farmacologicamente promissores. Desta forma, justifica-se a relevância da formulação de filmes poliméricos contendo sistemas nanoestruturados e seu estudo aprofundado para administração em diferentes vias. É importante ressaltar que nenhuma das associações descritas neste estudo (filmes de PUL com nanoestruturas de óleo de romã e CTZ) foram relatadas anteriormente, o que enfatiza seu caráter inédito. Além disso, as evidências já descritas na literatura sobre o efeito promissor do nanoencapsulamento de ativos somadas às vantagens atribuídas aos filmes poliméricos reforçam os propósitos dos estudos desenvolvidos nesta dissertação.

**MANUSCRITO 1: *PULLULAN FILM INCORPORATED WITH NANOCAPSULES IMPROVES POMEGRANATE SEED OIL ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS IN THE TREATMENT OF ATOPIC DERMATITIS IN MICE.***



**Pullulan film incorporated with nanocapsules improves pomegranate seed oil anti-inflammatory and antioxidant effects in the treatment of atopic dermatitis in mice**

Verônica Ferrari Cervi<sup>1</sup>, Camila Parcianello Saccol<sup>1</sup>, Marcel Henrique Marcondes Sari<sup>1</sup>,  
Carolina Cristóvão Martins<sup>2</sup>, Lucas Saldanha da Rosa<sup>3</sup>, Bruna Dias Ilha<sup>3</sup>, Fábio Zovico  
Soares<sup>3</sup>, Cristiane Luchese<sup>2</sup>, Ethel Antunes Wilhelm<sup>2</sup>, Letícia Cruz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biomateriais, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia Restauradora, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97015-372, RS, Brazil

\*Corresponding author:

Letícia Cruz

Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 3220 9373

Fax: +55 3220 8149

E-mail: [leticiaacruz@smail.ufsm.br](mailto:leticiaacruz@smail.ufsm.br)

**Abstract**

This study aimed to prepare pullulan films loaded with pomegranate seeds oil (PSO) based nanoemulsions or nanocapsules, and evaluate the formulations efficacy in the treatment of atopic dermatitis (AD)-like lesions induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB). The nanoemulsions and nanocapsules (Eudragit RS 100<sup>®</sup>) were prepared by the spontaneous emulsification method and the interfacial precipitation of preformed polymer, respectively, whereas the films were produced by the solvent casting method. Both nanosystems presented adequate mean diameter ( $248\pm 16$  nm for PSONE and  $181\pm 6$  nm for PSONC), polydispersity index (below 0.2), zeta potential ( $-25.63\pm 1.1$  mV for PSONE and  $+43.13\pm 0.7$  mV for PSONC) and pH in the acid range ( $6.77\pm 0.27$  and  $5.31\pm 0.17$ , PSNONE and PSONC). By a pre-formulations study, sorbitol (6.5%) and polyethylene glycol (PEG 400) (1.5%) were considered the most suitable plasticizers for developing pullulan films (6%) intending topical application. In general, pullulan films were classified as flexible and hydrophilic, with high occlusive properties,  $57.6\pm 0.8\%$ ,  $66.3\pm 0.8\%$ ,  $64.6\pm 0.8\%$  for vehicle, PSONEF and PSONCF, respectively. All formulations (films and nanocarriers) presented no irritant potential in the chorioallantoic membrane test. In the *in vivo* model, the treatments with free PSO and the film containing PSO-loaded nanocapsules (PSONCF) attenuated the skin injury as well as the mechanical hypernociceptive behavioral induced by DNCB exposure to mice. Importantly, the biochemical analyses provided evidence that only the treatment with PSONCF modulated the inflammatory and the oxidative stress parameters evaluated in this study. In conclusion, these data lead us to believe that PSONC incorporation into a pullulan film matrix improved the biological properties of the PSO in this AD-model.

**Keywords :** vegetable oil, polymeric films, atopy, inflammation, antioxidants, cutaneous application, nanotechnology.

## Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disorder that commonly affects children (30%) and adults (10%) worldwide. It is the primary sign of a triad condition known as atopy, which is the inherited tendency to produce immune responses to ordinary environmental elements such as dust, pollen and allergens, resulting in AD, asthma and allergic rhinitis [1-3]. AD is characterized by highly pruritic eczemas associated with excoriation, redness and serous exudates. The first line prescription therapy consists of topical corticosteroids to treat the inflammatory symptoms including flares and pruritus. However, several adverse effects are related to the long-term use of these drugs, such as skin atrophy, adrenal suppression and high risk of bacterial infection, and therefore, the development of new pharmaceutical approaches are necessary[3].

The interest of the pharmaceutical and cosmetic industry in nanotechnology has been growing in recent years, and systems such as nanoemulsions (NE) and nanocapsules (NC) are now widely exploited for pharmacological applications. NE are characterized by two immiscible phases, where an internal phase of nanometric size (20 - 500 nm), is dispersed in an external phase, whereas NC is a vesicle system in which an oily core is surrounded by a polymeric shell [4]. Both nanosystems can present advantages over conventional formulations, such as increased stability [5], controlled release [6], decrease toxicity of active compounds [7], and so on. Interestingly, regarding cutaneous application, due to characteristics such as shape, size and surface charge, the nanosystems can facilitate an intimate contact of substances with the *stratum corneum* and promote the deposition of particles and droplets in hair follicles, appendages and deeper layers of the tissue, enhancing the pharmacological activity [4].

For the manufacturing of NE and NC, a suitable oil is required. It is important to notice that the oil may act as a double agent, considering its role as a structural component of the

nanocarriers and its pharmacological properties to the formulations [7-9]. The pomegranate seed oil (PSO) is a vegetable oil obtained from the seeds of the *Punica Granatum* fruit and is widely studied for its interesting pharmacological characteristics. The literature reports PSO antioxidant, anti-inflammatory [7, 8] and neuroprotective actions [10, 11], as well as its use in the treatment of diabetes [12], multiple sclerosis [13], ischemia and several types of cancers [14-16]. The PSO possesses high concentration of polyunsaturated fatty acids such as  $\alpha$ -linoleic acid, in addition to vitamin E and phytosterols, but its pharmacological activity is mainly attributed to the presence of punicic acid, its major compound [17-19]. Its anti-inflammatory action occurs by the inhibition of the cyclooxygenase enzymes (COX) 1 and 2, while the antioxidant property is based on the scavenger of free radicals, which promotes attenuation of oxidative stress [20]. In this sense, our research group has already demonstrated the potential applications of PSO as the oil core for preparing NE and NC [7-9]. The improvements achieved by encapsulating PSO alone or in combination with active ingredients were showed using *in vitro* and *in vivo* approaches regarding the antioxidant, antitumor and anti-inflammatory properties [8, 21, 22]. However, NE and NC are liquid formulations that do not possess an adequate consistency for cutaneous application and therefore, the development of a different dosage form is required.

Polymeric films are flexible dosage forms from a stable nature, easy to produce, transport and very cost-effective [23]. They are well accepted by patients, being excellent candidates for a site-specific application, promoting a longer residence time at the action site, and can be suitable for the incorporation of aqueous-based formulations [24]. In contrast with other cutaneous formulations, polymeric films are less associated with skin irritation and sticky sensation during administration [23]. Due to its versatility, the application of these dosage forms through the cutaneous route is well reported in wound healing [25], burns [26, 27], diabetic ulcers [28] and other skin injuries where reepithelization, reconstruction and angiogenesis are



involved [29-31]. They can be composed by natural or synthetic polymers, where the natural polysaccharides are highlighted for their interesting characteristics such as low toxicity, biocompatibility and biodegradability. Pullulan is a carbohydrate obtained from the fermentation of *Aureobasidium Pullulan* fungus [33]. It is a non-ionic and linear polysaccharide composed of D-glucose repeated units connected by a periodic sequence of glycoside bonds. Because of its molecular structure, pullulan is hydrophilic, bioadhesive and widely studied as stabilizer, gel and film-forming agent [22, 34-38]. In this study, pullulan was the polymer of choice for the development of the films not only because of its interesting characteristics, but also for a matter of compatibility with the nanostructured systems, as both of them have pullulan in its composition as a stabilizer agent.

Therefore, due to: (1) the limitations presented in the treatment of AD, (2) the relevance of the pharmacological properties of PSO; (3) the promising results subsequently obtained in the work of our research group through its incorporation in nanostructured systems and (4) the interesting characteristics of polymeric films as a platform for the therapeutic management of different clinical conditions, this study aimed to incorporate nanostructured systems (NC and NE) containing PSO in polymeric films and evaluate its pharmacological performance against the injuries caused by an *in vivo* model of AD.

## **2. Materials and methods**

### 2.1 Materials

Pullulan was donated by Hayashibara. PSO was purchased from Florien (São Paulo, Brazil). Span 80<sup>®</sup> (sorbitan monooleate) was acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Eudragit RS100 was kindly donated by Evonik (São Paulo, Brazil). Sorbitol was obtained from Delaware (São Paulo, Brazil) and polyethylene glycol (PEG 400) was acquired from Labimpex

(São Paulo, Brazil). DNCB was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and it was used as an inductor of AD-like lesions. The hydrocortisone (HC) was obtained commercially and it was applied as a comparative substance clinically used in the treatment of AD. All other solvents and reagents were from analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

## 2.2 Pre formulation studies

Polymeric films were prepared by the solvent casting method [38, 39]. Pullulan (6 w/v %) was dispersed into 25 mL of water and kept at 50°C under magnetic stirring for 1 h. After, different concentrations of plasticizers were applied to formulate the films: Glycerol was tested at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 5%; Sorbitol was tested at 2, 4, 6 and 8% and PEG 400 was tested at 0.5, 1, 2, 5 and 10%. The plasticizers were added separately to the mixture and kept under magnetic stirring until solubilization. The final dispersions were layered in Petri dishes and taken to the oven at 50°C for 24 h. In order to evaluate which plasticizer type and concentration were more suitable for developing Pullulan films, semi quantitative evaluations were performed such as folding endurance, thumb tack test and apparent elasticity and flexibility. A score was developed (from 0 to 5) based on Notario-Perez and collaborators study [40] pliability table, to rate the thumb tack test, apparent elasticity and flexibility, while folding endurance was estimated up to 300.

### 2.2.1 Thumb tack test

The thumb tack test consisted on putting the thumb into contact with the sample surface and withdrawn it. Upon these circumstances, it is possible to observe the difficulty of pulling the thumb from the surface and therefore, imply the strength of adhesion between the sample and the skin [41].

### 2.2.2 Apparent elasticity and flexibility

The elasticity and flexibility were first performed manually, and a score was developed modifying the pliability table of Notario-Perez and co-workers [40]. This assessment is considered qualitative, yet detailed. In our work, we based the score rating films as:

- (0) **Very Fragile:** breaks easily, even during unmolding.
- (1) **Fragile:** breaks at any attempt to fold.
- (2) **Rigid:** it does not break unless great force is applied.
- (3) **Slightly flexible:** can fold to a certain point before breaking.
- (4) **Flexible:** can be folded effortlessly without breaking, recovering its initial shape.
- (5) **Too flexible:** can be folded in any way without breaking, but sticks to itself and shows problems to recover its initial shape.

### 2.2.3 Folding endurance

The number of times the film samples could be folded repeatedly at 180° angle in the same place until it breaks is the value of the folding endurance. The test was performed by repeatedly folding the film at the same place up to 300 times, which corresponds to excellent flexibility [23, 42].

### 2.3 Preparation of PSO aqueous dispersions: NE and NC suspensions

Two different PSO-based nanostructures stabilized with pullulan were developed, NE (PSONE) and NC suspensions (PSONC). PSONE was prepared by the spontaneous emulsification solvent diffusion method [22], where PSO (3.0 w/v%) and Span 80<sup>®</sup> (0.1925 g) were solubilized in acetone (125 mL) and mixed with a pullulan (0.1925 g) aqueous phase (125 mL), stirring for 10 min. Afterwards, the organic solvent was eliminated by evaporation under

reduced pressure. The PSONC were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method, described by Marchiori and collaborators [7] with the same components of the nanoemulsion plus Eudragit RS 100 (0.25 g) in the organic phase. Both formulations were concentrated at 25 mL of final volume.

#### 2.4 Aqueous dispersions characterization

The following basic characteristics were evaluated on the nanostructured systems: average diameter and polydispersity index (PDI) in ultrapure water after dilution (1:500) via photon correlation spectroscopy and zeta potential in NaCl 10 Mm (1:500) via electrophoretic mobility (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK). The pH was evaluated by directly immersing the electrode of a calibrated potentiometer (Tecnopon, Brazil) in the formulations. Measurements were performed at room temperature ( $25 \pm 2$  °C) in triplicate.

#### 2.5 Preparation of polymeric films containing nanocarriers

The polymeric films were prepared with the same method described above, incorporating pullulan (6 w/v %) to 25 mL of the NE (PSONEF) or NC (PSONCF) and adding PEG 400 (1.5 w/v %) and Sorbitol (6, 6.5 or 7 w/v). The final solutions were taken to the oven for 24 h at 50°C in Petri dishes. For comparative reasons, a vehicle film without the nanostructures was also prepared on the same conditions (VEHICLE).

#### 2.6 Films characterization

Films were assessed in means of weight, thickness and mechanical properties (tensile strength, Young's modulus and percent elongation). The chosen formulation with a final sorbitol concentration was then assessed by recovery size, scanning electronic microscopy (SEM) and wettability test.

### 2.6.1 Weight variation

Films were weighted directly from the Petri's dish in order to calculate the yield. After, it was cut to 19 cm<sup>2</sup> strip, placed in aluminum sachets and stored at room temperature (25 ±2°C).

### 2.6.2 Thickness

The thickness of the films was measured using a manual digital micrometer (Kingtools, BR) with an accuracy of 0.01 mm. Measurements were taken at least from five random positions for each film and values were calculated and averaged.

### 2.6.3 Mechanical properties of the films

Tensile strength, percent elongation and Young's modulus were assessed using a universal testing machine (EMIC DL1000 – Equipment and Systems Ltda – São José dos Pinhais, PR, Brazil), according to ASTM ID: D882-18 [43], at room temperature (25±2°C). Films strips measuring 6 x 3.0 cm<sup>2</sup> were fixed between two grips with an initial separation of 4 cm and 50 mm/min of the cross-head speed. The tensile strength was determined by the force needed to rupture the film divided by the cross-sectional area of the strip, whereas the percent elongation was determined by the percent change in the length of the sample from its original size. The Young's modulus was calculated using the stress and strain values to predict the performance of the material (Equation 1). The mechanical properties were used to determine the optimum sorbitol concentration. All tests were performed in triplicate. The results were expressed in MPa (tensile strength and Young's modulus) and percentage (elongation).

$$\text{Eq. (1): } E = \sigma/\varepsilon$$

Where:

$E$  = Young's modulus

$\sigma$  = Stress

$\varepsilon$  = Strain

#### 2.6.4 Average recovery of nanostructures size from the films

An amount of PSONEF, PSONCF and VEHICLE (0.1 g) was dispersed in 50.0 mL of distilled water and kept under stirring until complete solubilization. These suspensions were filtered in a cellulose acetate filter (10  $\mu\text{m}$ ) and analyzed via photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) for PDI and diameter maintenance.

#### 2.7 SEM analysis

The distribution of NPs in the final film composition as well as its morphology was performed using scanning electron microscopy (JEOL JSM 6360, Japan). A small piece of film was lyophilized and cryofractured in order to analyze the sides sections after fracture. The samples were placed on a double-sided adhesive carbon tape, mounted on the SEM sample slab and coated with gold (Denton Vacuum II, 100  $\text{\AA}$ ) under reduced pressure (30 mtorr) for 40 s to increase conductivity.

#### 2.8 Wettability test

In order to determine the wettability, the contact angle was evaluated in fresh films of 6.5 % sorbitol by sessile drop method, which is based on the deposition of a drop of distilled water (11  $\mu\text{L}$ ) onto the film surface while the contact angle was measured in five seconds, before the swelling started using a goniometer (Drop Shape analysis, model DSA 30S, Krüss; Hamburg, Germany) connected to a computer with dedicated software to assess the contact angles. The evaluation was performed at room temperature ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), where the under and upper layer of the films were analyzed ( $n=3$ ). The results were expressed in medium angle of measurements ( $\theta$ ).

### 2.9 In vitro occlusion test

The *in vitro* occlusion was evaluated using a modified method [44] , where 50 mL beakers were filled with 25 mL of distilled water and covered with cellulose acetate membrane filter paper (90 mm, Sterlitech, USA). Filter papers were attached to the beakers using an elastic rubber band. PSONEF, PSONCF and VEHICLE films were cut in circles (16 cm<sup>2</sup>), with an average weight of 1.15 g, in order to completely cover the top of the beakers. The same amount of petroleum jelly (1.15 g) was used as a positive control, and a beaker without any formulation was used as a negative control. The experiment was conducted in an oven at 36 °C for 48 h, and beakers were weighed at specific time intervals (6, 24 and 48 h). The results were expressed in percentage of the occlusion factor, calculated by the following equation:

$$\text{Eq. (2): } F = (A-B/A) \times 100$$

Where, F is the occlusion factor, A is the water loss from the negative control beaker, and B is the water loss from the sample beaker.

### 2.10 In vitro safety evaluation

The irritation potential of nanostructure aqueous dispersions and films was evaluated by the Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). The experimental study was approved by the Ethical Research Committee of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil and registered under the number CEEA 5428271020. Fertilized chicken eggs incubated at 37±0.5 °C with a relative humidity of 65±2% for 10 days were donated by Languiru (Teutônia, Brazil). The eggshell was removed, exposing the chorioallantoic membrane (CAM). Saline solution (0.9% NaCl w/v) and 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) were used as negative and positive control, respectively. Polymeric films were cut into 2 x 1 cm

stripes and placed on the CAM surface. For the nanoemulsion and nanocapsule dispersions, 500  $\mu\text{L}$  were placed in contact with the CAM and after 20 s, the formulations were removed with saline solution. Pure PSO was also evaluated (10  $\mu\text{L}$ ). The CAM was observed for 5 min for all samples to determine the occurrence of any irritation effects in the CAM blood vessels (coagulation, lysis or hemorrhage). The assay was carried out in quintuplicate. The results were photo documented.

### 2.11 Animals

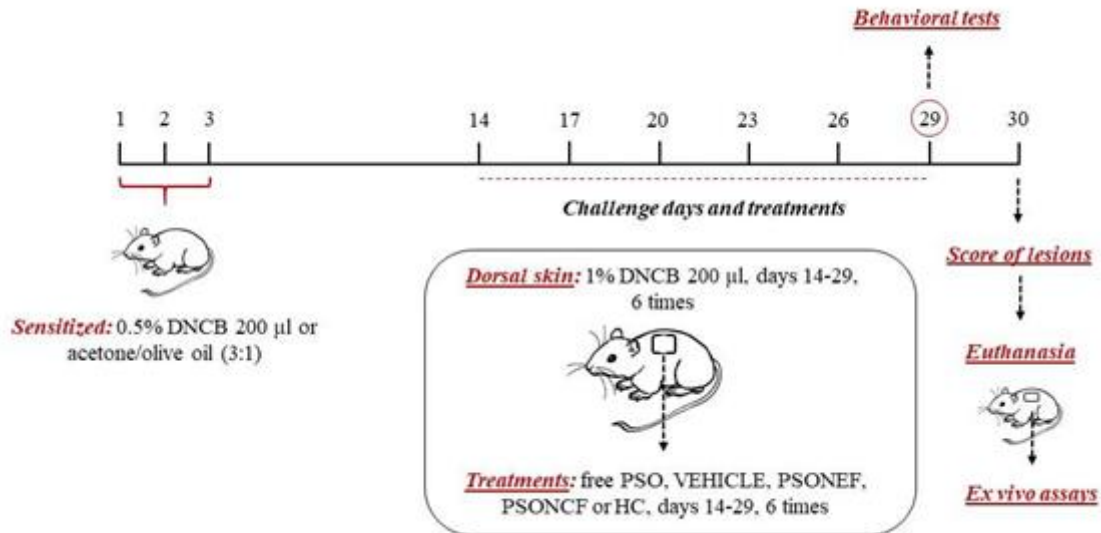
Female BALB-c mice (6-8 weeks old) were kept in a separate animal room, under a 12/12-h light/dark cycle (the lights were turned on at 07:00 AM), in a controlled temperature environment ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), with standard diet and water *ad libitum*. The experimental study was approved by the Ethical Research Committee of the Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil and registered under the number CEEA 23357-2018. All procedures were performed according to National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Every effort was made to minimize both the suffering and the number of the animals used, taking into consideration the consistent effects of the treatments.

### 2.12 Experimental design

The experimental design of this study is depicted in **Figure 1**. As previously described by Chan et al., allergen sensitization and challenge induced by DNCB lead to the development of the skin lesions similar to those of AD [45]. For the sensitization, the dorsal skin of each mouse was shaved and 200  $\mu\text{L}$  of 0.5 v/v-% DNCB in acetone/olive oil (3:1 ratio) was applied on the shaved area on experimental days 1-3. These animals were challenged by applying 200  $\mu\text{L}$  of 1.0 v/v-% DNCB on the dorsal skin on days 14, 17, 20, 23, 26 and 29.



**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental design. Abbreviations: DNCB – 2,4-dinitrochlorobenzene; free PSO – free pomegranate seed oil; PSONEF – pomegranate seed oil nanoemulsion film; PSONCF – pomegranate seed oil nanocapsule film; HC – hydrocortis.



In order to evaluate the treatment of the PSO nanostructured films on the AD-like skin lesions, mice were randomly divided into seven experimental groups ( $n = 7$  animals/group): normal control mice were sensitized and challenged with acetone/olive oil (3:1) and AD-induced mice were sensitized and challenged with DNCB. All others experimental groups were sensitized and challenged with DNCB, as well as received the respective treatments: the free PSO (250 µL); the vehicle film (2.5 H x 2.5 L); the PSONEF (15.0 v/w-% of PSO in 2.5 H x 2.5 L), the PSONCF (15.0 v/w-% of in 2.5 H x 2.5 L) and 1% of hydrocortisone (0.5 g), as a comparative substance clinically used in the treatment of AD. The experimental groups were designed as control; DNCB; DNCB + free PSO; DNCB + vehicle; DNCB + PSONEF; DNCB + PSONCF and DNCB + HC, respectively. All those treatments mentioned above were applied on the dorsal skin of mice at the same days of DNCB treatment (14, 17, 20, 23, 26 and 29). The treatment schedule was based on previous studies that applied the same animal model and assessed the pharmacological action of films formulations [25, 46]. Specifically, at the moment

of the application, the films were lightly moistened with water to favor the adherence of the formulation onto skin of mice.

Furthermore, it was of our interest to investigate the effect of the polymeric films containing PSO nanocarriers not only on the skins lesion induced by DNCB, but also on the comorbidities related to the AD-signs. Then, in order to investigate the development of the nociceptive behavior as a comorbidity of the AD-like signs, the animals were submitted to the open field test (OFT) and the von-Frey test on day 29 of the experimental protocol. Twenty-four hours later, on the last day of the protocol (day 30), the skin severity scores were determined to assess the manifestations of the AD-like signs in mice. Following, the animals were euthanized by inhalation of isoflurane anesthetic, the dorsal skin of each mouse was collected and the samples were quickly frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  to further biochemical analyses: reactive species (RS) levels, superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPO) activities.

## 2.13 *In vivo* tests

### *2.13.1 OFT*

This test evaluates the exploratory behavior and the general locomotor activity of mice. The apparatus was made of plywood (30 H x 45 L x 45 W) in which the floor was divided into 9 squares (3 rows of 3) by masking tape markers. Each animal was placed at the center of the apparatus and observed for 4 min. The locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (number of rearing) activities were recorded during 4 min [47] and expressed as the number of crossings and rearings, respectively. The arena was cleaned with 30% ethanol after each session.

### 2.13.2 *Von-frey test*

As described by Vivancos et al. [48], the mechanical hypersensitivity in mice was estimated using an electronic anesthesiometer (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil). This apparatus consists in a device connected to a specific paw pressure transducer. First, the animals were acclimatized during 30 min in an individual clear plastic chambers on an elevated wire mesh platform, which allowed to access the plantar surface of the paws. Then, a stimulus was applied on the mouse hind paw using a blunt tipped probe connected to a transducer. The paw withdrawal threshold, defined as a measure of mechanical hypersensitivity, was evaluated on day 29 of the experimental protocol. The results were expressed as mechanical threshold (g) to cause the paw withdrawal.

### 2.13.3 *Skin severity scores*

The dorsal skin of the animals was photographed, and severity scores were assessed as previously described to Park et al. [49]. The characteristic signs of skin lesions were classified as: (1) pruritus/itching, (2) erythema/hemorrhage, (3) edema, (4) excoriation/erosion, and (5) scaling/dryness. Finally, the score was ranked as: 0 (no signs), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe).

## 2.14 *Ex vivo* assays

### 2.14.1 *Tissue preparation*

For the MPO assay, the dorsal skin fraction was homogenized in PBS (20 mmol/L, pH 7.4) containing ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mmol/L). Then, the homogenates were sonicated for 2 min and finally they were frozen and thawed three times. Right after the homogenization step, the samples were centrifuged at 2,000 rotations per minute (rpm) during 15 min in which the supernatant (S<sub>1</sub>) was collected. Next, the S<sub>1</sub> fraction was also centrifuged

at 14,000 rpm for 30 min at 4°C to yield a final pellet (P<sub>2</sub>) that it was resuspended in a medium containing potassium phosphate buffer (50 mmol/L, pH 6.0) and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5 wt/v-%) prior to performed the enzymatic assay.

To elucidate the involvement of oxidative stress, the samples of dorsal skin were homogenized (1:10, w/v) in 50 mM of Tris-HCl at pH 7.4. The homogenates were then centrifuged at 2,500 rpm for 10 min and the low-speed supernatant (S<sub>1</sub>) was used for RS levels and SOD activity assays.

#### *2.14.2 Protein concentration*

The protein concentration was estimated according to the method described by Bradford [50], using a bovine serum albumin (1 mg/mL) as a standard. The color was measured spectrophotometrically at 595 nm.

#### *2.14.3 MPO activity*

MPO activity was estimated in accordance to the method previously described [51]. In this assay, an aliquot of resuspended P<sub>2</sub> was added to a medium containing the resuspension buffer as well as *N,N,N',N'*-tetramethylbenzidine (1.5 mmol/L). The kinetic activity of MPO was started after the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01 v/v %), and the color reaction was spectrophotometrically measured at 655 nm at 37°C. The results were expressed as optic density (OD)/mg protein/min.

#### *2.14.4 RS levels*

An aliquot of 1 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) in ethanol was incubated with the S<sub>1</sub> and 10 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 for 1 h at room temperature in the dark. DCHF-DA, easily oxidized to DCF, is used as a fluorescent probe to detect intracellular RS levels. Thus, the oxidation of DCHF-DA into DCF was determined at 488 nm for excitation

and 525 nm for emission. DCF fluorescence intensity was expressed as arbitrary fluorescence units [52].

#### 2.14.5 SOD activity

This method is based on the capacity of SOD in inhibiting the epinephrine autoxidation in adrenochrome. The SOD activity was spectrophotometrically determined as described by Misra and Fridovich [53] and the color reaction was measured at 480 nm. The S<sub>1</sub> (10, 20 or 30  $\mu$ L) was added in a 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer pH 10.3. Enzymatic reaction was started by adding an aliquot of epinephrine. One unit of the enzyme was defined as the amount of SOD required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50%. The enzymatic activity was expressed as U/mg protein.

#### 2.16 Statistical analysis

The normality was assessed by D'Agostino test followed by statistical test. All data collected were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for a minimum of three replicates ( $n \geq 3$ ). For data considered parametric, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* Tukey's test was performed to compare the significant difference among the experimental groups. When data were tested as nonparametric (skin severity scores), a Kruskal-Wallis analysis followed by *post-hoc* Dunn's test was used to compare different treatment effects. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.0, USA). Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Sorbitol (6,6.5,7%) and PEG 400 (1.5%) were considered more adequate as plasticizers for the pullulan (6%) film

In order to obtain an adequate film formulation, pullulan was tested in different concentrations (from 1 to 8), in which 6% showed to form a thin, yet strong film with a minimum amount of polymer (5% or less formed weaker films). However, pullulan alone was considered too rigid. Therefore, three different plasticizers were tested in various concentrations: glycerol, sorbitol and PEG 400. The results in **Table 1** showed that films with 0.5 to 2 % of glycerol were very fragile, breaking during unmolding, and from 4 to 5 % more flexible and adherent. Sorbitol concentrations between 6 and 8 % presented interesting flexibility and adherence characteristics, folding effortless and recovering its initial shape. When used alone, PEG 400 produce a greasy very fragile film, displaying better characteristics only when used in combination with sorbitol or glycerol, at a 1.5% concentration. In addition, it was observed that glycerol films are more susceptible to humidity, modifying their original characteristics. Therefore, a combination of PEG 400 (1.5%) and sorbitol (6-7%) were designated for further investigation. In means of macroscopic appearance, formulations where nanostructures were incorporated (PSONEF and PSONCF) presented a milky-white color, while VEHICLE had a translucent aspect.

#### 3.2 PSONE and PSONC presented suitable physic-chemical characteristics

After preparation, PSONE and PSONC were characterized by means of physicochemical aspects (**Table 2**). Both formulations presented nanometric size ( $248\pm 16$  nm and  $181\pm 6$  nm, respectively) with PDI values up to 0.2 and zeta potential values of  $-25.63\pm 1.1$  mV for PSONE and  $+43.13\pm 0.7$  mV for PSONC. The pH was at acid to neutral range ( $6.77\pm 0.27$  and  $5.31\pm 0.17$ , PSNONE and PSONC, respectively).

**Table 1.** Pre formulation studies

Tests/ Plasticizers	G 0.5%	G 1%	G 1.5%	G 2%	G 3%	G 4%	G 5%	S 2%	S 4%	S 2%	S 4%	S 6%	S 8%	P 0.5 %	P 1%	P 2%	P 5%	P 10%
<b>Thumb test</b>	0	0	0	0	1	3	5	1	2	1	2	3	2	0	0	0	1	1
<b>Elasticity</b>	0	0	0	0	1	3	5	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	1
<b>Folding endurance</b>	0	0	0	0	0	300	300	0	0	0	0	300	300	0	0	0	0	0

Thumb tack test, apparent elasticity and folding endurance in different concentrations of glycerol (G), sorbitol (S) and PEG 400 (P) in a 6% pullulan film. (0) to (5) corresponds to minimum and maximum values of thumb tack and apparent flexibility. NA means non applicable.

**Table 2.** Nanostructures characterization

Formulation	Size (nm)	PDI	ζ Potential (mV)	pH
<b>PSONE</b>	248±16	0.23±0.03	-25.63±1.1	6.77±0.27
<b>PSONEF</b>	334±52	0.45±0.08*	-	-
<b>PSONC</b>	181±6*	0.13±0.05	+43.13±0.7	5.31±0.17
<b>PSONCF</b>	329±31*	0.37±0.05*	-	-
<b>VEHICLE</b>	176±39	0.26±0.06	-	-

Size, PDI, zeta potential and pH of PSO nanoemulsions (PSONE) and nanocapsule suspension (PSONC) as well as PSONEF, PSONCF and VEHICLE films. All data were analyzed by Student's *t* test. (\*) significant difference between PSONCF and PSONC size; significant difference between PDI values of PSONE and PSONEF, and between PSONC and PSONCF.

### 3.3 Films characterization

#### *3.3.1 The 6.5% sorbitol concentration was considered suitable for further evaluations*

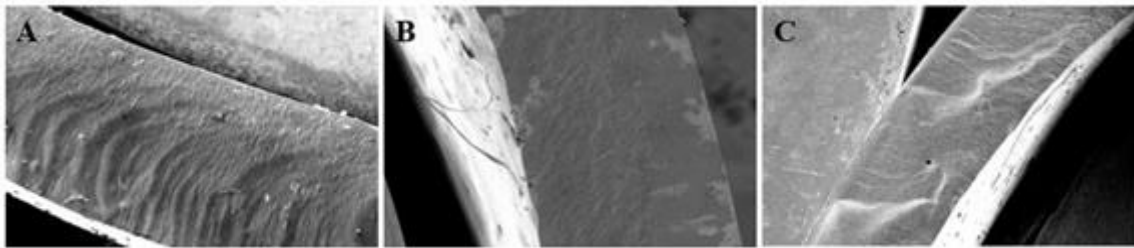
The films presented a homogeneous macroscopic appearance, with white-milky color for PSONCF and PSONEF and a translucent display for VEHICLE (**Figure 2**). The films weight ranged from 2.7 to 4.0 g, with approximately 82% yield and the medium thickness was 164  $\mu\text{m}$ , as showed in **Table 3**. SEM analysis (**Figure 3**) depicted a slightly roughened surface, without apparent difference among formulations and no presence of the nanostructures on this section cut. Mechanical properties such as tensile strength, percent elongation and Young's Modulus were assessed and showed significant difference between sorbitol concentrations in PSONEF and VEHICLE ( $p>0.05$ ), where higher concentrations decreased tensile strength values (**Table 3**). In PSONEF 6%, lower percentage elongation was observed in comparison to PSONEF 6.5% and PSONEF 7%, as well as in VEHICLE 6% and VEHICLE 7%. The Young's modulus values are also presented at **Table 3**. As cutaneous administration is the main goal of these formulations, it cannot present neither hard and brittle characteristics that could turn application difficult, nor too flexible and elastics that would make the films fragile. For that reason, the 6.5% sorbitol concentration was chosen for further studies. After the nanostructures incorporation to the 6.5% sorbitol polymeric film, average diameter maintenance and PDI presented increased values for both PSONEF ( $334\pm 52$  nm and  $0.45\pm 0.08$ ) and PSONCF ( $325\pm 14$  nm and  $0.36\pm 0.12$ ) ( $p<0.05$ ).



**Fig. 2.** Macroscopic appearance of the films. (A) PSONCF (B) PSONEF (C) VEHICLE.



**Fig. 3.** Morphological features by SEM analysis of the side section of PSONEF (A), PSONCF (B) and VEHICLE (C) films after cryofracture.



**Table 3.** Films characterization. Influence of different concentrations of Sorbitol on films physical characteristics.

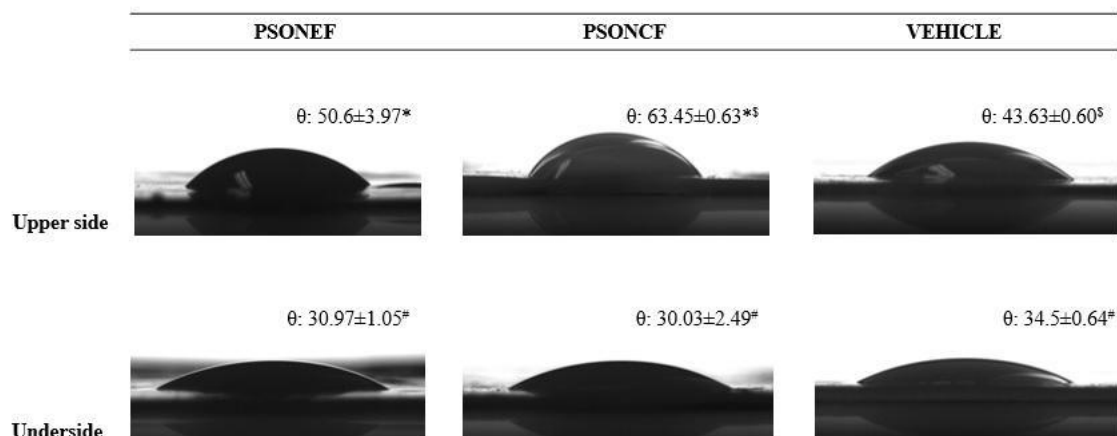
Formulation	Weight (g)	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Tensile Strength (MPa)	% Elongation	Young's Modulus (MPa)
PSONEF 6%	3.73 $\pm$ 0.02	174.7 $\pm$ 21.5	2.15 $\pm$ 0.06#	90.80 $\pm$ 3.06*	29518.3
PSONEF 6.5%	3.85 $\pm$ 0.05	157.3 $\pm$ 8.05	1.13 $\pm$ 0.09	214.1 $\pm$ 0.38	12520.4
PSONEF 7%	3.96 $\pm$ 0.00	173.8 $\pm$ 23.5	0.33 $\pm$ 0.09	232.2 $\pm$ 13.75	11547.3
PSONCF 6%	3.81 $\pm$ 0.00	154.7 $\pm$ 32.0	1.60 $\pm$ 0.16	205.0 $\pm$ 26.54	13071.2
PSONCF 6.5%	3.96 $\pm$ 0.03	154.0 $\pm$ 16.6	1.43 $\pm$ 0.16	215.0 $\pm$ 6.80	12450.5
PSONCF 7%	4.10 $\pm$ 0.00	160.7 $\pm$ 22.2	1.07 $\pm$ 0.22	235.0 $\pm$ 1.35	11399.7
VEHICLE 6%	2.73 $\pm$ 0.03	171.3 $\pm$ 26.3	1.20 $\pm$ 0.17\$	271.7 $\pm$ 28.29&	9883.1
VEHICLE 6.5%	2.83 $\pm$ 0.02	165.3 $\pm$ 12.0	0.60 $\pm$ 0.04	325.0 $\pm$ 16.51	8238.9
VEHICLE 7%	2.90 $\pm$ 0.00	167.3 $\pm$ 31.7	0.54 $\pm$ 0.10	402.8 $\pm$ 30.23	6642.7

The weight values increase according to higher concentrations of plasticizer, as well as the presence of nanocarriers or not. Thickness of films varies with no significant difference. All data were analyzed by One-way ANOVA, followed by *post-hoc* Tukey's test. (#) significant difference between all PSONEF tensile strength ( $p < 0.0001$ ). (\$) 6% VEHICLE has significantly higher tensile strength than 6.5% and 7% ( $p < 0.01$ ). (\*) PSONEF 6% presented lower percent elongation than 6.5% and 7% ( $p < 0.0001$ ). (&) VEHICLE 6% is significantly different than 7% ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 All formulations were hydrophilic and PSONCF showed higher values of contact angle

**Figure 4** presents the results obtained after analyzing the under and upper side of PSONEF, PSONCF and VECHILE films. Such evaluation revealed a significant difference between both sides, where the underside contact angle was smaller than the upper side for all formulations ( $p < 0.05$ ). In addition, PSONCF and PSONEF values of contact angle were higher than the VEHICLE ( $\theta$   $63.45 \pm 0.63$ ,  $\theta$   $50.6 \pm 3.97$  and  $\theta$   $43.63 \pm 0.60$ , respectively) ( $p < 0.05$ ), suggesting that the presence of nanostructures can modify the surface free energy interaction with the water drop, and therefore, increase its hydrophobicity.

**Fig. 4.** Contact angle analysis of the upper and underside of all film formulations. Upper side: All data were analyzed by One-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey's test.



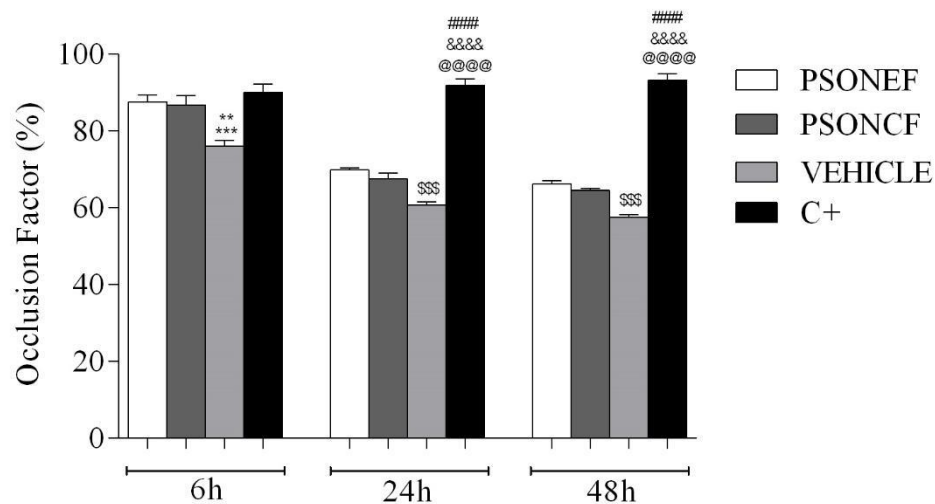
(\*) significant difference between PSONCF and PSONEF and between PSONCF and VEHICLE, respectively. Underside: (#) all contact angle values were smaller than the upper side. No difference between the underside analysis.

### 3.5 PSONCF and PSONEF showed high occlusive property

After 48 h of experiment, PSONCF and PSONEF showed no significant difference when compared to each other, presenting occlusion effects around  $64.6-66.3 \pm 0.8$  % (**Figure 5**;  $p > 0.05$ ). However, both formulations showed higher occlusive properties when compared to

the VEHICLE film ( $57.6 \pm 0.8 \%$ ), indicating that the nanostructures are able to modify such characteristic. Regardless time, nanostructured films always presented higher occlusion factor than pullulan VEHICLE film ( $p < 0.05$ ). It is also important to highlight that, overall, all films formulations can be considered occlusive, displaying more than half occlusion capacity than the positive control ( $93.3 \pm 0.8\%$ ).

**Fig. 5.** Occlusion factor in 6, 24 and 48 hours. All data were analyzed by One-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey's test.

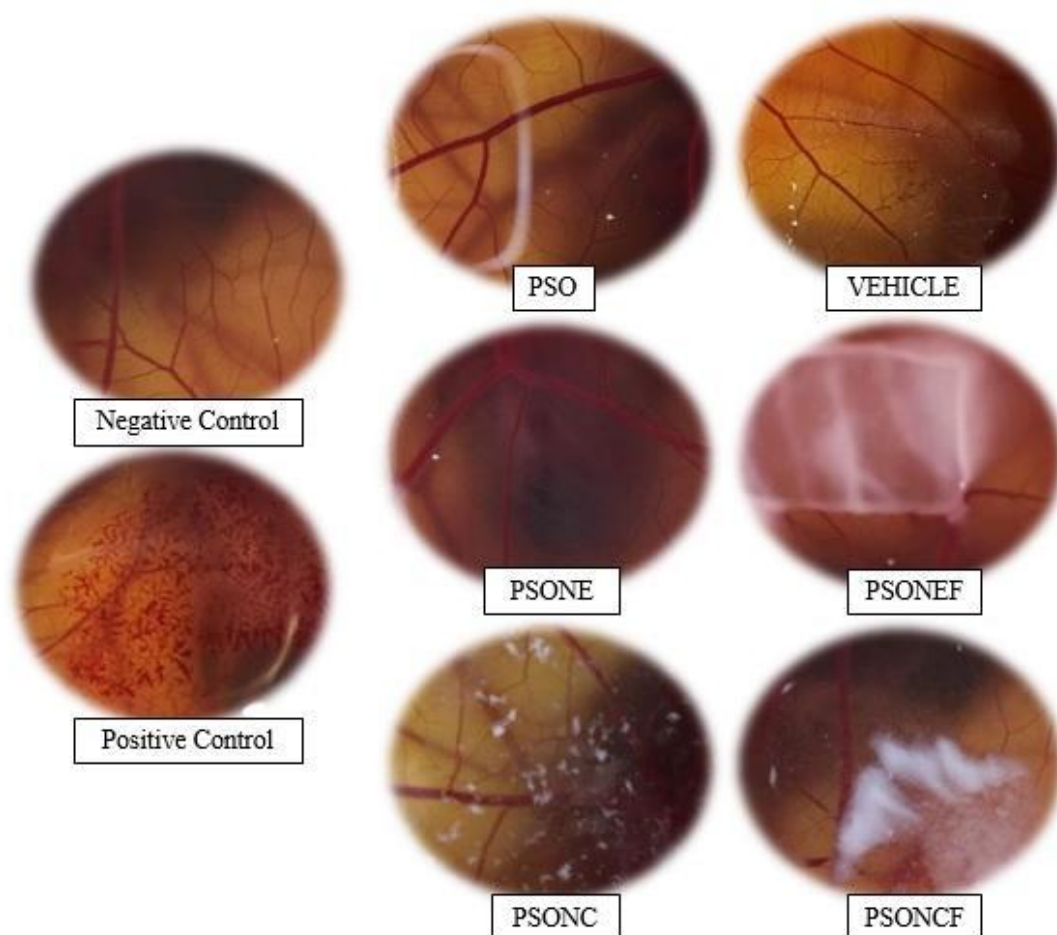


(\*) VEHICLE is significantly difference than all formulations in 6 hours with (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (\$\$\$) difference among PSONEF, PSONCF and FF ( $p < 0.001$ ), (#####) difference between PSONCF and C+, (@@@@) difference between PSONEF and C+, while (&&&&) reports difference between VEHICLE and C+ ( $p < 0.0001$ ).

### 3.6 All formulations were considered non irritant

In the CAM, evidence of lysis, coagulation and hemorrhage were not detected (**Figure 6**), indicating an absence of irritation potential for all formulations.

**Fig. 6.** Hen's Egg Test on the chorioallantoic membrane assay. HET-CAM, presents NaCl as negative control and NaOH 0.1 M as positive control. Nanostructured dispersions as well as films formulations were tested and no irritancy potential was observed.



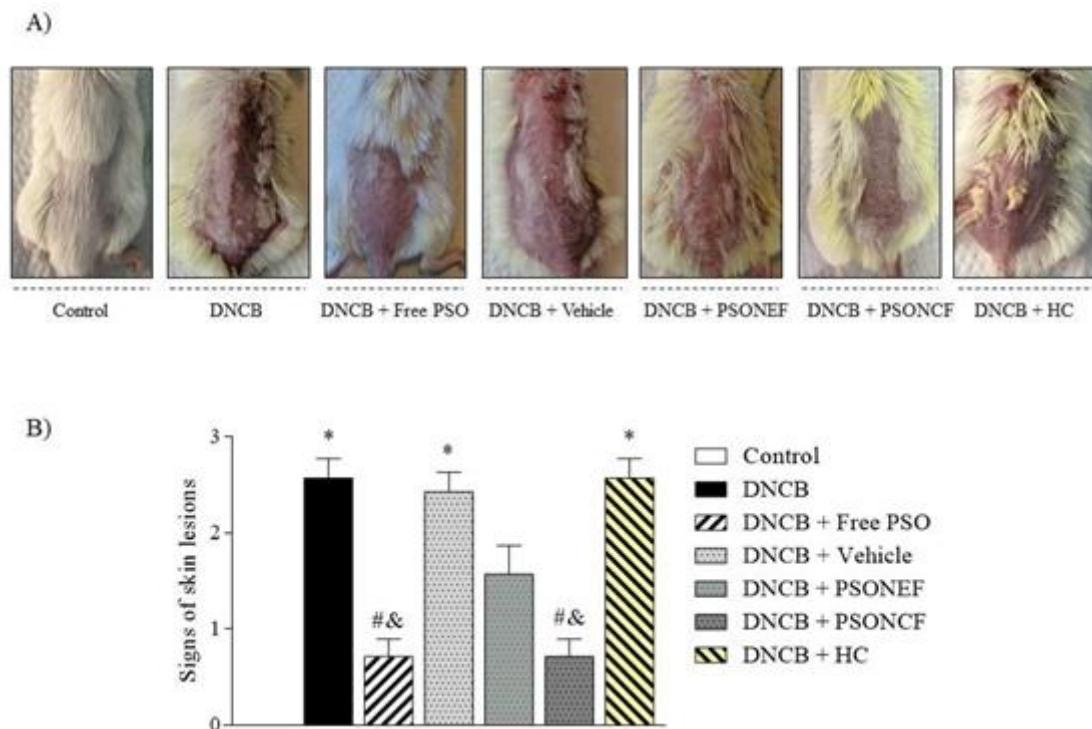
### 3.7 AD-like animal model

*3.7.1 The free PSO or the PSONCF treatments attenuated the AD-like signs induced by DNCB in mice.*

The **Figures 7A** and **7B** illustrate the effect of the films containing PSO incorporated into nanosystems (PSONEF and PSONCF) on the severity of the skin lesions in mice. Our results showed that the DNCB exposure induced AD-like signs in mice, represented by an increase in the clinical skin severity score when compared with the control group ( $p < 0.0001$ ). The free PSO or the PSONCF treatments markedly decreased the characteristics AD-like signs in the DNCB group whereas the PSONEF had no statistical difference when compared to

vehicle or DNCB-treated mice. In turn, the HC and the vehicle film did not alter the severity of lesions induced by DNCB ( $p > 0.05$ ).

**Fig. 7.** Effect of the free PSO and the films formulations on the severity of the skin lesions in mice. (A) Images of the skin lesions from the groups of mice taken on the last day of the experiment (day 30). (B) Dermatitis scores. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. of 7 mice per group. (\*)  $p < 0.05$  compared with the control group, (#)  $p < 0.05$  compared with the DNCB group, (&)  $p < 0.05$  compared with the hydrocortisone (HC) group (Kruskal-Wallis followed by the Dunn's test).



*3.7.2 The free PSO or the PSONCF treatments suppressed the development of a nociceptive behavior related to the AD-like signs in mice.*

In order to avoid any kind of unspecific results in the behavioral tests due to possible sedative effect or locomotor abnormalities related to the treatments (DNCB, free PSO, PSONEF or PSONCF and HC), the animals were submitted to the OFT. The effect of the film formulations (PSONEF and PSONCF) on parameters of the locomotor and exploratory activities in mice are shown in **Table 4**. The statistical analysis revealed that all the treatments

performed in this study did not change the number of crossings ( $p > 0.05$ ) or rearings ( $p > 0.05$ ) in mice.

**Table 4.** Effect of the formulations and the DNCB treatments on the locomotor and exploratory activity parameters.

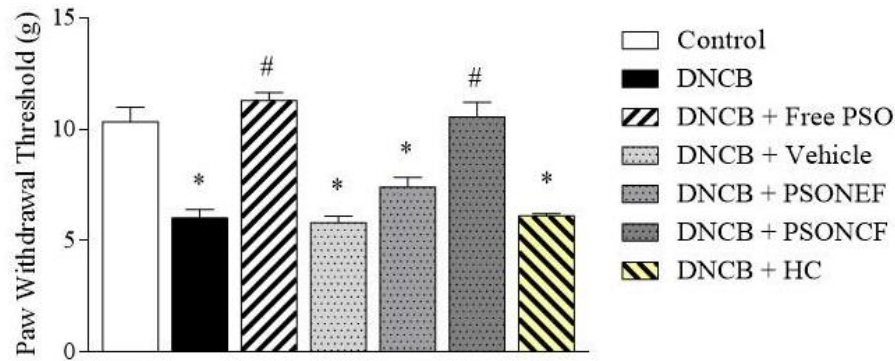
Experimental Group	OFT	
	<i>Crossings</i>	<i>Rearings</i>
<b>Control</b>	76.3 ± 4.9	31.7 ± 2.8
<b>DNCB</b>	76.7 ± 6.3	23.1 ± 2.3
<b>DNCB + free PSO</b>	74.7 ± 4.9	26.3 ± 1.6
<b>DNCB + VEHICLE</b>	82.4 ± 7.6	30.3 ± 2.3
<b>DNCB + PSONEF</b>	73.6 ± 6.1	27.1 ± 1.5
<b>DNCB + PSONCF</b>	77.1 ± 6.2	29.7 ± 1.9
<b>DNCB + HC</b>	74.4 ± 6.8	23.7 ± 2.0

Data are reported as mean ± SEM for 7 animals per group. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by the Tukey's test when appropriate.

**Figure 8** depicts the effect of all tested formulations on the development of the mechanical hypernociception induced by DNCB in mice. The results demonstrated that the DNCB applications decreased the paw withdrawal threshold in mice when compared with the control group, indicating that the DNCB exposure triggered a mechanical hypersensitivity in mice ( $p < 0.05$ ). The HC, vehicle and the PSONEF treatments were ineffective to increase the paw withdrawal threshold in DNCB-treated mice. In contrast, the treatments with free PSO and PSONCF improved the mechanical stimulus response in mice exposure to the DNCB, suggesting that both exerted antinociceptive effect.

**Fig. 8.** Effect of the free PSO and the film formulations on the development of a mechanical hyper sensibility induced by DNCB in mice. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. of 7 mice per group.

A)



(\*)  $p < 0.05$  compared with the control group, (#)  $p < 0.05$  compared with the DNCB group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

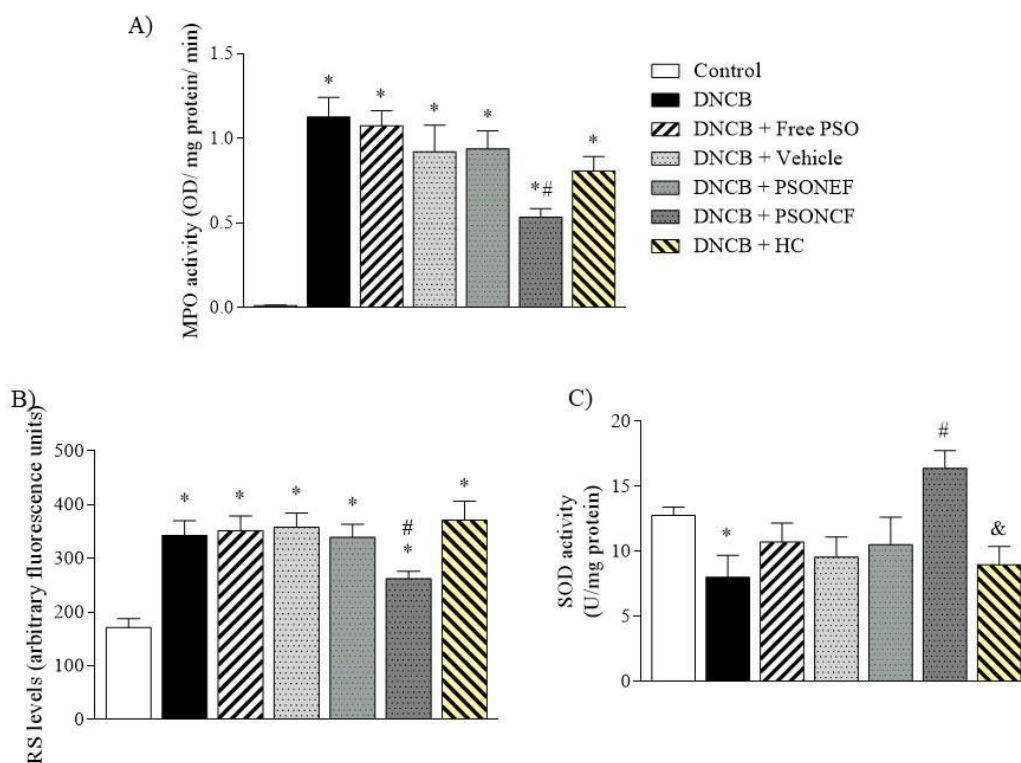
### 3.7.3 The treatment with PSONCF improved the inflammatory and the oxidative status in the dorsal skin of mice exposed to the DNCB.

The effect of the film formulations on the inflammatory and the oxidative stress parameters are depicted in **Figure 9**. All the animals exposed to DNCB enhanced the MPO enzymatic activity in the dorsal skin when compared with the control group ( $p < 0.0001$ ). In turn, the treatment with PSONCF decreased the MPO activity in the dorsal skin of mice in comparison to DNCB-treated mice (**Figure 9A**).

As expected, the dorsal skin of the DNCB-treated mice had shown a significant increase in the RS levels when compared with the control group ( $p < 0.0001$ ) whereas only the PSONCF treatment was effective in reducing the RS levels in the DNCB group (**Figure 9B**). Accordingly, our data also demonstrated that the DNCB applications inhibited the SOD activity in the dorsal

skin of mice when compared with the control group ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the treatment with PSONEF restored the activity of this enzyme (**Figure 9C**).

**Fig. 9.** Effect of the free PSO and film formulations on the MPO activity (A), RS levels (B) and SOD activity (C) in the dorsal skin of mice. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. of 7 mice per group.



(\*)  $p < 0.05$  compared with the control group, (#)  $p < 0.05$  compared with the DNCB group, (&)  $p < 0.05$  compared with the hydrocortisone (HC) group (One-way ANOVA followed by the Tukey's test).

#### 4. Discussion

The selection of film components is majorly important and reflects directly in its performance within different administration routes. Pullulan presents adequate film forming characteristics producing thin, transparent, adhesive, colorless, and odorless films and it was already reported in manufacturing of films for cutaneous administration, treatment of skin



disorders and wound dressing [38, 54]. The use of plasticizer is equally important to provide flexibility and improve elasticity, reducing the intermolecular forces of the film structure and increasing its softness for administration. In the pre formulation studies, apparent elasticity, flexibility, and adhesion were evaluated in different concentrations of various plasticizers. It was possible to observe that glycerol formed more elastic and flexible films, more susceptible to room humidity and, therefore, very hydrophilic. As a consequence, these formulations were considered more fragile than the sorbitol films. This take effect because as both glycerol and sorbitol are polyols, glycerol presents three linked carbons to the hydroxyl (OH) group, whereas sorbitol shows 6 carbons in its structure. Hence, sorbitol has a higher interaction capacity with pullulan molecules, providing less mobility to their chains and lowering their interaction with water molecules. Glycerol also has a smaller molecular weight and it is known to be more hydrophilic. When accessing PEG 400, it was possible to observe that the plasticizer alone was not able to provide adequate characteristics such as flexibility or adhesion, however Antoniou and co-workers [55] reports that as PEG 400 has high molecular weight, it overflows the polymer matrix and is trapped in the underside of the film, which is in contact with the Petri's dish. Such phenomena modify the understructure of the film, facilitating the removal of the film from the dish. The 1.5% PEG 400 concentration was considered ideal as it is the minimum amount needed for this performance. As for sorbitol, from 6-8 % concentrations, adhesion, flexibility and elasticity were considered adequate, but further studies were necessary to be able to differentiate it.

Regarding nanostructures characterization, PSONE and PSONC presented values of mean diameter, PDI and pH similar to those reported by Ferreira and co-workers [21]. After the nanostructure incorporation to the film matrix, PDI and diameter maintenance increased. Chandra and co-workers [56] used a similar method to evaluate lacidipine nanoparticles recovery after incorporation in a fast dissolving polymeric film. As a result, all formulations

showed an increased particle size after re-dispersion. For example, one of the formulations showed initial particle size of  $314\pm 2$  nm and after incorporation in the film matrix the value varied to  $516\pm 140$  nm. The author suggested that the particles may be embedded with the polymeric matrix. Also, the presence of the polysaccharide forms a colloidal dispersion with particles ranging in the nanometric scale, which can be detected by the photon correlation spectroscopy method. A previous study of our research group concluded that the increase observed in particle size after re-dispersion should not cause prejudice to potential pharmacological effects [57].

Physical properties of the films were considered consistent with cutaneous intended application. The measurement of thickness is important as directly corresponds to a comfortable administration of the formulations. Zhu and co-workers [54] developed carboxymethyl, gellan and pullulan blend edible films. One of their formulations were a 4% pullulan film that showed thickness around  $170\pm 0.04$   $\mu\text{m}$ , similar to the values obtained in this study (164  $\mu\text{m}$  average) with 6% pullulan. Although it is a different pullulan concentration, such parameter variation can be due to distinctive preparation methods. Surface morphology assessment is necessary to indicate the homogeneity of the film. SEM analysis showed a slightly roughened surface and yet very homogeneous appearance without nanostructures presence. Machado and co-workers [58] tailored a tenofovir-loaded nanoparticle film with poly (lactic-co-glycolic acid) and sterylamine for vaginal drug delivery. They suggest that the absence of the nanoparticles in the SEM analysis of the side sections after fracture is due to its intimate and uniform insertion in the polymeric film network.

Mechanical and physical properties are important because polymeric films should present adequate tension so it can be pulled out of the casting mold and peeled easier from its packaging without tearing. Likewise, they cannot be too flexible as to modify its shape or structure and impair its homogeneity during administration [23]. For all formulations, the

tensile strength decreased as the percent elongation increased with the raise of plasticizer concentration. Tensile strength corresponds to the maximum amount of force needed to tear the film during a constant rate of deformation, as percent elongation correlates to the comparison of the length before and after deformation under stress. Lower concentrations of sorbitol shaped a harder more brittle film with high values of Young's modulus, whereas higher concentrations formed a flexible more elastic product with smaller Young's modulus. The Young's modulus or elastic modulus represents the films stiffness. The influence of the nanostructures in this test were not assessed in means of statistical analysis because the aim of the test was to select one plasticizer concentration to carry out the study.

The wettability test is evaluated by the contact angle method, which is defined as the angle between the baseline of the water drop and the tangent line at the contact point of the water droplet with the flat surface. This technique, so-called the sessile drop method, can be used to learn more about a material surface free energy and its hydrophobicity. Such parameters are considered important when it comes to skin administration of a pharmaceutical formulation because it helps determine the product behavior in contact with the skin in means of adhesion, hydrophilicity, permeability and so on [59]. As described by Antoniou and co-workers [55], the solvent casting method can provide different textures to both sides of the polymeric film. As a result of the contact with the casting mold, the underside is usually smoother than the upper side, which is exposed to the air. Because of this difference, both sides of the films were evaluated in this test. As mentioned before in the pre formulation studies, PEG 400 overflows the polymeric matrix and its deposited in the underside of the film. Thus, the underside of all formulations presented lower values of contact angle than the upper side, suggesting this side is more hydrophilic and adherent. In the upper side, PSONCF showed a greater contact angle value. The presence of Eudragit RS100 is the only composition difference between nanoemulsions and nanocapsules, which can explain PSONCF hydrophobic nature. Overall,

because of its layout, the films presented high wettability potential and therefore, a very hydrophilic nature as pullulan is a freely soluble and rapidly dispersible polymer. Aiming at cutaneous administration for the treatment of skin injuries such as AD, pullulan hydrophilic character can come to use if the lesion presents moisture due to exudates, as reported by Cordenonsi and co-workers [60]. Dermatitis lesions can peel off to abrasions and exudate, and with pullulan fast dissolving quality the nanostructures can be rapidly available to interact locally with the injury, improving its efficacy during treatment.

There is a direct correlation between *in vitro* occlusion and *in vivo* skin hydration. Formulations with occlusive components present the ability to form a barrier that can prevent transepidermal water loss, increasing water content in the *stratum corneum*. An increase of skin hydration can be useful to enhance the permeation of active compounds and therefore, useful in the treatment of skin disorders [61]. In addition, it is well stated in the literature that nanostructured systems are granted highly occlusive properties depending on their composition. Montenegro and co-workers [62] compared the occlusion capacity of different nanocarriers (nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) incorporated in a gel vehicle. The results showed that the content of the lipid core of the nanocarriers with similar sizes seemed to play a key role on its occlusive properties. The *in vitro* occlusion tests results of our study revealed that the nanostructures presence in the film formulation increased the occlusion factor in comparison to VEHICLE, but presented no difference between PSONEF and PSONCF. Both NE and NC formulations have similar average size and the same lipid composition, which is PSO. It is also important to highlight that all film formulations exhibited more than half occlusion capacity in comparison to petroleum jelly, a well-known occlusive substance. As a result, it is possible to imply that such characteristics can improve the pharmacological effects of the PSO regardless the nanostructure type, providing better outcome and efficacy in the treatment of skin disorders.

The HET-CAM assay is an alternative to Draize test of ocular toxicity [63] that can be used to assess a formulation irritation potential and therefore, its safety. Various authors report the test application to formulations designed for skin administration, as well as its use to estimate nanostructured systems cutaneous tolerability [64-66]. Sousa and co-workers [67] evaluated the irritation potential of creams containing different vegetable oils. All formulations were classified as nonirritant, suggesting their safety for topical application. Likewise, Contri and co-workers [68] did not detect endpoints of irritancy when evaluating rhodamin-tagged nanocapsules incorporated in a chitosan gel vehicle. In our study, the positive control of NaOH presented signs of coagulation, while all developed nanostructures suspensions as well as all film formulations presented no irritation potential and are initially considered safe for cutaneous application.

AD, the most common skin disease, is considered a complex disorder of high heterogeneity, including abnormalities in the skin barrier and in the accessing of pathogens and allergens agents to the tissue. Such factors contribute to the development of classical AD-signs, characterized by the dry and thick skin as well as the patchy eczema [69]. Similarly, repeated DNCB applications, an epicutaneous sensitizer, stimulate the inflammatory cells and disrupt the skin barrier of mice. For this reason, DNCB exposure is widely employed as tool to induce a chemical animal model of allergic contact dermatitis [70]. As expected, our findings showed that consecutive exposure to DNCB induced the appearance of the AD-like signs in mice, that was evidenced by an increase in the severity of the skin lesions (dryness, erythema and erosion).

Despite that topical corticosteroid are considered the standard treatment to alleviate the severity signs associated with AD, the appearance of numerous adverse effects limits the long-term use of this therapeutic agents. Therefore, there is an urgency on the planning and developing of a new, safe and effective strategies for AD. The PSO, abundantly rich in conjugated fatty acids, polyphenols and estrogen, has been reported due to its antioxidant, anti-

inflammatory and antitumoral properties [20]. Moreover, the nanotechnology has been widely used to improve the performance of natural products. In fact, a previous study had been showed that the PSO, used as a polymeric shell core in the NC, prolonged the anti-inflammatory effect of a topical formulation containing silibinin in an animal model of skin injury induced by UVB radiation [7]. In this context, our results provided evidence that both free PSO and PSONCF treatments attenuated the AD-like signs in mice, represented by a decrease in the incidence of the skin lesions score.

In general, it has been proposed that the pathological characteristics of the AD-like skin lesions required immunological and inflammatory responses. More specifically, the infiltration of mast cells, neutrophils and eosinophils into the tissue, stimulated the release of T helper 2 (Th2) cytokines as well elevated the local and systemic immunoglobulin E (IgE) levels, resulting in an allergic reaction [71]. In view of the tight relationship between the inflammatory process and the pathogenesis of AD, we investigated the involvement of the MPO activity. As expected, the results of the present study indicate that consecutive exposures to DNCB increased the MPO enzymatic activity in the dorsal skin of mice. Surprisingly, only the treatment with the PSONCF inhibited the activity of this enzyme in the dorsal skin of animals exposed to DNCB. Reinforcing the need for new therapeutic approaches to AD, our findings revealed that mice treated with HC exhibited AD-like skin lesions as well as an increase in the MPO activity on the local injury. This data agrees with the fact that the long-term steroids use lead to the development of skin thinning, cracking or bleeding [72].

Furthermore, the melanocytes and keratinocytes, some types of skin cells, generate RS. It is well-known that the immune cells stimulation is associated to the RS production as well as the inflammatory mediators are activated by the oxidative molecules [73]. In this way, the RS production from the skin cells may also produce exacerbated reactive lipid species by reacting with lipid molecules or redox-sensitive lipid-metabolizing enzymes, resulting in structural and

functional damages of macromolecules. In this situation, there are an enhancement on the antioxidant enzymes activity and an induction on the constitutive cytoprotective genes in order to maintain the cellular redox homeostasis [74]. Thus, the RS overproduction lead to an imbalance on the redox signaling and might accelerated the development of chronic inflammatory skin disease, such as AD. Indeed, our data demonstrate that repeated DNCB challenges increased the RS levels and decreased the SOD activity in the dorsal skin of mice. On the other hand, the PSONCF treatment modulated these oxidative stress markers in DNCB-treated mice.

Although both free PSO and PSONCF treatments exhibited protective effects against the AD-like skin lesions in mice, only the PSONCF restored the biochemical parameters evaluated in this study. The nanostructured systems can be retained in the *stratum corneum* or even penetrate and permeate the inner layers of the skin tissue [75]. Particularly, in the NC, the active can be entrapped in, dispersed, dissolved or adsorbed due to their core-shell supramolecular structure [76]. In addition, is well established that the polymeric composition of the NCs shell developed in this study (Eudragit RS100) possesses great bioadhesive properties (Chaves et al, 2018), which can promote an intimate contact with the skin surface. For this reason, we believe that the PSONCF increased the residence time of the PSO in the skin tissue in comparison with PSONEF and thus, improved and prolonged its anti-inflammatory and antioxidant effects. As evidenced here, we hypothesized that the treatment with PSONCF reduced the MPO activity, indicating a decrease in the polymorphonuclear leukocytes migration to the local inflammation. The anti-inflammatory effect exerted by the PSONCF might contributed to increase the SOD activity in order to avoid the RS overproduction within the skin cells of mice exposed to DNCB. Through this study, we highlight and reinforce the role of the nanosystems, such as NC, in improving and optimizing the biological properties of the natural compounds.

Indeed, AD imposes considerable burdens upon those affected, including poor quality of life and comorbidities secondary to severe itch [77]. The presence of inflammatory mediators such as prostaglandin E<sub>2</sub>, bradykinin and arachidonic acid might trigger the hyper sensitivity of the nociceptors at the site of damage or in an adjacent tissue [78]. In the same way, the exacerbating production of oxidizing agents, such as ROS, could sensitize the nociceptive nerve ending [79]. Considering that both chronic inflammation and oxidative stress have been involved in the pathogenesis of AD, we investigated the development of a nociceptive behavior as a comorbidity of this disease. The findings of this study demonstrated that both free PSO and PSONCF treatments exhibited an antinociceptive effect by reducing the mechanical hypersensitivity in the DNCB-treated mice. It is in agreement with our previous findings, in which PSO-loaded NE reduced the nociceptive behavior of mice in tests of chemical and acute inflammatory pain, reinforcing the pharmacological actions of PSO and the advantages achieved by nanoencapsulation [21]. In this context, such evidence suggested that the severe skin inflammation induced by DNCB may damage the function of the nociceptive nerve ending, resulting on the development of the mechanical hypersensitivity related to the AD-like signs.

## 5. Conclusion

In conclusion, this work proposed the development and characterization of a novel pullulan film associated with NC and NE for the topical delivery of PSO in the treatment of AD-like lesions. The mechanical and physical properties of the films were suitable for cutaneous application, and all formulations were considered safe. The *in vivo* results demonstrated that both free PSO or PSONCF treatments ameliorated the severity of the skin lesions and the development of a nociceptive behavior associated to the AD-signs in mice. However, only the PSONCF treatment modulated the inflammatory and the oxidative stress markers evaluated in this study. Thus, we highlighted an improvement on the biological



properties of the PSO when incorporated to NC-based pullulan film and we propose this system as a promising nanocarrier-based alternative for natural compounds to AD management.

## 6. Acknowledgements

We gratefully acknowledge UFSM and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-BR) for the financial support. Verônica Ferrari Cervi was granted a CAPES masters fellowship (process number: 88882.427737/2019-01). We also would like to thank to C.B. Silva for the zetasizer access.

## 7. References

- [1] S.F. Thomsen, *ISRN Allergy*, 2014 (2014) 354250.
- [2] S. Kapur, W. Watson, S. Carr, *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14 (2018) 52.
- [3] K. Maliyar, C. Sibbald, E. Pope, R.G. Sibbald, *Advances in Skin & Wound care*, 31 (2018) 13.
- [4] M.S. Roberts, Y. Mohammed, M.N. Pastore, S. Namjoshi, S. Yousef, A. Alinaghi, I.N. Haridass, E. Abd, V.R. Leite-Silva, H. Benson, J.E. Grice, *J Control Release*, 247 (2017) 86-105.
- [5] C.B. de Mattos, D.F. Argenta, L. Melchiades Gde, M.N. Cordeiro, M.L. Tonini, M.H. Moraes, T.B. Weber, S.S. Roman, R.J. Nunes, H.F. Teixeira, M. Steindel, L.S. Koester, *Int J Nanomedicine*, 10 (2015) 5529-5542.
- [6] S.E. Minaei, S. Khoei, S. Khoei, F. Vafashoar, V.P. Mahabadi, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 101 (2019) 575-587.
- [7] M.C.L. Marchiori, C. Rigon, C. Camponogara, S.M. Oliveira, L. Cruz, *J Photochem Photobiol B*, 170 (2017) 25-32.

- [8] L. Mota Ferreira, M. Gehrcke, V. Ferrari Cervi, P. Eliete Rodrigues Bitencourt, E. Ferreira da Silveira, J. Hofstatter Azambuja, A. Prates Ramos, K. Nascimento, M. Beatriz Moretto, E. Braganhol, M. Rorato Sagrillo, L. Cruz, *Pharm Biol*, 54 (2016) 2968-2977.
- [9] C. Rigon, M.C.L. Marchiori, F. da Silva Jardim, N.S. Pegoraro, P.D.S. Chaves, M.C. Velho, R.C.R. Beck, A.F. Ourique, M.H.M. Sari, S.M. Oliveira, L. Cruz, *Eur J Pharm Sci*, 137 (2019) 104969.
- [10] Z. Amri, A. Ghorbel, M. Turki, F.M. Akrouf, F. Ayadi, A. Elfeki, M. Hammami, *BMC Complement Altern Med*, 17 (2017) 339.
- [11] B.N. Al-Sabahi, M.O. Fatope, M.M. Essa, S. Subash, S.N. Al-Busafi, F.S. Al-Kusaibi, T. Manivasagam, *Nutr Neurosci*, 20 (2017) 40-48.
- [12] S.S. Anusree, G. Sindhu, M.R. Preetha Rani, K.G. Raghu, *Biochimie*, 146 (2018) 79-86.
- [13] O. Binyamin, L. Larush, K. Frid, G. Keller, Y. Friedman-Levi, H. Ovadia, O. Abramsky, S. Magdassi, R. Gabizon, *Int J Nanomedicine*, 10 (2015) 7165-7174.
- [14] M. Yayla, D. Cetin, Y. Adali, P.A. Kilicle, E. Toktay, *Iran J Basic Med Sci*, 21 (2018) 1262-1268.
- [15] S. Bassiri-Jahromi, *Oncol Rev*, 12 (2018) 345.
- [16] S. Costantini, F. Rusolo, V. De Vito, S. Moccia, G. Picariello, F. Capone, E. Guerriero, G. Castello, M.G. Volpe, *Molecules*, 19 (2014) 8644-8660.
- [17] Y. Khajebishak, L. Payahoo, M. Alivand, B. Alipour, *J Cell Physiol*, 234 (2019) 2112-2120.
- [18] H.A. Bedel, N.T. Turgut, A.U. Kurtoglu, c. Usta, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (2017) 7.
- [19] M.A. Shabbir, M.R. Khan, M. Saeed, I. Pasha, A.A. Khalil, N. Siraj, *Lipids Health Dis*, 16 (2017) 99.
- [20] E.P. Lansky, R.A. Newman, *J Ethnopharmacol*, 109 (2007) 177-206.

- [21] L.M. Ferreira, M.H.M. Sari, V.F. Cervi, M. Gehrcke, A.V. Barbieri, V.A. Zborowski, R.C.R. Beck, C.W. Nogueira, L. Cruz, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 144 (2016) 214-221.
- [22] L.M. Ferreira, V.F. Cervi, M. Gehrcke, E.F. da Silveira, J.H. Azambuja, E. Braganhol, M.H. Sari, V.A. Zborowski, C.W. Nogueira, L. Cruz, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 130 (2015) 272-277.
- [23] S. Karki, H. Kim, S.-J. Na, D. Shin, K. Jo, J. Lee, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (2016) 559-574.
- [24] J.O. Morales, J.T. McConville, *Eur J Pharm Biopharm*, 77 (2011) 187-199.
- [25] N.O. Alves, G.T. da Silva, D.M. Weber, C. Luchese, E.A. Wilhelm, A.R. Fajardo, *Carbohydr Polym*, 148 (2016) 115-124.
- [26] G.G. Pereira, S.S. Guterres, A.G. Balducci, P. Colombo, F. Sonvico, *Biomed Res Int*, 2014 (2014) 641590.
- [27] L. Baoyong, Z. Jian, C. Denglong, L. Min, *Burns*, 36 (2010) 891-896.
- [28] Z. Hussain, H.E. Thu, A.N. Shuid, H. Katas, F. Hussain, *Curr Drug Targets*, 19 (2018) 527-550.
- [29] D. Zhang, W. Zhou, B. Wei, X. Wang, R. Tang, J. Nie, J. Wang, *Carbohydr Polym*, 125 (2015) 189-199.
- [30] A.R. Fajardo, L.C. Lopes, A.O. Caleare, E.A. Britta, C.V. Nakamura, A.F. Rubira, E.C. Muniz, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33 (2013) 588-595.
- [31] M.A. Mofazzal Jahromi, P. Sahandi Zangabad, S.M. Moosavi Basri, K. Sahandi Zangabad, A. Ghamarypour, A.R. Aref, M. Karimi, M.R. Hamblin, *Adv Drug Deliv Rev*, 123 (2018) 33-64.
- [32] J.H. Han, *Edible Films and Coatings, Innovations in Food Packaging*, 2014, pp. 213-255.
- [33] R.S. K, P. V, *Carbohydr Polym*, 173 (2017) 573-591.
- [34] J.I. Horinaka, Y. Hashimoto, T. Takigawa, *Int J Biol Macromol*, 118 (2018) 584-587.

- [35] J.A. de Lima, T.C. Paines, M.H. Motta, W.B. Weber, S.S. Dos Santos, L. Cruz, C.B. da Silva, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 79 (2017) 886-893.
- [36] J. Wu, F. Zhong, Y. Li, C.F. Shoemaker, W. Xia, *Food Hydrocolloids*, 30 (2013) 82-91.
- [37] V.D. Prajapati, A.M. Chaudhari, A.K. Gandhi, P. Maheriya, *Int J Biol Macromol*, 107 (2018) 2075-2085.
- [38] H. Li, Y. Xue, B. Jia, Y. Bai, Y. Zuo, S. Wang, Y. Zhao, W. Yang, H. Tang, *Carbohydr Polym*, 188 (2018) 92-100.
- [39] U. Siemann, *Solvent cast technology – a versatile tool for thin film production*, *Scattering Methods and the Properties of Polymer Materials*, 2005, pp. 1-14.
- [40] F. Notario-Perez, A. Martin-Illana, R. Cazorla-Luna, R. Ruiz-Caro, L.M. Bedoya, J. Pena, M.D. Veiga, *Int J Pharm*, 570 (2019) 118643.
- [41] P. Minghetti, F. Cilurzo, A. Casiraghi, *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 3 (2004) 14.
- [42] D. Mukherjee, S. Bharath, *ISRN Pharm*, 2013 (2013) 604690.
- [43] A. D882, *ASTM International*, D882 (2018) 10.
- [44] T. De Vringer, in: *U.S. Patent (Ed.)*, United States of America, 1997, pp. 11.
- [45] C.C. Chan, C.J. Liou, P.Y. Xu, J.J. Shen, M.L. Kuo, W.B. Len, L.E. Chang, W.C. Huang, *J Dermatol Sci*, 72 (2013) 149-157.
- [46] G.T. Voss, R.L. Oliveira, J.F. de Souza, L.F.B. Duarte, A.R. Fajardo, D. Alves, C. Luchese, E.A. Wilhelm, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 84 (2018) 90-98.
- [47] R.N. Walsh, R.A. Cummins, *Psychological Bulletin*, 83 (1976) 23.
- [48] G.G. Vivancos, W.A. Verri Jr., T.M. Cunha, I.R.S. Schivo, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37 (2004) 9.
- [49] G. Park, M.S. Oh, *Exp Toxicol Pathol*, 66 (2014) 97-101.
- [50] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 7.

- [51] K. Suzuki, H. Ota, S. Sasagawa, T. Sakatani, T. Fujikura, *Analytical Biochemistry*, 132 (1983) 8.
- [52] S.L. Hempel, G.R. Buettner, Y.O. O'Malley, D.A. Wessels, D.M. Flaherty, *Free Radic Biol Med*, 27 (1999) 14.
- [53] H.P. Misra, I. Fridovich, *The Journal of Biological Chemistry*, 247 (1972) 7.
- [54] G. Zhu, L. Sheng, Q. Tong, *Food Hydrocolloids*, 35 (2014) 341-347.
- [55] J. Antoniou, F. Liu, H. Majeed, H.J. Qazi, F. Zhong, *Carbohydr Polym*, 111 (2014) 359-365.
- [56] A. Chandra, A.D. Chondkar, R. Shirodkar, S.A. Lewis, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47 (2018) 259-267.
- [57] L.M. Ferreira, M.H.M. Sari, J.H. Azambuja, E.F. da Silveira, V.F. Cervi, M.C.L. Marchiori, S.S. Maria-Engler, M.R. Wink, J.G. Azevedo, C.W. Nogueira, E. Braganhol, L. Cruz, *Investigational New Drugs*, 38 (2019) 662-674.
- [58] A. Machado, C. Cunha-Reis, F. Araujo, R. Nunes, V. Seabra, D. Ferreira, J. das Neves, B. Sarmiento, *Acta Biomater*, 44 (2016) 332-340.
- [59] F. Eudier, G. Savary, M. Grisel, C. Picard, *Adv Colloid Interface Sci*, 264 (2019) 11-27.
- [60] L.M. Cordenonsi, A. Faccendini, M. Catanzaro, M.C. Bonferoni, S. Rossi, L. Malavasi, R.P. Raffin, E.E.S. Schapoval, C. Lanni, G. Sandri, F. Ferrari, *International Journal of Pharmaceutics*, 567 (2019) 10.
- [61] J.G. Galvão, G.G.G. Trindade, A.J. Santos, R.L. Santos, A.B. Chaves Filho, A.A.M. Lira, S. Miyamoto, R.S. Nunes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123 (2015) 941-948.
- [62] L. Montenegro, C. Parenti, R. Turnaturi, L. Pasquinucci, *Pharmaceutics*, 9 (2017).
- [63] A. Batista-Duharte, G. Jorge Murillo, U.M. Perez, E.N. Tur, D.F. Portuondo, B.T. Martinez, D. Tellez-Martinez, J.E. Betancourt, O. Perez, *Int J Toxicol*, 35 (2016) 627-633.

- [64] M.F. Dario, C.A. Oliveira, L.R.G. Cordeiro, C. Rosado, I.d.F.A. Mariz, E. Maçôas, M.S.C.S. Santos, M.E. Minas da Piedade, A.R. Baby, M.V.R. Velasco, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506 (2016) 591-599.
- [65] S. Singh, M. Singh, C.B. Tripathi, M. Arya, S.A. Saraf, *Drug Deliv Transl Res*, 6 (2016) 38-47.
- [66] B. Yingngam, A. Chiangsom, P. Pharikarn, K. Vonganakasame, V. Kanoknitthiran, W. Rungseevijitprapa, C. Prasitpuriprecha, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53 (2019).
- [67] G.D. Sousa, I.M.F.S. Dantas, D.P. De Santana, L.B. Leal, *Cosmetics*, 5 (2018).
- [68] R.V. Contri, I.C. Kulkamp-Guerreiro, S.J. da Silva, L.A. Frank, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, *AAPS PharmSciTech*, 17 (2016) 863-871.
- [69] S. Weidinger, N. Novak, *The Lancet*, 387 (2016) 1109-1122.
- [70] H. Jin, R. He, M. Oyoshi, R.S. Geha, *J Invest Dermatol*, 129 (2009) 31-40.
- [71] T. Werfel, J.P. Allam, T. Biedermann, K. Eyerich, S. Gilles, E. Guttman-Yassky, W. Hoetzenecker, E. Knol, H.U. Simon, A. Wollenberg, T. Bieber, R. Lauener, P. Schmid-Grendelmeier, C. Traidl-Hoffmann, C.A. Akdis, *J Allergy Clin Immunol*, 138 (2016) 336-349.
- [72] N.A. Slater, D.S. Morrell, *Clin Dermatol*, 33 (2015) 289-299.
- [73] P. Steullet, J.H. Cabungcal, A. Monin, D. Dwir, P. O'Donnell, M. Cuenod, K.Q. Do, *Schizophr Res*, 176 (2016) 41-51.
- [74] H.W. Yum, S.H. Kim, J.X. Kang, Y.J. Surh, *Biochem Biophys Res Commun*, 502 (2018) 1-8.
- [75] S.S. Guterres, M.P. Alves, A.R. Pohlmann, *Drug Target Insights*, 2 (2007) 11.
- [76] L.A. Frank, R.V. Contri, R.C. Beck, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 7 (2015) 623-639.

[77] P.M. Brunner, J.I. Silverberg, E. Guttman-Yassky, A.S. Paller, K. Kabashima, M. Amagai, T.A. Luger, M. Deleuran, T. Werfel, K. Eyerich, G. Stingl, C. Councilors of the International Eczema, *J Invest Dermatol*, 137 (2017) 18-25.

[78] A.M. Binshtok, H. Wang, K. Zimmermann, F. Amaya, D. Vardeh, L. Shi, G.J. Brenner, R.R. Ji, B.P. Bean, C.J. Woolf, T.A. Samad, *J Neurosci*, 28 (2008) 14062-14073.

[79] D. Salvemini, J.W. Little, T. Doyle, W.L. Neumann, *Free Radic Biol Med*, 51 (2011) 951-966.





***MANUSCRITO 2: A NOVEL NANOTECHNOLOGICAL MUCOADHESIVE AND FAST-DISSOLVING FILM FOR VAGINAL DELIVERY OF CLOTRIMAZOLE: DESIGN, PHYSICODYNAMIC CHARACTERIZATION AND IN VITRO ANTIFUNGAL ACTION.***



**A novel nanotechnological mucoadhesive and fast-dissolving film for vaginal delivery of Clotrimazole: design, physicydynamic characterization and *in vitro* antifungal action**

Verônica Ferrari Cervi<sup>1</sup>, Camila Parcianello Saccol<sup>1</sup>; Ticiane da Rosa Pinheiro<sup>2</sup>, Jessica Mendes Nadal<sup>3</sup>, Paulo Vitor Farago<sup>3</sup>, Roberto Christ Vianna Santos<sup>2</sup>, Marcel Henrique Marcondes Sari<sup>1</sup>, Letícia Cruz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Oral, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, CEP 84030-900 PR, Brazil.

\*Corresponding author:

Letícia Cruz

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 3220 9373

E-mail: [leticiaacruz@smail.ufsm.br](mailto:leticiaacruz@smail.ufsm.br)

**Abstract**

In this study, pullulan (PUL) nano-based films containing Clotrimazole (CTZ) were developed for the treatment of vulvovaginal candidiasis (VVC). The CTZ nanocapsules (CTZ-NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymer and polymeric films were developed by the solvent casting method. The nanocapsules (NCs) were evaluated by means of average diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), pH, encapsulation efficiency (EE) and mucoadhesive properties. The results showed that the NCs average diameter was around  $163 \pm 4$  nm, with PDI values up to  $0.1 \pm 0.01$  and ZP positively charged ( $+ 43.5 \pm 0.7$  mV). The pH was in the acid range ( $5.14 \pm 0.12$ ) and EE was around 99.6%. The films homogeneity and drug content, thickness and weight, stability and safety were also assessed. The nanoencapsulation of CTZ promoted higher values of homogeneity to the film (91%) and weight and thickness were around  $0.0875 \pm 0.01$  g and  $154 \pm 0.02$  mm, respectively. The stability studies displayed a stable polymeric film formulation with nanoencapsulated CTZ (CTZ-NC-PUL) in refrigeration conditions as well as non-irritant. Furthermore, drug release, mucoadhesive strength, adherence and disintegration time, permeation and *in vitro* antifungal activity were also evaluated. The results showed that the CTZ-NC-PUL promoted a controlled release of the drug (60% in 24h) in comparison to CTZ-PUL (100% in 8 h). The permeation results corroborate with the drug release, where higher amounts of CTZ were found both in the mucosa and the receptor medium for CTZ-PUL ( $21.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $4.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in comparison to CTZ-NC-PUL ( $5.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $3.74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). The films were fast dissolving (10 min), and CTZ-NC-PUL presented higher mucoadhesive properties in comparison to CTZ-PUL. The antifungal activity against *Candida albicans* was maintained and the film *in vitro* efficacy was proved. In conclusion, CTZ-NC-PUL formulation was considered promising and suitable for vaginal application against candida-related infections.

**Key words:** pullulan, nanoparticles, pomegranate seed oil, fungal infections, antifungal, candidiasis.

## 1. Introduction

Films are pharmaceutical forms that have gained relevance in late years as an adaptable drug delivery system for different administration routes, such as oral, topical, vaginal and ophthalmic [1]. They can distinguish from other pharmaceuticals due to their high stability, dose accuracy, portability, effortless application and low cost, being characterized as convenient, patient friendly products [2]. Recently, our research group developed a nano-based pullulan (PUL) film containing pomegranate seed oil (PSO) for the treatment of atopic dermatitis (unpublished data). In this work, for the first time, PSO nanoemulsions (NE) and nanocapsules (NC) were incorporated to a PUL film with the purpose of exploit PSO antioxidant and anti-inflammatory well described properties when associated with nanotechnology [3–5] in an atopic dermatitis-like animal model. As a result, both free PSO and the PUL film containing PSO NC (PSONCF) were able to ameliorate the skin injuries and mechanical hypernociception in mice. Nonetheless, only PSONCF was capable of modulating inflammatory parameters and biochemical markers of tissue oxidative status, reinforcing the importance of the nanotechnological approach to optimize the biological properties of PSO. Therefore, according to such results, it was possible to observe the film potentiality for other applications, hypothesizing, in the future, its vaginal administration using clotrimazole (CTZ) as a model drug to study the applicability in vulvovaginal candidiasis (VVC) treatment.

VVC is a common infection caused by *Candida* sp. that emerged as one of the most common pathogens, being responsible for 85 to 95% of the vulvovaginal infections. The VVC symptoms include vaginal soreness, pain and discomfort when urinating and abnormal vaginal discharge. Nearly 8% of women affected can present recurrent VVC, which corresponds to 4 or more episodes per year and therefore, representing an important health problem for women worldwide. Currently, VVC represents the main reason for gynecological appointments [6].

The most commonly used antifungal drugs for *Candida* infections are the class of azoles (CTZ, fluconazole, itraconazole, ketoconazole), amphotericin B and nystatin, but among all, the combination of orally administered fluconazole and topically applied CTZ are the most popular treatment [7]. Usually the treatment of uncomplicated VVC is achieved with a short course therapy and single-dose oral administration of fluconazole. However, complicated or recurrent VVC cases require a multiple-dose extensive treatment, that can interfere in patient welfare and compliance [8]. Topical treatment with CTZ can be achieved by different pharmaceutical forms, such as semisolid formulations and vaginal tablets and ovulus. Nevertheless, CTZ cream is the most popular available forms [9]. Previously, a Pemullen

TR1/PUL blended hydrogel containing CTZ NC for vaginal application was developed [10]. The hydrogels were mucoadhesive and provided a controlled release profile for the drug, presenting the advantages of CTZ association with a nanosystem that was, in conclusion, suitable for the suggested application. However, such semisolid would require a plastic applicator that is very discomforting, increases manufacturing costs and contributes to environmental pollution. In addition, a cream or a gel are most likely to leak and have lower stability in comparison to solid formulations [11]. Therefore, the combination of nanotechnology and polymeric films are a very promising and well accepted course of treatment [12].

In this context, NC are well described in the literature as drug delivery platforms that can be advantageous in the treatment of several illness conditions, such as fungal infections [13,14]. The NC composition is an oily core surrounded by a polymeric shell, where the drug can be absorbed, dissolved or dispersed [15]. The association of this nanosystems with antifungal agents is widely studied, as a previous work of our research group. Santos and co-workers (2013, 2014) investigated CTZ incorporation into a NC formulation, as well as the coconut oil association in the core-shell of the formulations against *Candida* sp. *in vitro* [16,17]. Both developed NC presented promising results and were considered a suitable alternative for the treatment of VVC. With this in mind, the aim of this work was to develop a formulation of CTZ Eudragit RS100 NC containing PSO and incorporate it in a PUL film. This formulation was evaluated regarding its physicochemical stability in different storage conditions, *in vitro* safety, mucoadhesive properties and disintegration time as well as its antifungal activity *in vitro* against *Candida albicans*.

## **2. Materials and methods**

### 2.1 Materials

CTZ was acquired from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). PUL was donated by Hayashibara. PSO was purchased from Florien (São Paulo, Brazil). Span 80<sup>®</sup> (sorbitan monooleate) and porcine mucin type II were purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Eudragit RS100 was kindly donated by Evonik (São Paulo, Brazil). Sorbitol was obtained from Delaware (São Paulo, Brazil) and PEG 400 was acquired from Labimpex (São Paulo, Brazil). The Sabouraud Dextrose broth and Mueller Hinton agar were obtained by Kasvi (Paraná, Brazil). All other solvents and reagents were from analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

## 2.2 Preparation and characterization of PSO CTZ-loaded NC (CTZ-NC)

CTZ-NC was prepared by interfacial deposition of preformed polymer method, described by Marchiori and collaborators (2017), where an organic phase composed by PSO (3.0 w/v%), Span 80<sup>®</sup> (0.1925 g), Eudragit RS100<sup>®</sup> (0.25 g) and CTZ (0.025g) was solubilized in acetone (125 mL) and kept under magnetic stirring for 1 h at 40°C. After, the organic phase was injected into a PUL (0.1925 g) aqueous phase (125 mL) and homogenized for 10 min. Then, the organic solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure. The formulation was concentrated at 1 mg/mL CTZ content in 25 mL of final volume.

The nanostructure suspension was characterized by means of average diameter and polydispersity index (PDI) in ultrapure water (dilution 1:500) via photon correlation spectroscopy and zeta potential (ZP) by electrophoretic light scattering in NaCl 10 mM (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK). The granulometric distribution was performed by laser diffraction (Mastersizer<sup>®</sup> 3000E, Malvern Instruments, United Kingdom) after diluting CTZ-NC samples in distilled water until it reached a laser obscuration of 15%. A refractive index of 1.38 was used to perform the analysis. The pH was measured by directly insertion of a calibrated electrode into the formulations (Tecnoion, Brazil). Measurements were performed at room temperature (25±2 °C) in triplicate.

## 2.3 Analytical procedures

The CTZ quantification was performed on a LC-10A high performance liquid chromatography system (HPLC) (Shimadzu, Japan) equipped with a LC-20AT pump, a UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a SIL-20A HT valve sample automatic injector. Separation was achieved at room temperature using an Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm, 5µm) coupled with a C<sub>18</sub> guard column. The isocratic mobile phase consisted of methanol and water (80:20, v/v) at 1 mL/min flow rate. CTZ was detected at 229 nm. The method for quantification in NC was validated in agreement with the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. The methodology was linear ( $r = 0.9997$ ) in the concentration range of 5 – 25 µg/mL, specific, precise and robust (variation coefficient < 5%).

## 2.4 CTZ content and encapsulation efficiency (EE) in the NC

The CTZ content in the NC was determined by the HPLC method described above (Section 2.3). For this, 150 µL of CTZ-NC were diluted in 10 mL of methanol, taken to the

vortex for 3 min, filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane and injected into the HPLC system for analysis. For EE determination, an aliquot of the NC suspension (300  $\mu\text{L}$ ) was placed in a 10,000 MW centrifugal device (Amicon<sup>®</sup> Ultra, Millipore) and the free drug was separated by ultrafiltration/centrifugation technique (20 min at 3,000 g). The results were expressed as percentage of the drug associated to the NC, which was determined by the difference between the total and the free drug amounts.

### 2.5 Preparation of CTZ films

PUL films were prepared as described in a previous work of our group (Cervi et al, 2020). Briefly, PUL (6% w/w) was dispersed in CTZ-NC (1 mg/mL) and kept under magnetic stirring (50°C). After homogeneity, 6.5% (w/w) sorbitol was added as plasticizer and mixed until total dispersion. This formulation was nominated CTZ-NC-PUL. For comparison purposes, unloaded CTZ films were also developed (CTZ-PUL), in which 25 mg of CTZ was dissolved in ethanol (2.5% v/v) and posteriorly added to a PUL/sorbitol dispersion in water. The films were taken to the oven for 24 h at 50°C.

### 2.6 Drug content and homogeneity of the films

For CTZ extraction from the films, 1.0 x 1.0 cm sections were cut and previously weighted. The film square was placed in a volumetric flask (25.0 mL) dispersed in 5.0 mL of distilled water and kept under magnetic stirring for 10 min. Then, methanol was added and the system was agitated for another 20 min. The flask was taken to the vortex for 3 min and after, the dispersion was centrifuged for 15 min at 3,000 rpm (MTDIII PLUS, Servylab, RS, Brazil). The final solution was then filtered through 0.45 $\mu\text{m}$  membrane and injected in the HPLC equipment for quantification. The evaluation was performed in triplicates. The drug homogeneity in the films was assessed in 3 sections of each film lot quantified with the same methodology. CTZ-PUL was also evaluated for comparison reasons.

### 2.7 *In vitro* release assay

The CTZ *in vitro* release from CTZ-NC, CTZ-NC-PUL, CTZ-PUL and CTZ solution was carried out using the dialysis bag diffusion technique. Film formulations (cut section 2.0 x 2.0 cm) were placed in the dialysis bag (Sigma Aldrich, cellulose membrane 43 mm) and humidified with 200  $\mu\text{L}$  of acetate buffer (pH 4.5). The NC suspensions as well as a methanolic solution (1.0 mL) of CTZ were also placed in the bag (Sigma Aldrich, cellulose membrane 10 mm), and the system was immersed in 100.0 mL of pH acetate buffer with 30% of ethanol to



maintain the sink conditions. The medium was kept under continuous magnetic stirring at 37°C. At predetermined intervals, 500 µL aliquots of the medium were withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium. The percentage of drug released was determined using the HPLC conditions mentioned previously (50µL). The experiment was performed in triplicates (n=3).

### 2.8 Stability studies

The NC suspensions (in amber glass flasks) and polymeric films (cut sections 1.0 x 1.0 cm placed in an aluminum sachet) were stored protected from light at room temperature (25°C) or at 4°C in a refrigerator (Consul, Brazil). The NC suspensions were evaluated regarding drug content, particle size, PDI and ZP whereas polymeric films were assessed in means of drug content. The study was carried out over 120 days, in triplicate (n=3).

### 2.9 In vitro safety evaluation

The Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) was performed to evaluate the irritation potential of the formulations. Fertilized chicken eggs incubated at  $37^{\circ}\pm 0.5$  C with a relative humidity of  $65\pm 2\%$  for 10 days were obtained from Languiru (Teutônia, Brazil). To expose the chorioallantoic membrane (CAM), the eggshell was removed. Saline solution (0.9% NaCl w/v) and 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) were used as negative and positive control, respectively. CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL were cut into 2 x 1 cm stripes and placed on the CAM surface. For the CTZ-NC, 500 µL were placed in contact with the CAM and after 20 s, the formulation was removed with saline solution. The CAM was observed for 5 minutes for all samples to determine the occurrence of any irritation effects in the CAM blood vessels (coagulation, lysis or hemorrhage). The assay was carried out in quintuplicate (n=5) and the results were photodocumented.

### 2.10 In vitro disintegration time

In order to determine the films disintegration time, a previously described method with adaptations was applied (Machado et al, 2016; Cunha-Reis et al, 2016). A simulated vaginal fluid (SVF) was used, containing water, 0.5% glucose, 0.351% sodium chloride, 0.2% lactic acid, 0.014% potassium hydroxide, 0.01% acetic acid, 0.04% urea, 0.022% calcium hydroxide, 0.016% glycerin, with adjusted pH of 4.2. Film sections (1.5 x 1.5 cm) were immersed in 2.0 mL of preheated SVF (37°C) and incubated under 20 rpm orbital shaking. The time required for complete disintegration was visually determined, which was considered when there was no

residue or only a soft mass, with no touchable film (Rezaee and Ganji, 2018). The films influence in the SVF solution pH was measured in the end of the experiment with a calibrated potentiometer (Tecnopon, Brazil). The results were expressed in minutes and the experiment was performed in triplicate (n=3).

### 2.11 Animal vaginal mucosa

In order to evaluate mucoadhesive properties and permeation/penetration studies, cow vaginal mucosa was used and obtained from a local slaughterhouse (Frigorífico Silva, Santa Maria, RS, Brazil). The mucosa was carefully separated from adjacent tissues and cut to appropriate sizes required for both experiments. The fragments were kept in the freezer at -18°C until performance [10,18].

### 2.12 Washability test

The falling liquid film or washability test, from Nielsen and co-workers was performed with some modifications [10,19]. The cow vaginal mucosa was placed in a cylindrical tube longitudinally cut (30 cm) and placed in an acrylic box. The film formulations (2.0 x 2.0 cut sections) were deposited in the mucosa surface and acetate buffer (pH 4.5 – 37°C) flowed through the mucosa from a peristaltic pump at a 0.21 L/h for 10 min. The effluent (not adhered film) was collected in a beaker receptor and CTZ was quantified by HPLC. The results were expressed in percentage adhered of the films based on the quantified values of CTZ. The evaluation was performed five times (n=5).

### 2.13 Mucoadhesion studies

#### *2.13.1 Determination of the mucoadhesive potential of the NC*

The mucoadhesive properties of CTZ-NC were evaluated by the mucin particle method described by Takeuchi et al (2005). Porcine mucin type II was dispersed in ultrapure water (0.1% w/w) and also in an NaCl solution (0.1 M). The NC suspensions were diluted in the dispersions (1:500), where the average particle size and zeta potential were determined by electrophoretic light scattering (ZetaSizer, Malvern Instruments, UK.)

#### *2.13.2 Mucoadhesive strength evaluation of the polymeric films*

The mucoadhesive properties of the polymeric films were evaluated on a modified two-arm physical balance, as described in the Kalyanwat, Shrivastava and Pathak method (2016)

[20]. The cow vaginal mucosa was carefully defrosted (5.0 x 4.5 cm cut section dimension) and the experiment was performed in quadruplicate (n=4). In one end of the physical balance, a falcon tube was placed and used to receive water volumes. In the other end, the mucosa circle cut section was attached on the rubber stop and put in contact with the polymeric film sample to be analyzed. CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL were placed under the mucosa and humidified with 100  $\mu$ L of acetate buffer (pH 4.5), where its contact was facilitated for 120 s under 1 N force. After, the volume of water required to detach the film from the skin surface was used to calculate the mucoadhesive strength, as shown in the equation below:

$$\text{Eq. (1): mucoadhesive strength (dyne/cm}^2\text{)} = (\text{Weight of detachment} \times \text{Gravity acceleration}) / \text{Area of tissue exposed}$$

#### 2.14 *In vitro* permeation studies

The CTZ permeation from the polymeric films was performed using vertical Franz diffusion cells at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (n=6) and cow vaginal mucosa as biological barrier. The mucosa was prepared as mentioned in section 2.12. The receptor medium consisted of acetate buffer pH 4.5, which was kept under magnetic stirring. The pH of the media was selected taking into account the characteristics of vaginal tissue, which presents pH values around the acid range. Cut sections of 1.0 x 1.0 cm were applied to the mucosa surface and humidified with 100  $\mu$ L of buffer. After 8 h, a medium aliquot was collected from the receptor compartment to analyze if the drug permeated the membrane. The mucosa was removed and chopped into smaller fragments. The drug extraction was performed with 5 mL of methanol, 3 min vortexed and 15 min in the ultrasonic bath. The samples were filtered through a 0.45  $\mu$ m cellulose membrane and injected (50  $\mu$ L) into de HPLC system, with the method described in section 2.3.

#### 2.15 Antifungal activity *in vitro*

The *in vitro* antifungal test was performed by disk diffusion as described by M44-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol, with modifications. *Candida albicans* (ATCC 14053) strain from the Laboratory of Oral Microbiology (LAPEMICRO - UFSM) yeast bank were used. For isolation and purification, the strains were sown in Sabouraud dextrose broth at  $37^\circ\text{C}$  for 24h. After growth, they were inoculated on Sabouraud dextrose agar at  $37^\circ\text{C}$  for 24h in order to guarantee the strains purity and turbidity on McFarland scale 1 was standardized in test tubes containing 0.9% sodium chloride. With a sterile swab, the strains were seeded in petri dishes containing Mueller Hinton agar supplemented with 2% glucose. The CTZ-NC-PUL, CTZ-PUL and pure PSO were tested for antifungal activity. Films

containing PSO NC without CTZ (PSO-NC-PUL) and PUL alone (VEHICLE film) were also tested. A PUL film containing ethanol (2.5% v/v) was challenged for comparison reasons (EtOH-PUL). The formulations were added under the middle surface with the aid of sterile forceps. The plates were incubated at 37°C for 24h. After incubation, the development of inhibition zones were visually observed and measured. The assay was conducted in triplicate (n=3) and the results were expressed both by photodocumentation and millimeters of inhibition zones.

### 2.16 Statistical analysis

The normality was assessed by D'Agostino test followed by statistical test. All data collected were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for a minimum of three replicates ( $n \geq 3$ ). The statistical analysis was determined by Graph Prism<sup>®</sup> software version 6. The statistical analysis was calculated using unpaired Student's test or variance analysis One-way ANOVA of ordinary or repeated measures followed by Tukey test, when appropriate. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## **3. Results**

### 3.1 NC characterization

The CTZ-NC presented an average diameter in the nanometric scale ( $163 \pm 4$  nm), with PDI values up to  $0.1 \pm 0.01$  and ZP positively charged ( $+ 38.8 \pm 1.0$  mV). The pH was in the acid range ( $5.14 \pm 0.12$ ), the CTZ content was 1.0 mg/mL and EE was around 99.6%, close to theoretical. The laser diffraction analysis demonstrated that 50% of the particles size were below  $551 \pm 0$  nm and the volume-weighted mean diameter ( $D_{4,3}$ ) was  $562 \pm 0$  nm, with SPAN values below 2.0.

### 3.2 Drug content and homogeneity of the films

The CTZ-NC-PUL presented drug content of 91.0%, which corresponds to  $22.75 \pm 2.02$  mg, close to the theoretical values (25 mg), and 77.3% for CTZ-PUL, which corresponds to  $18.80 \pm 11.05$  mg ( $p < 0.0001$ ). The weight and thickness of the film squares was around  $0.0875 \pm 0.01$  g and  $154 \pm 0.02$   $\mu$ m for CTZ-NC-PUL, and  $0.0444 \pm 0.01$  g and  $165 \pm 0.01$   $\mu$ m for CTZ-PUL. The weight of CTZ-NC-PUL was greater than CTZ-PUL, mostly because the formulation composition is different, with extra substances such as the polymer Eudragit RS100 ( $p < 0.0001$ ).

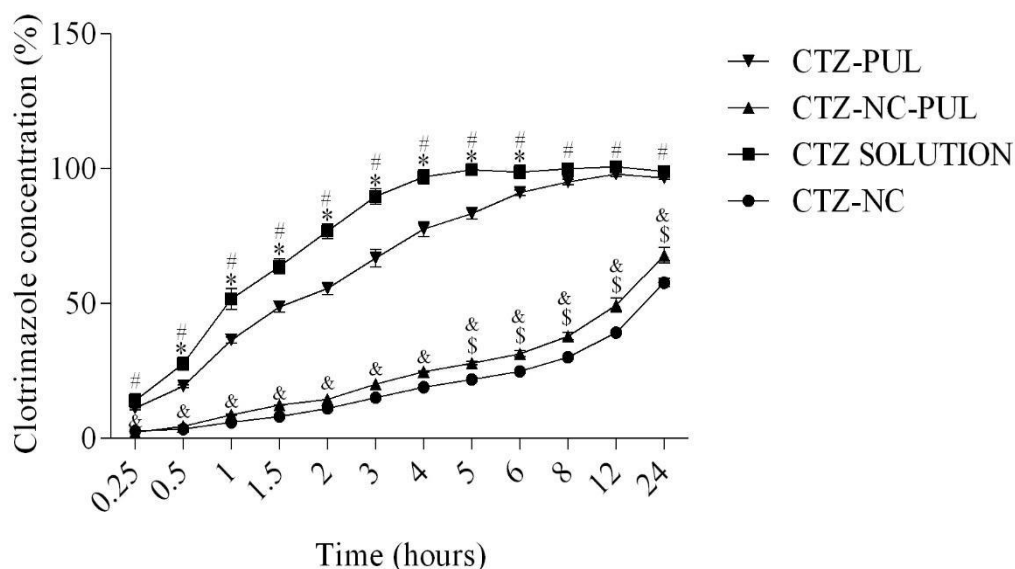
**Tab. 1.** Homogeneity evaluation of the films. Weight, thickness and drug content of the film square (1.0 x 1.0 cm) n=3.

Formulation	Weight (g)	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Drug content (%)
CTZ-NC-PUL	0.0875 $\pm$ 0.01	154 $\pm$ 0.02	91.0 $\pm$ 2.0
CTZ-PUL	0.0444 $\pm$ 0.01	165 $\pm$ 0.01	77.3 $\pm$ 11.4

### 3.3 *In vitro* release assay

As shown in **Fig. 1**, there was significant difference between CTZ-NC and CTZ solution in 15 min of experiment (2.7 and 14.1%, respectively). CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL also presented significant difference (2.4 and 11.3%, respectively). Within 30 min, CTZ-PUL showed significant difference of release profile when compared to CTZ solution (19.4 and 27.8%, respectively). Such behavior remained identical until 5 h, when CTZ-NC-PUL and CTZ-NC presented significant difference of release, whereas CTZ solution released up to 100% of CTZ. In 8 h of experiment, CTZ-PUL released 100% and remained in plateau, alongside CTZ solution. CTZ-NC-PUL and CTZ-NC released approximately 60% drug in 24 h.

**Figure 1.** *In vitro* release of CTZ from CTZ-NC, CTZ-PUL, CTZ-NC-PUL and CTZ solution in acetate buffer pH 4.5 + EtOH 30%.



The statistical test was performed using One-way ANOVA followed by Tukey's test. (&) shows the initial difference between CTZ-NC and CTZ solution; (\$) CTZ-NC and CTZ-NC-PUL; (\*) significant difference between CTZ-PUL and CTZ solution; (#) significant difference between CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL ( $p < 0.0001$ ).

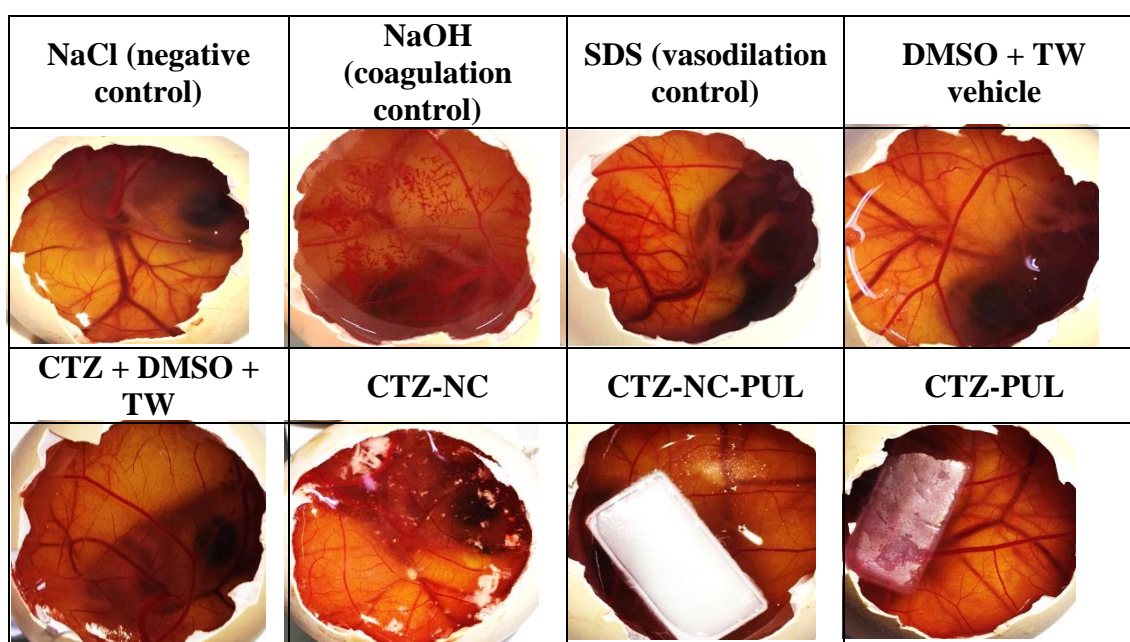
### 3.4 Stability studies

After 4 months, the aqueous suspension had NC particle size, PDI and ZP unaltered ( $p>0.05$ ). However, drug content was 76.06% under refrigeration and 49.90% in cabinet storage ( $p<0.05$ ). For CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL, the drug content was significantly different between the formulations, which was around 93.68% and 72.9% under refrigeration and 86.78% and 68.55% in cabinet storage, respectively ( $p<0.0005$ ).

### 3.5 *In vitro* safety evaluation

After the CAM exposure to the formulations, coagulation and vasodilation were observed for NaOH and SDS positive controls, respectively. Coagulation, lysis and hemorrhage were not detected for any other formulation evaluated in the chorioallantoic membrane (**Fig. 2**).

**Figure 2.** Hen's Egg Test on the chorioallantoic membrane assay. Both NaOH and SDS presented signs of irritancy as positive controls of coagulation and vasodilation.



No signs of irritancy potential were observed for DMSO+TW; CTZ-NC; CTZ-NC-PUL; CTZ-PUL and NaCl. **Abbreviations:** SDS – Sodium Dodecyl Sulfate; TW – Tween 80; DMSO - Dimethylsulfoxide.

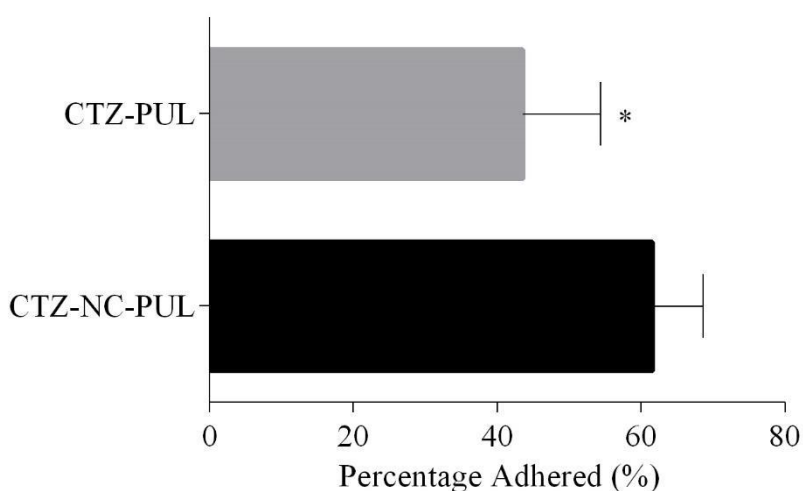
### 3.6 *In vitro* disintegration time

The disintegration time in SVF was 10 and 8 min for CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL, respectively. The pH of the SVF was measured after the assay and remained unaltered, with values of 4.5.

### 3.7 Falling liquid film method

The percent adhered of the formulation in the vaginal cow mucosa was evaluated by the falling liquid film method. For CTZ-NC-PUL,  $61.6\pm 3.2\%$  remained adhered, whereas CTZ-PUL presented  $43.6\pm 5.4\%$  adherence, both significantly different from each other ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 3**).

**Figure 3.** Percentage of adherence in the falling liquid method.

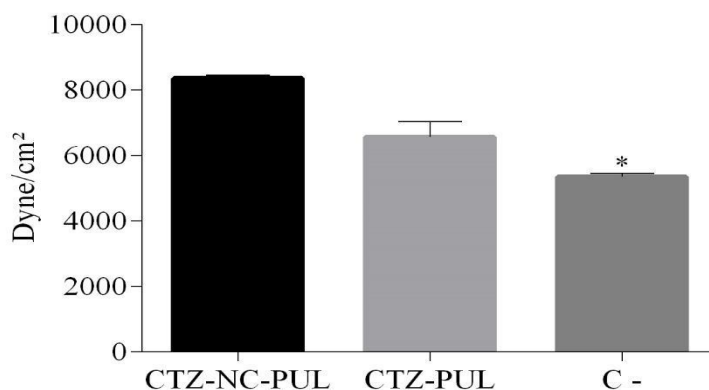


The statistical test was performed using unpaired Student's t test (\*) significant difference between CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL ( $p < 0.05$ ).

### 3.8 Mucoadhesion studies

In the mucoadhesive potential determination of the NC, an interaction between NCs and the mucin dispersion was observed in the electrophoretic light scattering analysis. The average particle size and the PDI increased from  $171\pm 0.4$  nm to  $747\pm 79$  nm ( $p < 0.0001$ ) and  $0.15\pm 0.05$  to  $0.63\pm 0.09$  ( $p < 0.05$ ), respectively. The ZP reversed its charge from  $+32.00 \pm 1.56$  mV to  $-5.20\pm 0.07$  mV ( $p < 0.0001$ ).

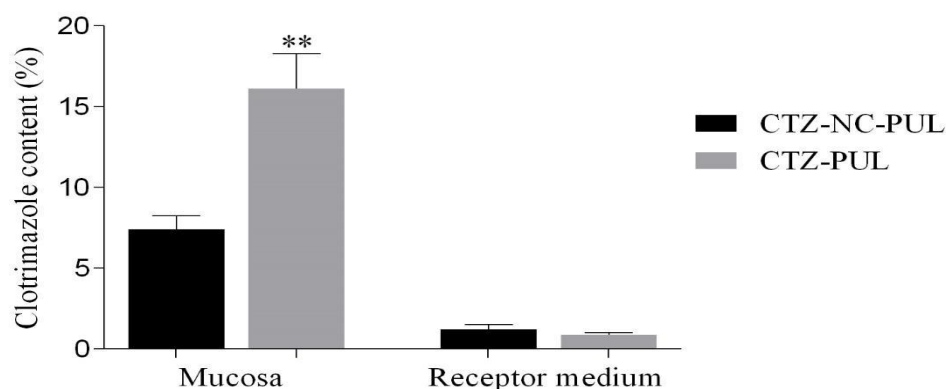
The mucoadhesive strength evaluation of the films is shown in **Fig. 4**, where CTZ-NC-PUL showed higher values of mucoadhesion ( $8364\pm 90$  dyne/cm<sup>2</sup>) when compared to CTZ-PUL ( $6575\pm 270$  dyne/cm<sup>2</sup>) and the negative control ( $5358\pm 75$  dyne/cm<sup>2</sup>) ( $p < 0.0001$ ).

**Figure 4.** Mucoadhesive strength evaluation of CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL.

The statistical test was performed using One-way ANOVA followed by Tukey's test (\*) significant difference between all formulations ( $p < 0.05$ ).

### 3.9 In vitro permeation studies

After 8 hours of diffusion, significantly different amounts of CTZ were found in the mucosa for CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL ( $5.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $21.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) as well as in the receptor medium ( $3.74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  $4.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 5**).

**Figure 5.** Permeation studies in cow vaginal mucosa (n=6).

Concentration of CTZ was the same for both formulations (infinite dose). 1x1 cm square cut of CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL. The statistical test was performed using One-way ANOVA followed by Tukey's test (\*\*) significant difference between CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL in the mucosa ( $p < 0.05$ ).

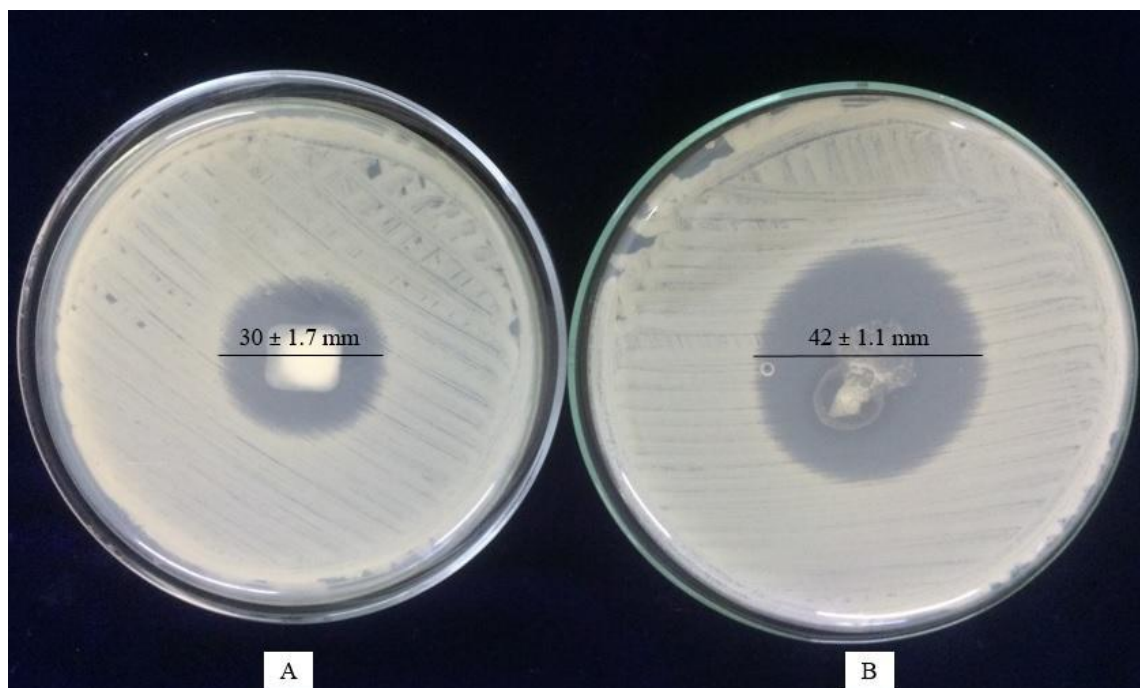
### 3.10 Antifungal activity in vitro

The antifungal activity was evaluated against a *Candida albicans* strain, and the results are expressed in **Fig 6**. It is possible to observe that CTZ-PUL showed a larger inhibition zone ( $42 \pm 1.1 \text{ mm}$ ) than CTZ-NC-PUL ( $30 \pm 1.7 \text{ mm}$ ) ( $p < 0.05$ ). Pure PSO, PSO-NC-PUL,



VEHICLE film and EtOH-PUL presented no antifungal activity (*data not shown*). Nevertheless, both CTZ formulations were able to release CTZ into the agar medium in order to act against fungal growth.

**Figure 6.** Antifungal activity against *Candida albicans*.



Both CTZ-NC-PUL (A) and CTZ-PUL (B) presented antifungal activity. The statistical test was performed using unpaired Student's t test with significant difference between the formulations ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The CTZ-NC characteristics regarding average diameter and PDI values were considered adequate, comparable to others studies with a similar aim [10]. The high magnitude of ZP is commonly found in formulations where PUL is used as a stabilizer [21] and the positive charge reflects Eudragit RS100 cationic nature. The laser diffraction analysis showed a monodispersed homogeneous system and the slightly acid pH of the CTZ-NC is considered suitable for vaginal applications, since the preservation of the acidic vaginal environment is a crucial factor concerning its protection against pathogenic proliferation [22]. The drug content was close to theoretical values for both CTZ-NC and CTZ-NC-PUL, and CTZ-NC encapsulation efficiency was high, due to the drug lipophilic character, which can ensure its solubilization in the oil core and consequent association into the NC.

One of the advantages of polymeric films over conventional pharmaceutical forms is the dose accuracy, and both weight and thickness properties are directly correlated to such parameter, in addition to the later also being associated with a comfortable administration [2,23]. The results showed that the weight and thickness obtained from both film formulations were coherent, with low standard deviation, reflecting that the production technique and drying process were adequate. In terms of drug content, the literature states that in order to be homogeneous, the drug dosage must range from 85 to 115% [24,25], which can be observed for CTZ-NC-PUL. However, CTZ-PUL drug content was below this range (75%) followed by high values of standard deviation, suggesting that it is not possible to obtain a homogeneous CTZ PUL film by simply incorporating the drug in the aqueous dispersion, and therefore, the nanoencapsulation of CTZ is extremely important, assuring the homogeneity of the drug dosage.

In modern therapeutics, the controlled or sustained drug release from a pharmaceutical dosage form has become widely popular for its advantages, such as improved efficacy and patient compliance, fewer administration frequency, decreased side effects and reduced variation in drug levels on the bloodstream [26]. Nanotechnology, especially NC, are well described as one of the systems in which such characteristics can be acquired. In the *in vitro* drug release assay, it was possible to observe that the encapsulation of CTZ promoted a controlled release in comparison to non-encapsulated CTZ. Such result agrees with other literature reports where CTZ was associated with Eudragit RS100 NC in the same conditions [10,16] and also with the permeation studies, where lower values of CTZ were quantified in the mucosa for CTZ-NC-PUL. Even though both CTZ-NC and CTZ-NC-PUL presented a similar drug release profile, a significant difference between them was observed after 5 hours, where the CTZ release from the NC was lower in comparison to the film formulation. Accordingly, the production of PUL fast dissolving films is well described in the literature, for example, Bala and co-workers developed a fast-dissolving PUL film of Aprepitant, an antiemetic drug used in chemotherapy-induced nausea [27]. The authors mentioned that the increased rate of drug release obtained from the film was due to the hydrophilic polymer matrix ability to erode and diffuse the drug. In addition, a direct relationship between PEG 400 (selected plasticizer) increased concentration and drug release levels was observed. A rationale between the drug release evaluation and the permeation studies can be made again when, different from other literatures [10], CTZ was quantified in the receptor medium, literature reports substances such PEG 400 and sorbitol as co-surfactants and permeation enhancers [28]. In the assessments of

Shaker and co-workers (2020), the addition of PEG 400 (used as co-surfactant) was able to enhance Atorvastatin calcium skin permeation *in vitro* by disrupting the *stratum corneum* lipids, exhibiting rapid release profile of the drug [29]. In our study, it is possible to imply that the presence of plasticizers such as sorbitol and PEG 400 in high concentrations, as well as the hydrophilic nature of PUL could promote an increased drug release and permeation from CTZ-NC-PUL. In the context of the vaginal route, a controlled drug release can be the key to maintain the drug absorption levels and reduce the administered amount, contributing to the treatment efficacy [30].

Converting a liquid into a solid pharmaceutical form such as a polymeric film is an important advantage to improve chemical stability that is provided by the absence of an aqueous environment [31,32]. In addition, unlike films, liquid formulations such as solutions or suspensions require extra care for an accurate measurement due to proper amount of administration and need of shaking the bottle, which may contribute to fewer patient compliance [2]. In our findings, it was possible to observe that after 120 days, in a qualitative assessment, the aluminum sachets preserved the mechanical and physical properties of the films. All formulations (CTZ-NC, CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL) macroscopic features such as color and aspect remained the same, with no visual microorganism growth. Refrigeration was the most adequate storage condition, keeping CTZ-NC-PUL drug content basically unaltered, whereas CTZ-PUL lowered drug content up to 15% and CTZ-NC up to 25%. In cabinet storage (25°C), all formulations presented greater signs of drug degradation, which was accentuated in CTZ-NC, that had its drug content lowered to 50%. CTZ-PUL showed lower drug content in all conditions when compared with CTZ-NC-PUL, which emphasized the role of nanoencapsulation in drug maintenance. Therefore, the stability studies demonstrated the advantages of the film formulation as a solid pharmaceutical form over the aqueous NC suspensions, the influence of the drug incorporation to a nanocarrier system and the most adequate environment for storage of the developed formulations.

For decades, the Draize *in vivo* rabbit eye test was commonly used to test the irritant potential of several substances. However, as the concept of the 3 Rs increased in the scientific community (reduction, refinement and replacement), different methodologies emerged as an alternative to animal experimentation [33]. The HET-CAM is a substitute semi quantitative method that checks as a borderline case between *in vitro* and *in vivo* systems. It assesses the irritant potential of substances for ophthalmic and cutaneous administration, that, according to ISO 10993-10 [34], can be directly correlated to the vaginal tissue without animal testing,

suggesting a similar epithelia response for irritancy. In our findings, no signs of irritancy were detected and all formulations were considered safe for vaginal administration.

Bioadhesion can be defined as the state in which two materials adhere to each other for a period of time through interfacial forces, where one of these materials is from biological nature. If the biological material corresponds to a mucosal tissue, the process is called mucoadhesion [35]. There are several advantages in mucoadhesive pharmaceutical dosage forms, especially the ones intended for vaginal administration. As a result of the intimate contact of the material with the mucosal surface, there is an increase in the residence time in the application site that, associated with a controlled release system, can reduce the administration frequency and dose, lowering side-effects and costs and increasing patient compliance [36]. Therefore, it is of extreme importance to evaluate the mucoadhesive properties of the developed formulations.

Mucin anionic molecules are a main component of the mucus presented in mucosal tissues. Chaves and co-workers (2018) compared Eudragit RS100, Eudragit S100 and Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) mucoadhesive properties and observed that, not only Eudragit RS100 presented higher mucoadhesion characteristics, but also its incorporation to NC increased adhesion because of the large surface area contact promoted by the nanoparticles small size [37]. Since the vaginal environment possesses mucus as an important element in terms of drug administration, Eudragit RS100 is a promising choice as core-shell of the NC. In the mucoadhesive potential evaluation of the CTZ-NC, the same behavior was observed. The average particle size and PDI increased and the ZP reversed its charge, reflecting the polymer interaction with the mucin and confirming the formulation elevated mucoadhesive character. On the other hand, the mucoadhesive strength of the films formulations were also evaluated. It is important to highlight that the bovine mucosa presented a natural mucoadhesion, which is displayed in the graphic as C-. In relation to the formulations, CTZ-NC-PUL showed a stronger mucoadhesive force in comparison to CTZ-PUL, and both were significantly different from C-. Cordenonsi and co-workers (2019) developed a fucoxanthin nanostructured lipid carriers coated with chitosan and incorporated it in a PUL film [38]. The films were characterized by good bioadhesive properties, with values of force of adhesion around 6000-8000 mN/mm.

Although it is important to evaluate the interaction between the films and the mucosal environment, such analysis does not consider the formulations removal by the vaginal fluid [39]. Therefore, the falling liquid film assay can be applied in order to simulate the adhesion of the films after employing a flow, providing complementary insights on the adhesive behavior

of the formulation. The results showed that a high percentage of adherence was found for both films formulations, but even higher for CTZ-NC-PUL (62%), highlighting the influence of the Eudragit RS100 in the NC composition. Even though the total amount of fluid employed in this assay (35 mL) is almost six times greater than the amount actually produced by the female body (6 mL/day) [40], the adherence properties were improved compared to a hydrogel formulation intending vaginal application [10]. The same assessment for CTZ and Eudragit RS100 NC incorporated in a PUL hydrogel was performed, where 55% of CTZ remained in the mucosa. Vaginal films can combine the properties of solid and semisolid dosage forms because when in contact with vaginal fluids, the solid becomes a gel that is expected to adhere to the vaginal mucosa. Additionally, films are easier to administrate and do not require an applicator, which not only reduces production costs, but is also eco-friendly. Their package is portable, discreet and simple to handle. Furthermore, different from semisolid formulations, polymeric films do not increase the volume of the vaginal fluids, reducing the chances of leakage and discomfort and preventing the disruption of endogenous bacterial and fungal microbiota [11,13].

In ten minutes, the disintegration of the films was observed in the falling liquid assay. Therefore, in order to evaluate such parameter properly, the disintegration test was applied simulating the formulation behavior when in contact with the vaginal fluid. Both formulations (CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL) disintegrated up until 10 min, where a soft mass of swollen and dispersed polymer was left, with no touchable film structure. As reported in the literature, a fast dissolving film presents disintegration time up to 10 min [41–43], and even though fast dissolving films are considered a great asset for the treatment of vaginal conditions, fast dissolution is usually disassociated with mucoadhesion as a characteristic for the films [44]. However, as widely presented before, the CTZ-NC-PUL formulation possesses great mucoadhesive properties, which could mean the creation of a new film category combining two important characteristics: fast-dissolving mucoadhesive films. In such, we hypothesized that the film would be able to completely disintegrate its polymeric matrix until 10 min after contact with the vaginal fluid, while slowly releasing the CTZ nanocapsules that, as mentioned above, have increased affinity by the mucus components, securing the formulation residence time in the site of application and ensuring the efficacy to treat local infections. In addition, the pH of the SVF was measured after the assay and no alterations were observed, demonstrating the formulation compatibility with the acid vaginal environment.

Finally, it was important to verify if the CTZ activity against *Candida* was kept after nanoencapsulation and incorporation in the polymeric matrix. The *in vitro* disk diffusion test

results showed that both CTZ-NC-PUL and CTZ-PUL presented an inhibition zone towards the *C. albicans* strain, with CTZ-NC-PUL inhibition zone diameter smaller than CTZ-PUL, which can be explained by the slow release of CTZ from the NC. Even though CTZ-NC-PUL presented a smaller inhibition zone, the CTZ antifungal activity was maintained. In addition, the presence of PSO in the formulation can benefit CTZ-NC-PUL activity against *C. albicans* infections. Kumar and co-workers (2020) evaluated the antifungal efficacy of *Punica granatum* peel extract in comparison to CTZ, and the results indicated the extract potential as a natural antifungal agent, with minimum inhibitory concentrations close to CTZ [45]. Furthermore, the literature extensively describes PSO antioxidant and anti-inflammatory characteristics [3–5] which could improve CTZ-NC-PUL efficacy in the treatment of VVC.

## 5. Conclusion

In this work, we proposed a novel pullulan nano-based film associated with PSO for the vaginal delivery of CTZ. The CTZ-NC characteristics were considered adequate for vaginal administration and the films presented an *in vitro* controlled drug release. The CTZ-NC-PUL was stable for 120 days under refrigeration and its safety was also demonstrated. All developed formulations presented great mucoadhesive properties and the films showed a fast dissolving characteristic. The antifungal effect against *C. albicans* was maintained after the manufacture process, but additional tests are required to further study the formulation broad potential and the PSO role in fighting the infection. Therefore, the CTZ-NC-PUL film displays a promising asset in the treatment of VVC.

## 6. Acknowledgments

We gratefully acknowledge UFSM and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-BR) for the financial support. Verônica Ferrari Cervi was granted a CAPES masters fellowship (process number: 88882.427737/2019-01). We also would like to thank to C.B. Silva for the zetasizer access.

## 7. References

- [1] J.O. Morales, J.T. McConville, Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.023>.

- [2] S. Karki, H. Kim, S.J. Na, D. Shin, K. Jo, J. Lee, Thin films as an emerging platform for drug delivery, *Asian J. Pharm. Sci.* 11 (2016) 559–574. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>.
- [3] T. Baccarin, M. Mitjans, D. Ramos, E. Lemos-Senna, M.P. Vinardell, Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153 (2015) 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.005>.
- [4] L. Mota Ferreira, M. Gehrcke, V. Ferrari Cervi, P. Eliete Rodrigues Bitencourt, E. Ferreira da Silveira, J. Hofstatter Azambuja, A. Prates Ramos, K. Nascimento, M. Beatriz Moretto, E. Braganhol, M. Rorato Sagrillo, L. Cruz, Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells, *Pharm. Biol.* 54 (2016) 2968–2977. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1199039>.
- [5] C. Rigon, M.C.L. Marchiori, F. da Silva Jardim, N.S. Pegoraro, P. dos S. Chaves, M.C. Velho, R.C.R. Beck, A.F. Ourique, M.H.M. Sari, S.M. de Oliveira, L. Cruz, Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents effective anti-inflammatory action in a model of irritant contact dermatitis in mice, *Eur. J. Pharm. Sci.* 137 (2019) 104969. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104969>.
- [6] P. Chatzivasileiou, T.A. Vyzantiadis, Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches—A literature review, *Mycoses.* 62 (2019) 638–650. <https://doi.org/10.1111/myc.12920>.
- [7] F.A. Qais, M.S.A. Khan, I. Ahmad, A.S. Althubiani, Potential of Nanoparticles in Combating *Candida* Infections, *Lett. Drug Des. Discov.* 16 (2018) 478–491. <https://doi.org/10.2174/1570180815666181015145224>.
- [8] J.M. Achkar, B.C. Fries, *Candida* infections of the genitourinary tract, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2010) 253–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>.
- [9] X. Zhou, T. Li, S. Fan, Y. Zhu, X. Liu, X. Guo, Y. Liang, The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis, *Mycoses.* 59 (2016) 419–428. <https://doi.org/10.1111/myc.12485>.
- [10] J.A. de Lima, T.C. Paines, M.H. Motta, W.B. Weber, S.S. dos Santos, L. Cruz, C. de B.

da Silva, Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation, *Mater. Sci. Eng. C*. 79 (2017) 886–893. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.030>.

- [11] K. Bunge, C. Dezzutti, L.C. Rohan, C.W. Hendrix, M.A. Marzinke, N. Richardson-Harman, B.J. Moncla, B. Devlin, L. Meyn, H.M.L. Spiegel, S. Hillier, A Phase 1 trial to assess the safety, acceptability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel dapivirine vaginal film, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [12] A.M. Nel, L.B. Mitchnick, P. Risha, L.T.M. Muungo, P.M. Norick, Acceptability of vaginal film, soft-gel capsule, and tablet as potential microbicide delivery methods among African women, *J. Women's Heal.* 20 (2011) 1207–1214. <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2476>.
- [13] G. Leyva-Gómez, E. Piñón-Segundo, N. Mendoza-Muñoz, M.L. Zambrano-Zaragoza, S. Mendoza-Elvira, D. Quintanar-Guerrero, Approaches in polymeric nanoparticles for vaginal drug delivery: A review of the state of the art, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061549>.
- [14] B. Martínez-Pérez, D. Quintanar-Guerrero, M. Tapia-Tapia, R. Cisneros-Tamayo, M.L. Zambrano-Zaragoza, S. Alcalá-Alcalá, N. Mendoza-Muñoz, E. Piñón-Segundo, Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications, *Eur. J. Pharm. Sci.* 115 (2018) 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.029>.
- [15] A.K. Jain, S. Thareja, In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 47 (2019) 524–539. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>.
- [16] S.S. Santos, A. Lorenzoni, L.M. Ferreira, J. Mattiazzi, A.I.H. Adams, L.B. Denardi, S.H. Alves, S.R. Schaffazick, L. Cruz, Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 1389–1394. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.040>.
- [17] S.S. Santos, A. Lorenzoni, N.S. Pegoraro, L.B. Denardi, S.H. Alves, S.R. Schaffazick, L. Cruz, Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules



- intended for vaginal delivery of clotrimazole, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 116 (2014) 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.011>.
- [18] J. das Neves, M.H. Amaral, M.F. Bahia, Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.007>.
- [19] L.S. Nielsen, L. Schubert, J. Hansen, Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate, *Eur. J. Pharm. Sci.* 6 (1998) 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(97\)10004-5](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(97)10004-5).
- [20] R. Kalyanwat, B. Shrivastava, K. Pathak, Preparation and evaluation of bioadhesive ocular inserts of aceclofenac, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 41 (2016) 207–213.
- [21] L.M. Ferreira, V.F. Cervi, M. Gehrcke, E.F. da Silveira, J.H. Azambuja, E. Braganhol, M.H.M. Sari, V.A. Zborowski, C.W. Nogueira, L. Cruz, Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective antiglioma formulation for intravenous administration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 130 (2015) 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.023>.
- [22] R. Palmeira-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira, J. Martinez-de-Oliveira, New strategies for local treatment of vaginal infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92 (2015) 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.008>.
- [23] A.B. Nair, R. Kumria, S. Harsha, M. Attimarad, B.E. Al-Dhubiab, I.A. Alhaider, In vitro techniques to evaluate buccal films, *J. Control. Release*. 166 (2013) 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.019>.
- [24] F. Rezaee, F. Ganji, Formulation, Characterization, and Optimization of Captopril Fast-Dissolving Oral Films, *AAPS PharmSciTech.* 19 (2018) 2203–2212. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1027-y>.
- [25] R.P. Dixit, S.P. Puthli, Oral strip technology: Overview and future potential, *J. Control. Release*. 139 (2009) 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.014>.
- [26] R. Kola, B.P. Kumar, A detailed description of synthetic and natural polymers which are used in the formulation of sustained release drug delivery system: A review, *J. Chem.*

Pharm. Sci. 6 (2013) 161–169.

- [27] R. Bala, S. Sharma, Formulation optimization and evaluation of fast dissolving film of aprepitant by using design of experiment, *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* 56 (2018) 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2018.04.002>.
- [28] M.L. Manca, S. Mir-Palomo, C. Caddeo, A. Nacher, O. Díez-Sales, J.E. Peris, J.L. Pedraz, A.M. Fadda, M. Manconi, Sorbitol-penetration enhancer containing vesicles loaded with baicalin for the protection and regeneration of skin injured by oxidative stress and UV radiation, *Int. J. Pharm.* 555 (2019) 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.053>.
- [29] D.S. Shaker, R.A.H. Ishak, M.A. Elhuoni, A.M. Ghoneim, Boosting transdermal delivery of atorvastatin calcium via o/w nanoemulsifying system: Two-step optimization, ex vivo and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* 578 (2020) 119073. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119073>.
- [30] L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review, *J. Control. Release.* 190 (2014) 500–514. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.033>.
- [31] S. Yoshioka, V.J. Stella, *Stability of Drugs And Dosage Forms*, 2002. [file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc\\_o\\_00042\\_01.pdf](file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf).
- [32] A.F. Borges, C. Silva, J.F.J. Coelho, S. Simões, Oral films: Current status and future perspectives: I-Galenical development and quality attributes, *J. Control. Release.* 206 (2015) 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.006>.
- [33] A.S. Cruz, M.L. Barbosa, T. de J.A. Pinto, Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize, *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 64 (2004) 1–9.
- [34] R. Palmeira-de-Oliveira, R. Monteiro Machado, J. Martinez-de-Oliveira, A. Palmeira-de-Oliveira, Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay, *ALTEx.* 35 (2018) 495–503. <https://doi.org/10.14573/altex.1710091>.
- [35] S. Mansuri, P. Kesharwani, K. Jain, R.K. Tekade, N.K. Jain, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *React. Funct. Polym.* 100 (2016) 151–172. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011>.
- [36] G.P. Andrews, T.P. Laverty, D.S. Jones, Mucoadhesive polymeric platforms for

- controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.028>.
- [37] P.D.S. Chaves, L.A. Frank, A.G. Frank, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Mucoadhesive Properties of Eudragit®RS100, Eudragit®S100, and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules: Influence of the Vehicle and the Mucosal Surface, *AAPS PharmSciTech.* 19 (2018) 1637–1646. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0968-5>.
- [38] L. Malgarim Cordenonsi, A. Faccendini, M. Catanzaro, M.C. Bonferoni, S. Rossi, L. Malavasi, R. Platcheck Raffin, E.E. Scherman Schapoval, C. Lanni, G. Sandri, F. Ferrari, The role of chitosan as coating material for nanostructured lipid carriers for skin delivery of fucoxanthin, *Int. J. Pharm.* 567 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118487>.
- [39] L.A. Frank, P.S. Chaves, C.M. D'Amore, R. V. Contri, A.G. Frank, R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, A. Buffon, S.S. Guterres, The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114 (2017) 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.021>.
- [40] E. Baloglu, Z.A. Senyigit, S.Y. Karavana, A. Bernkop-Schnürch, Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 12 (2009) 312–336. <https://doi.org/10.18433/j3hp41>.
- [41] D.R. Friend, Pharmaceutical development of microbicide drug products, *Pharm. Dev. Technol.* 15 (2010) 562–581. <https://doi.org/10.3109/10837450903369879>.
- [42] C. Cunha-Reis, A. Machado, L. Barreiros, F. Araújo, R. Nunes, V. Seabra, D. Ferreira, M.A. Segundo, B. Sarmiento, J. das Neves, Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs, *J. Control. Release.* 243 (2016) 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.020>.
- [43] M.P. Cautela, H. Moshe, A. Sosnik, B. Sarmiento, J. das Neves, Composite films for vaginal delivery of tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 138 (2019) 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.001>.
- [44] S. Garg, D. Goldman, M. Krumme, L.C. Rohan, S. Smoot, D.R. Friend, Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets, *Antiviral Res.* 88 (2010) 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.09.010>.

- [45] B. Narayan Biswal, S. Narayan Das, B. Kumar Das, R. Rath, Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic, *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 21 (2017) 244–51. <https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP>.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento bem-sucedido de filmes poliméricos se fundamenta na seleção justificada e racional da concentração dos polímeros, os quais podem ser utilizados sozinhos ou em combinação, de acordo com as propriedades mecânicas desejadas (IRFAN et al., 2016). Essa escolha é feita geralmente com base em suas características físicas, químicas e no propósito de aplicação da formulação (KARKI et al., 2016). O PUL é um polímero natural de origem fúngica produzido industrialmente (SINGH et al., 2017). Sua natureza é não-tóxica, não-imunogênica, não-carcinogênica e não-mutagênica (SINGH; KAUR; KENNEDY, 2015). Suas propriedades filmógenas são bem descritas na literatura, sendo considerado uma ótima opção de polissacarídeo natural para compor a matriz polimérica de formas farmacêuticas sólidas como os filmes (TABASUM et al., 2018). Assim, diferentes concentrações de PUL foram inicialmente testadas sem adição de plastificante, baseadas em estudos da literatura (TONG; XIAO; LIM, 2008; WU et al., 2013), com variação de 0,5 a 8%, a fim de observar o potencial filmógeno do PUL isolado. Nesta etapa, dois fatores foram considerados: 1) a capacidade de formar um filme íntegro e 2) sua espessura, avaliados de maneira qualitativa. As concentrações de 0,5 até 4% de PUL não apresentaram potencial filmógeno ou produziram filmes frágeis e finos, muito rígidos e altamente quebradiços, considerados inadequados para utilização. A partir da concentração de 5%, os filmes obtidos apresentaram espessura adequada e robustez no preparo. A concentração de 6% foi considerada a mínima necessária para obtenção de filmes com a rigidez, espessura e características físicas almejadas, sendo a concentração selecionada para dar segmento ao estudo.

Uma vez que o polímero e as concentrações de plastificantes PEG 400 e Sorbitol a serem testadas no filme de PUL foram escolhidas de maneira semi-quantitativa, nos estudos de pré-formulação, nanocápsulas e nanoemulsões de óleo de romã foram então desenvolvidas para compor a forma farmacêutica final. A **tabela 2** apresenta os resultados obtidos nesta etapa do desenvolvimento dos filmes. Devido a outros trabalhos que demonstraram a atividade farmacológica promissora exibida pelo óleo de romã associado à sistemas nanoestruturados em nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2015; MARCHIORI et al., 2017; MOTA FERREIRA et al., 2016), o mesmo foi selecionado como componente da fase oleosa das nanoemulsões e do núcleo oleoso das nanocápsulas do presente estudo, como anteriormente mencionado. Para ambas as nanoestruturas, o polissorbatato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) foi avaliado como tensoativo, enquanto polímeros como a etilcelulose, a poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e o Eudragit

RS100<sup>®</sup> foram testados como parede polimérica das nanocápsulas. Os nanocarreadores estabilizados com Tween 80<sup>®</sup> demonstraram incompatibilidade com o filme de PUL, separando fases e extravasando tensoativo após o processo de secagem. Os filmes obtidos possuíam aspecto untuoso e não homogêneo, e desta forma, o Tween 80<sup>®</sup> foi descartado do preparo das nanoestruturas. Cordenonsi e colaboradores (2019) relatam êxito no emprego do Tween 80<sup>®</sup> como estabilizante de carreadores lipídicos nanoestruturados compostos por quitosana, óleo de bacuri e tucumã, incorporados à um filme de PUL. Entretanto, as concentrações de PUL utilizadas são diferentes, assim como a composição do sistema nanoestruturado e o plastificante (glicerol). O emprego do PUL como um promissor estabilizante de nanocarreadores já havia sido demonstrado anteriormente em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (CHASSOT et al., 2016; MOTA FERREIRA et al., 2015). Desta forma, sua aplicação foi considerada compatível com o filme por se tratar da mesma substância que compõe sua matriz. Em relação a parede polimérica, os filmes contendo nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) apresentaram aglomerados e separação de fase, sendo não homogêneos após a secagem e, portanto, inadequados para posterior investigação. Semelhante, filmes compostos por nanocápsulas de etilcelulose apresentaram aglomerados de partícula e as avaliações semi-quantitativas iniciais evidenciaram um produto de alta rigidez e baixa flexibilidade. Por outro lado, filmes contendo nanocápsulas de Eudragit RS100<sup>®</sup> tiveram aspecto homogêneo e flexibilidade adequada, e desta forma, pelas características físicas e relevante característica de bioadesividade do polímero, essa formulação foi selecionada para dar sequência às próximas etapas do trabalho.

**Tabela 2.** Características observadas no filme de PUL frente às diferentes composições das nanocápsulas.

Características	Poli $\epsilon$ - (caprolactona)	Etilcelulose	Eudragit RS100 <sup>®</sup>	Tween 80 <sup>®</sup>
Separação de fases	X	-	-	X
Agregação de partículas	X	X	-	-
Rigidez excessiva	-	X	-	-

(X): presente (-): ausente.

Após os estudos de pré-formulação, as nanoestruturas foram caracterizadas quanto a tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, e a manutenção do seu tamanho após a incorporação no filme foi avaliada através da redispersão da forma sólida e análise pelo método de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecido por espalhamento de luz dinâmico. Esta técnica se baseia no fato de que partículas suspensas em um líquido nunca estão

estacionárias e sim, em constante movimento, colidindo umas com as outras. Este movimento aleatório das partículas é chamado de movimento Browniano, teoria utilizada para interpretar os dados detectados pelo equipamento de espectroscopia (HASSAN; RANA; VERMA, 2015). Os resultados obtidos indicaram um aumento do tamanho uma vez que as nanoestruturas foram incorporadas ao filme, o que sugere uma possível interferência da matriz polimérica dispersa de maneira coloidal. Ainda, existe a possibilidade de que as partículas estejam recobertas pelo polímero ou ainda, inseridas na matriz, agindo como um nano-preenchimento (CHANDRA et al., 2018; HASHEMI GAHRUIE et al., 2017).

É importante reconhecer que o conjunto de dados que contempla a avaliação do tamanho das nanoestruturas após a sua incorporação na matriz polimérica do filme e os métodos utilizados para obtenção de tais resultados podem ser considerados inconclusivos e escassos, respectivamente. A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar o corte transversal dos filmes, como descrito no **manuscrito 1**, onde as nanoestruturas não são observadas. Como discutido anteriormente, a limitação na avaliação do tamanho nanocarreadores inseridos em filmes poliméricos por MEV já foi relatada, na qual autores afirmam que as nanoestruturas estariam intimamente inseridas na matriz polimérica e por isso, sua identificação através dessa técnica não seria possível (HASHEMI GAHRUIE et al., 2017; MACHADO et al., 2016). Ainda, é comum que metodologias complementares sejam empregadas na análise de tamanho de sistemas nanoestruturados, como microscopia eletrônica de transmissão com e sem criofratura, microscopia de força atômica e técnicas conjugadas (KLANG et al., 2012), ressaltando a necessidade de avaliações mais aprofundadas deste parâmetro como uma perspectiva futura em nosso estudo.

Posteriormente, os filmes foram avaliados quanto a peso, espessura e propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas foram avaliadas a fim de escolher uma concentração ótima de sorbitol para a formulação, se mantendo dentro da análise sensorial qualitativa dos filmes. Já parâmetros como peso e espessura devem ser cuidadosamente considerados durante o desenvolvimento do filme polimérico a fim de garantir uma performance eficiente para a aplicação pretendida, pois refletem a homogeneidade do filme e a reprodutibilidade do método de preparo utilizado (KARKI et al., 2016). A medida da espessura realizada com o paquímetro digital não demonstrou diferença significativa entre os filmes, que se mantiveram na faixa de 150 – 180  $\mu\text{m}$ , sendo considerados filmes finos (KARKI et al., 2016). Entretanto, o corte transversal da MEV contesta os resultados obtidos inicialmente, apresentando valores três x maiores para os filmes contendo as nanoestruturas. Divergências entre metodologias com um grau de precisão e sensibilidade tão distintos são comuns. Apesar disso, enquanto as análises

de MEV foram realizadas em apenas uma vez, a determinação da espessura pelo paquímetro foi realizada com 5 leituras de triplicatas de amostras, com alta reprodutibilidade. Portanto, a MEV pode ser utilizada como uma avaliação mais aprofundada futuramente, a fim de determinar a espessura do filme com exatidão. Entretanto, é importante ressaltar que essa diferença observada não afetou negativamente nenhuma avaliação de performance executada.

Uma das propriedades biológicas mais importantes de um produto farmacêutico é a sua compatibilidade com o local de aplicação, o que torna a busca por estratégias que garantam o máximo de segurança possível bastante relevante (STEILING et al., 1999). Desde 1987, as Diretrizes da OECD para o Teste de Produtos Químicos definiram o teste de irritação do olho de coelho como um padrão obrigatório para o registro de novos produtos químicos no mercado (STEILING et al., 1999). O teste de irritação ocular descrito por Draize (1944) avalia os efeitos irritantes de substâncias na conjuntiva, córnea e na íris de olhos de coelhos albinos, utilizando no mínimo 6 animais que são posteriormente eutanasiados (CHORILLI et al., 2009). Ao longo dos anos, essa avaliação foi sendo duramente criticada e a busca por modelos alternativos de irritação ocular *in vitro* cresceu substancialmente (OLIVEIRA et al., 2012). O princípio dos 3 Rs (*replacement* – substituição; *reduction* – redução; *refinement* - refinamento) é fundamentado na premissa de que animais devem ser utilizados apenas quando não há uma alternativa não-animal, e mesmo quando são de fato necessários, somente os métodos mais humanizados e éticos devem ser aplicados no menor número de animais possível (GORMLEY; BERRY, 2009). Desta forma, o ensaio da Membrana Corioalantóide (HET-CAM) surgiu como uma alternativa que respeita a política dos 3 Rs, sendo aplicado não somente para testes de irritação ocular, mas também outras membranas biológicas, como pele e mucosas (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018). Os resultados de ambos os manuscritos demonstraram que nenhuma formulação ou combinação de seus componentes apresentou potencial irritante no modelo do HET-CAM. Desta maneira, a NE e NC de óleo de romã contendo ou não CTZ, bem como os filmes em sua totalidade foram considerados seguros tendo em vista as condições de exposição testadas neste trabalho, e a partir disso, foi dado segmento as próximas etapas de avaliações de performances *in vitro* e *in vivo* deste trabalho.

O modelo animal de dermatite atópica foi realizado através da indução epicutânea de lesões com um agente exógeno, o DNCB. O DNCB faz parte de uma classe de moléculas irritantes conhecida como haptenos, substâncias capazes de induzir uma resposta imunológica no hospedeiro (MARTINS; DOS REIS, 2011). Por serem moléculas muito pequenas acabam não sendo reconhecidas pelo sistema imune, assim, os haptenos não são imunogênicos por si só, mas são capazes de se ligar covalentemente a resíduos nucleofílicos, criando novos epítomos



antigênicos e desencadeando reações imunológicas (CHIPINDA; HETTICK; SIEGEL, 2011). Os modelos induzidos por haptenos são empregados com mais frequência, apesar da elevada demanda de trabalho manual e laboratorial que sua utilização implica, em comparação com modelos consanguíneos e geneticamente modificados (KIM; KOBAYASHI; NAGAO, 2019). Suas principais vantagens são o controle de dose na indução, menor custo e a possibilidade de aplicação em uma ampla variedade de espécies de roedores (KAPLAN; IGYÁRTÓ; GASPARI, 2012).

Em 1989, Rees, Friedmann e Matthews investigaram pela primeira vez a diferença entre gêneros no desenvolvimento da dermatite de contato induzida por DNCB em humanos. No total, 22 indivíduos (homens e mulheres) foram sensibilizados e induzidos com DNCB em diferentes concentrações. A medida da espessura cutânea foi realizada após 48 horas e os resultados apontaram que o gênero feminino apresentou maior resposta em todas as doses estudadas (REES; FRIEDMANN; MATTHEWS, 1989). Desde então, a influência hormonal vem sendo descrita como um dos fatores que colaboram com a maior prevalência de mulheres nas estatísticas da doença (DOR-WOJNAROWSKA et al., 2017; KANDA; HOASHI; SAEKI, 2019). Por este motivo, grande parte dos trabalhos que investigam a eficácia de novas propostas terapêuticas no modelo de dermatite atópica induzida por DNCB em animais utiliza camundongos fêmea (ALVES et al., 2016; VOSS et al., 2018a).

Pacientes acometidos pela dermatite atópica apresentam sintomas e mudanças cutâneas que impactam diretamente na sua saúde física e psicossocial, tendo sua qualidade de vida comprometida (SIBBALD; DRUCKER, 2017). Essa doença possui como sintoma característico o prurido, que é muito relacionado a dor visto que ambos são difíceis de identificar de maneira isolada. Muitos pacientes relatam a percepção da coceira como dolorosa, especialmente em casos de coceira intensa (DAWN et al., 2009; VON KOBYLETZKI et al., 2017). A dor é uma experiência complexa que envolve não somente a transmissão de um estímulo ambiental nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional do cérebro, e a compreensão de seus mecanismos pode ser um fator primordial para auxiliar no tratamento de doenças relacionadas (BINSHTOK et al., 2008). Ao longo do tempo, diversos testes e modelos animais de roedores foram sendo desenvolvidos com o intuito de investigar enfermidades, como por exemplo o modelo animal de dermatite atópica, que contempla diferentes aspectos da patofisiologia da doença. Entretanto, a distinção entre nocicepção e dor é fundamental quando se considera o uso de modelos pré-clínicos em roedores. A nocicepção é definida como o processo neuronal de codificar e processar estímulos nocivos que incluem o sistema nervoso periférico e atuam de maneira inconsciente (BARROT, 2012). Em contraste, a

dor é um acontecimento consciente que interpreta o estímulo nocivo, uma experiência subjetiva e complexa composta por componentes emocionais, sensoriais, autonômicos e cognitivos (WOOLF, 2010). Embora a nocicepção e a dor pareçam estar interligadas, ambas se diferem quando se compara humanos e animais. Em pacientes, a dor pode ser avaliada e quantificada por expressão verbal, o que não é possível em roedores, além do componente psicoafetivo, que é de difícil dimensionamento em animais. Assim, o que é comumente referido como “testes de dor” em roedores são, na verdade, testes que avaliam a nocicepção, onde a medida pré-clínica da dor ainda se apresenta como um desafio para o campo da pesquisa (BARROT, 2012; KUNER, 2010; WILLIAMS; CRAIG, 2016). Entretanto, mesmo apresentando tais limitações, os modelos animais e testes comportamentais para o estudo da nocicepção e do potencial farmacológico de substâncias são ferramentas experimentais de grande importância na pesquisa pré-clínica.

Neste estudo, o componente nociceptivo associado à dermatite atópica foi investigado através do teste dos filamentos de Von-frey, um método bastante utilizado para medir a hipersensibilidade mecânica em várias espécies de roedores nos modelos pré-clínicos (BARROT, 2012). A avaliação tem como intuito relacionar a sensibilidade à nocicepção que os animais apresentam uma vez que a condição patológica da dermatite foi induzida por DNCB. O teste de hipersensibilidade mecânica evidenciou a ação farmacológica tanto para o óleo livre quanto para o filme PSONCF, pois se observou redução do comportamento de retirada da pata. Neste sentido, considerando que a modulação desta resposta comportamental é governada por mecanismos relacionados ao processamento central do impulso, tal resultado sugere a absorção sistêmica dos componentes vegetais presentes no óleo de romã em ambos os tratamentos. Ainda, observamos no **manuscrito 2** o potencial bioadesivo da suspensão de NC e do filme na qual as mesmas foram incorporadas, propriedade esta que poderiam promover o contato íntimo das partículas e maior tempo de retenção da formulação no local de ação, favorecendo a permeação pela barreira cutânea, e, assim, promovendo a ação sistêmica do óleo de romã evidenciada pelo efeito antinociceptivo observado *in vivo*. Além disso, um potencial oclusivo semelhante foi observado para ambas as formulações de filme contendo sistemas nanoestruturados, sem diferenças significativas. Ou seja, apesar da parede polimérica composta de Eudragit RS100<sup>®</sup>, o PSONCF apresentou os mesmos valores de oclusão do que PSONEF. Este resultado aponta que, dentre os componentes comuns aos dois sistemas, o óleo de romã é o que possui maior probabilidade de exercer uma funcionalidade oclusiva. No estudo de Montenegro e colaboradores (2017), a composição lipídica de diferentes nanocarreadores influenciou nas propriedades oclusivas do gel desenvolvido, evidenciando que a natureza da

substância oleosa utilizada tem um papel essencial na avaliação dessa propriedade. A oclusão é um dos mecanismos de hidratação cutânea mais empregados e eficazes, capaz de criar um ambiente propício a permeação de ativos e reparo de dano tecidual (DRAELOS, 2018). Por se tratar de uma substância lipofílica, o óleo de romã puro poderia exercer um efeito de impermeabilidade de barreira na superfície cutânea, promovendo oclusão. Desta forma, tanto a atividade antinociceptiva como a melhora observada nas lesões de dermatite atópica promovida pelo óleo puro é justificada.

Quando se observa a performance das formulações no modelo animal de dermatite atópica, os resultados apresentados pelo PSONEF foram inferiores em comparação com o PSONCF e o óleo de romã puro, o que pode levar a um questionamento a respeito da integridade desta formulação. É importante mencionar que durante a execução da segunda etapa do trabalho (**manuscrito 2**), no qual foram desenvolvidos os filmes contendo CTZ, o preparo de filmes de nanoemulsões de CTZ não foi bem-sucedido. Apesar da evidente vantagem da PSONC em diversos aspectos, um de nossos objetivos era o comparativo de performance entre os dois sistemas. Contudo, a incorporação do fármaco à nanoemulsão causava visível instabilidade da formulação e separação de fases antes do processo de secagem e, frente a isso, optou-se por sua descontinuação.

As nanoemulsões são conhecidas pela sua elevada estabilidade cinética pois devido ao seu tamanho reduzido, estão sujeitas ao movimento Browniano, não sendo afetadas pela gravidade. Desta maneira, fenômenos como cremagem e coalescência podem ser prevenidos ou desacelerados (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Entretanto, é relevante mencionar que esses sistemas não são termodinamicamente estáveis, ou seja, estão suscetíveis à instabilidade frente a mudanças de temperatura, pressão e volume (KLANG et al., 2012). Em um fenômeno conhecido como *Ostwald ripening* ou amadurecimento de Ostwald, a tendência de pequenas gotículas se unirem em gotículas maiores pode ocorrer, aumentando seu tamanho e levando a uma desestruturação total do sistema, principalmente quando a fase dispersa é aquosa (KLANG et al., 2012). No preparo de nossos filmes, o PUL é adicionado diretamente a nanoemulsão sob aquecimento, e os plastificantes são posteriormente misturados e mantidos sob agitação já fora do aquecimento. Ao longo do processo de fabricação do filme, a nanoemulsão não só é exposta ao calor, mas também a substâncias de alto peso molecular que são inseridas no sistema, neste caso, os plastificantes. Alguns dos trabalhos que desenvolveram filmes poliméricos contendo essa nanoestrutura citados na revisão da literatura desta dissertação utilizam pouco ou nenhum plastificante e, inclusive, apontam que a incorporação da própria nanoemulsão na matriz polimérica causa um “efeito plastificante” semelhante a tais substâncias (HASHEMI

GAHRUIE et al., 2017). Frente ao exposto, é possível sugerir que, nessas condições, a organização estrutural da nanoemulsão uma vez incorporada no filme é prejudicada e, como consequência, seu desempenho. O mesmo não ocorre com o PSONC por se tratar de uma suspensão de nanopartículas que não são suscetíveis aos mesmos fenômenos de instabilidade.

Outra questão importante no experimento *in vivo* foi a ineficácia do tratamento com hidrocortisona frente ao modelo experimental. Este fármaco é classificado como um corticosteroide leve utilizado no tratamento da dermatite atópica (THOMSEN, 2014). Em nosso estudo, a hidrocortisona em pomada foi selecionada a fim de realizar um comparativo de performance da formulação desenvolvida com uma substância empregada na clínica. Entretanto, os resultados obtidos indicaram um problema de eficácia desta formulação em todas as avaliações *in vivo*. Corroborando com tais achados, recentemente, Voss e colaboradores (2020) desenvolveram filmes de gelatina e amido contendo hidrocortisona e testaram seu potencial para tratar e atenuar lesões de dermatite atópica induzida por DNCB em camundongos BALB/c. Para fins comparativos, os pesquisadores utilizaram uma pomada de hidrocortisona comercial (1%) (VOSS et al., 2020). Os resultados indicaram que as formulações desenvolvidas apresentaram uma eficiência muito superior em comparação com a forma farmacêutica comercial, a qual apresentou resultados de ineficácia semelhantes aos obtidos em nosso estudo. Visto que a incorporação da hidrocortisona em um filme polimérico apresentou resultados promissores *in vivo*, é possível sugerir que a ineficácia deste fármaco não está necessariamente relacionada à uma limitação do modelo animal, mas sim à incompatibilidade farmacotécnica da forma farmacêutica comercial. Frente ao exposto, tanto a ineficácia da hidrocortisona no modelo bem como os problemas apresentados pelo seu emprego na clínica poderiam ser justificados. Em suma, a falha terapêutica observada nos resultados do corticosteroide tópico torna imprescindível o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que sejam efetivas e convenientes para os pacientes acometidos por essa doença.

A imunopatologia da dermatite atópica envolve uma resposta inflamatória potente derivada da infiltração leucocitária que ocorre na tentativa de eliminar as células modificadas pelo antígeno imunogênico (MARTINS; DOS REIS, 2011). Desta maneira, investigar os níveis da mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos de alguns tipos de leucócitos, é relevante para a compreensão da eficácia de um tratamento frente a reação alérgica. Do mesmo modo, como a estimulação de células imunes na resposta inflamatória está relacionada ao equilíbrio oxidativo, espécies reativas e a atividade da enzima superóxido dismutase também foram investigadas. Os resultados revelam que a única formulação capaz de modular o desequilíbrio dos eventos inflamatórios e oxidativos foi o PSONCF, demonstrando que a nanoencapsulação

do óleo de romã aprimora seu efeito farmacológico. Em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que apenas o hidrogel de óleo de romã nanoencapsulado foi capaz de manter a atividade anti-inflamatória em modelo animal de lesão cutânea induzido por radiação ultravioleta B, reforçando as vantagens da incorporação do óleo a sistemas nanoestruturados (MARCHIORI et al., 2017).

Após os promissores resultados obtidos no modelo animal de dermatite atópica para a formulação PSONCF, foi possível observar que, devido às características físico-químicas e mecânicas do filme, sua potencialidade poderia ser aplicada a outras vias de administração. O filme de nanocápsulas de óleo de romã não só apresentou potencial farmacológico, mas também foi oclusivo, seguro e bioadesivo. Portanto, a fim de investigar sua aplicação como plataforma de liberação de fármacos para a via vaginal, o CTZ foi escolhido como fármaco modelo. Por fim, a atividade antifúngica *in vitro* da formulação também foi avaliada.

A incorporação do CTZ nas nanocápsulas de óleo de romã e Eudragit RS100<sup>®</sup> diminuiu moderadamente seu tamanho médio de partícula e potencial zeta, sem causar alterações no pH e no índice de polidispersão da suspensão. Através da análise de tamanho da nanocápsula de CTZ, no **manuscrito 2**, uma diferença significativa foi observada nos resultados das metodologias de espalhamento de luz dinâmico e difração a laser. A ocorrência de divergências de resultados entre metodologias é comum, principalmente quando se trata de técnicas compostas por princípios que não se correlacionam, como o espalhamento de luz dinâmico e a difração a laser. A difração a laser é considerada mais apropriado para partículas maiores que 1 µm, se tornando inespecífico e limitado com partículas menores (LI et al., 2019). Desta forma, a literatura relata o seu uso a fim de verificar a existência de populações micrométricas na formulação, bem como qual porcentagem das partículas se encontra na faixa nanométrica e a robustez deste resultado, não sendo utilizado com o objetivo de determinar o tamanho médio de partículas (VENTURINI et al., 2016).

Apesar da maioria dos artigos encontrados na literatura se referir à distribuição homogênea da substância ativa no filme como uniformidade de conteúdo (ALVES et al., 2020; CHANDRA et al., 2018; KRULL et al., 2016), o termo mais correto seria homogeneidade. A uniformidade de conteúdo é descrita como a invariabilidade da quantidade de substância ativa em uma dose única ou uma unidade da forma farmacêutica, sendo avaliada em sua totalidade (ROESCH; VOLPATO, 2010). Entretanto, devido ao tamanho de filme obtido pelo método de deposição do solvente em placa de Petri, a avaliação é realizada com três ou mais quadrados iguais do mesmo filme, mas não com a forma em sua totalidade. Assim, a definição dessa avaliação como um segmento da análise de homogeneidade total, que é composta pela

espessura, peso e homogeneidade da distribuição da substância ativa no filme é mais assertiva. Os ensaios de homogeneidade de conteúdo do filme demonstraram que a nanoencapsulação do fármaco promoveu uma distribuição mais homogênea deste na matriz polimérica, ficando dentro do critério de aceitação determinado pela Farmacopeia Brasileira (85-115%) (DIXIT; PUTHLI, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, 2019; REZAEI; GANJI, 2018).

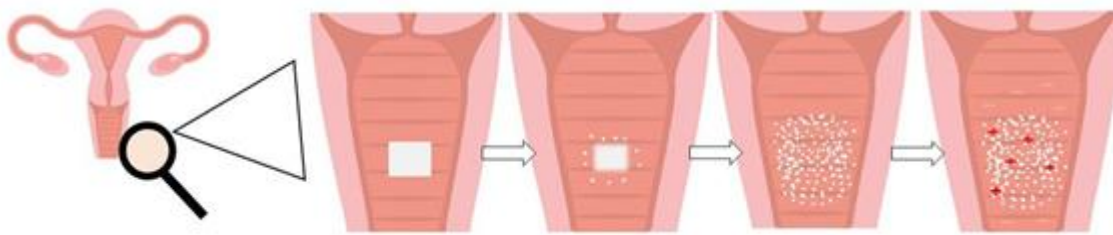
A nanoencapsulação do CTZ promoveu uma liberação controlada do fármaco, que também pode ser observada na permeação *in vitro* em mucosa vaginal bovina. Os benefícios da liberação controlada de fármacos têm sido explorados na literatura há bastante tempo, e podem ser resumidos em: aumento da eficácia, diminuição da frequência de administração e efeitos adversos, redução da variação da concentração plasmática de fármacos e aumento da adesão do paciente ao tratamento (MATHES et al., 2016; MONTANÉ et al., 2020). Em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, o modelo matemático do perfil de liberação das nanocápsulas de Eudragit RS100<sup>®</sup> contendo CTZ já havia sido investigado (SANTOS et al., 2013). Os resultados apontaram que o perfil de liberação deste tipo de formulação se dá por cinética de primeira ordem, ou seja, a liberação do fármaco ocorre em um único passo, sem um efeito *burst* inicial (liberação rápida). A ausência do efeito *burst* significa que a maior parte do fármaco está encapsulado, o que corrobora com a elevada eficiência de encapsulação obtida.

O ensaio da permeação *in vitro* também evidencia que tanto a formulação de CTZ nanoencapsulado como a de CTZ livre apresentaram baixas concentrações do fármaco detectadas no meio receptor. É sabido que a presença dos plastificantes no filme podem agir como co-surfactantes, promovendo um aumento de permeabilidade do CTZ através da mucosa (MANCA et al., 2019). A literatura relata que a aplicação tópica do CTZ é considerada segura, sem apresentar efeitos adversos graves (ZHOU et al., 2016). Os efeitos adversos mais comuns estão geralmente relacionados com a administração oral do fármaco, e incluem náusea, vômito, coceira e aumento de enzimas hepáticas. Além de distúrbios no trato gastrointestinal, raros casos de disúria e depressão foram relacionados ao uso oral do CTZ (CROWLEY; GALLAGHER, 2014). Entretanto, tomando como exemplo os resultados obtidos em nosso estudo, a absorção sistêmica do CTZ em baixas concentrações é conhecidamente segura e não relacionada aos efeitos adversos mencionados (PILMIS et al., 2015). Ainda, os estudos de estabilidade comprovaram que a encapsulação do fármaco beneficia a formulação, evitando o decaimento do teor de CTZ. A conversão de uma forma farmacêutica líquida (suspensão) em uma forma farmacêutica sólida (filme polimérico) apresenta grandes vantagens frente a fenômenos de instabilidade (BORGES et al., 2015; YOSHIOKA; STELLA, 2002). A literatura não relata estudos extensos de estabilidade de fármacos incorporados a filmes poliméricos,

entretanto, a ausência de uma fase externa aquosa, eventos como proliferação microbiana e degradação por hidrólise podem ser minimizados (KARKI et al., 2016).

A eficácia da terapia de doenças que acometem o trato genital feminino inferior baseada em nanopartículas pode ser restringida pelo curto tempo de residência dessas partículas no ambiente vaginal (FLATEN et al., 2015). A fim de superar essa limitação, o desenvolvimento de nanoestruturas com propriedades mucoadesivas ou ainda, incorporadas em formas farmacêuticas que apresentam mucoadesão, têm sido extensivamente investigados, onde filmes poliméricos se incluem nesta abordagem. A literatura classifica os filmes para aplicação vaginal em três categorias: desintegração rápida (liberação rápida de partículas ou moléculas); não-desintegrados e mucoadesivos (filmes que são mucoadesivos, mas não desintegram) e filmes mucoadesivos de desintegração média (GARG et al., 2010). Geralmente, propriedades mucoadesivas estão dissociadas de rápida desintegração, e filmes mucoadesivos podem ser desenvolvidos em dupla-camada a fim de promover uma liberação rápida de ativos ou partículas, seguidas de uma camada mucoadesiva de liberação prolongada (KEVADIYA; ZHANG; DAVÉ, 2018). Em nosso trabalho, as propriedades mucoadesivas da suspensão de NC foram confirmadas e atribuídas ao caráter catiônico da parede polimérica, composta por Eudragit RS100® (CHAVES et al., 2018). Além disso, as propriedades bioadesivas do filme de PUL também se comprovaram através dos ensaios de força de mucoadesão e lavabilidade, onde a formulação contendo NC apresenta propriedades mucoadesivas elevadas, sendo vantajosa frente a formulação de CTZ não encapsulado. O filme apresentou rápido tempo de desintegração e elevada mucoadesão, assim como a suspensão isoladamente. Desta forma, baseado neste conjunto de resultados, uma nova categoria de filmes poderia ser sugerida: filmes mucoadesivos de desintegração rápida. Dentro dessa categoria, o filme é capaz de se desintegrar completamente dentro do tempo estimado para desintegração rápida (10 min), enquanto promove a liberação controlada das partículas que possuem afinidade com o muco vaginal, como mostra a **figura 11**. Assim, o filme possui capacidade de aderência imediata após contato com a mucosa, desintegração rápida e liberação das partículas, que seguem retidas no local de ação, promovendo um efeito antifúngico eficaz e prolongado.

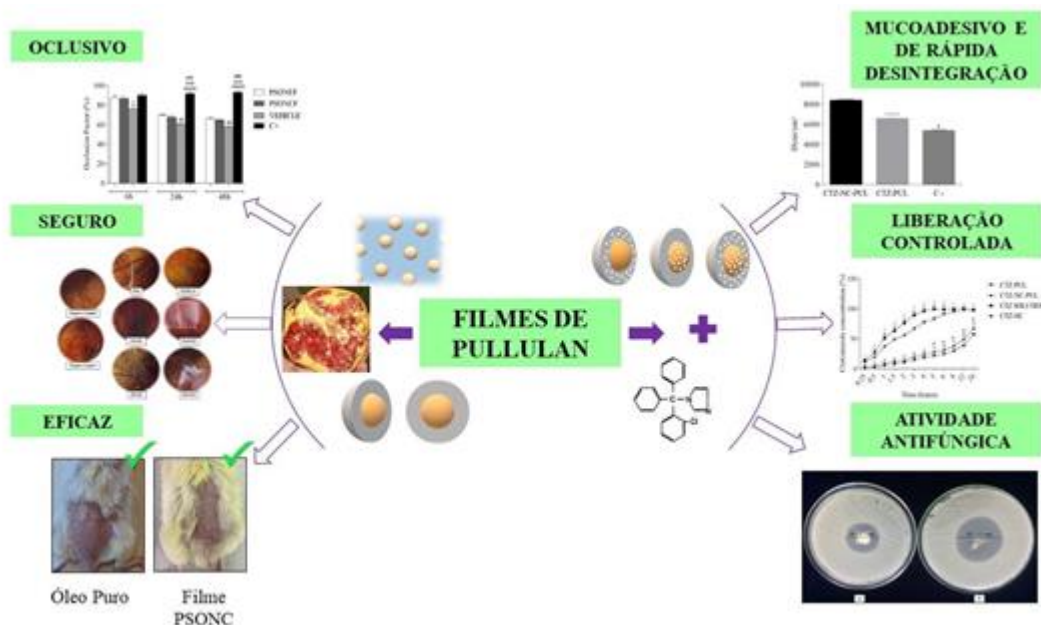
**Figura 11.** Filme mucoadesivo de desintegração rápida. No esquema, o filme se adere a mucosa vaginal e se desintegra rápido, liberando partículas que irão interagir com a mucosa e promover sua retenção no local de ação.



Fonte: Próprio Autor.

Por fim, avaliações *in vitro* demonstraram que a nanoencapsulação do CTZ foi capaz de manter sua atividade antifúngica contra a *Candida albicans*, como observado em outros estudos onde o CTZ foi nanoencapsulado (DE LIMA et al., 2017; SANTOS et al., 2013). Desta forma, o filme desenvolvido pode ser considerado uma alternativa terapêutica estável, segura, mucoadesiva, compatível e eficaz no tratamento da CVV. A **figura 12** contempla os principais achados da dissertação.

**Figura 12.** Filmes de PUL para a aplicação cutânea e vaginal foram desenvolvidos e caracterizados com sucesso, além de apresentar performance biológica superior, estabilidade e características físico-químicas e mecânicas adequadas para as vias de administração propostas.



Fonte: Próprio Autor.



## 6. CONCLUSÕES

Como conclusões gerais, a incorporação de nanocarreadores de óleo de romã em filmes de PUL foi possível, e um produto com características físicas e mecânicas apropriadas para a aplicação cutânea foi desenvolvido com sucesso. Ainda, as propriedades farmacológicas do óleo de romã foram reafirmadas e as vantagens de sua nanoencapsulação evidenciadas através do modelo animal de dermatite atópica. Além disso, a incorporação de um fármaco modelo ao filme contendo nanocápsulas demonstrou estabilidade, segurança, grande potencial bioadesivo e manteve a atividade antifúngica contra a *Candida albicans*. Assim, através deste trabalho, um sistema versátil e inovador para a incorporação de nanoestruturas e liberação de ativos por diferentes vias foi desenvolvido, sendo promissor para a aplicação na terapia de doenças cutâneas e vaginais.



## REFERÊNCIAS

- A. EL-GENDY, N. Pharmaceutical Plasticizers for Drug Delivery Systems. **Current Drug Delivery**, v. 9, n. 2, p. 148–163, 2012.
- ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 581–588, 2012.
- ABRUZZO, A. et al. Bilayered buccal films as child-appropriate dosage form for systemic administration of propranolol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 257–265, 2017.
- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 253–273, 2010.
- ACHOURI, D. et al. Recent advances in ocular drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1599–1617, 2013.
- AHMED, T. A. et al. Enhancement of simvastatin ex vivo permeation from mucoadhesive buccal films loaded with dual drug release carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 4001–4020, 2020.
- AL-SABAHI, B. N. et al. Pomegranate seed oil: Effect on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in PC12 cells and elucidation of unsaturated fatty acids composition. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 40–48, 2017.
- ALVES, N. O. et al. Chitosan/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder biocomposites: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 115–124, 2016.
- ALVES, T. F. R. et al. Bilayer mucoadhesive buccal film for mucosal ulcers treatment: Development, characterization, and single study case. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 1–24, 2020.
- ALVES, V. D.; COSTA, N.; COELHO, I. M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 269–276, 2010.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International. **Www.Astm.Org**, v. 14, p. 1–12, 2018.
- AMRI, Z. et al. Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

- ANUSREE, S. S. et al. Insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by TNF- $\alpha$  is improved by puniceic acid through upregulation of insulin signalling pathway and endocrine function, and downregulation of proinflammatory cytokines. **Biochimie**, v. 146, p. 79–86, 2018.
- AVACHAT, A. M.; GUJAR, K. N.; WAGH, K. V. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 537–542, 2013.
- BALASUBRAMANIAN, R.; KIM, S. S.; LEE, J. Novel synergistic transparent k-Carrageenan/Xanthan gum/Gellan gum hydrogel film: Mechanical, thermal and water barrier properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 561–568, 2018.
- BALOGLU, E. et al. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 312–336, 2009.
- BAOYONG, L. et al. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. **Burns**, v. 36, n. 6, p. 891–896, 2010.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.
- BARTKOWIAK, A. et al. Surface and swelling properties of mucoadhesive blends and their ability to release fluconazole in a mucin environment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, n. August, p. 586–593, 2018.
- BASSI, P.; KAUR, G. Polymeric films as a promising carrier for bioadhesive drug delivery: Development, characterization and optimization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 1, p. 32–43, 2017.
- BASSIRI-JAHROMI, S. Punica granatum (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. **Oncology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2018.
- BEDDEL, H. A. et al. Effects of the nutraceutical, puniceic acid. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 3, p. 328–334, 2017.
- BENSON, H. A. E. et al. Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 5, p. 444–460, 2019.
- BHAKAY, A. et al. Incorporation of Fenofibrate Nanoparticles Prepared by Melt Emulsification into Polymeric Films. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 11, n. 1, p. 53–63, 2016.
- BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are interleukin-1 $\beta$  sensors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 52, p. 14062–14073, 2008.
- BINYAMIN, O. et al. Treatment of a multiple sclerosis animal model by a novel nanodrop formulation of a natural antioxidant. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7165–7174, 2015.

- BORGES, A. F. et al. Oral films: Current status and future perspectives: I-Galenical development and quality attributes. **Journal of Controlled Release**, v. 206, p. 1–19, 2015.
- BUNGE, K. et al. A Phase 1 trial to assess the safety, acceptability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel dapivirine vaginal film. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.
- CALVO, N. L. et al. Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, n. November 2018, p. 181–191, 2019.
- CAROLAN, G.; CATLEY, B. J.; MCDOUGAL, F. J. The location of tetrasaccharide units in pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 114, n. 2, p. 237–243, 1983.
- CARTER, P.; NARASIMHAN, B.; WANG, Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. November 2018, p. 49–62, 2019.
- CASTRO, P. M. et al. Optimization of two biopolymer-based oral films for the delivery of bioactive molecules. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 171–180, 2017.
- CHAN, C. C. et al. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, n. 2, p. 149–157, 2013.
- CHAN, W. et al. Topical delivery of a Rho-kinase inhibitor to the cornea via mucoadhesive film. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 256–264, 2016.
- CHANDRA, A. et al. Rapidly dissolving lacidipine nanoparticle strips for transbuccal administration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, n. February, p. 259–267, 2018.
- CHASSOT, J. M. et al. Pullulan as a stabilizer agent of polymeric nanocapsules for drug delivery. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 735–740, 2016.
- CHATZIVASILEIOU, P.; VYZANTIADIS, T. A. Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches—A literature review. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 638–650, 2019.
- CHAVES, P. D. S. et al. Mucoadhesive Properties of Eudragit®RS100, Eudragit®S100, and Poly(ε-caprolactone) Nanocapsules: Influence of the Vehicle and the Mucosal Surface. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1637–1646, 2018.
- CHEN, C. et al. Effects of Acupuncture on 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene-induced Allergic Contact Dermatitis in Mice. **JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 10, n. 4, p. 252–260, 2017.
- CHIPINDA, I.; HETTICK, J. M.; SIEGEL, P. D. Haptenation: Chemical Reactivity and Protein Binding. **Journal of Allergy**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

CHORILLI, M. et al. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19–30, 2009.

CONTRI, R. V. et al. Nanoencapsulation of Rose-Hip Oil Prevents Oil Oxidation and Allows Obtainment of Gel and Film Topical Formulations. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 863–871, 2016.

COSTA, N. N. et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, n. January, 2020.

COSTANTINI, S. et al. Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed oil on breast cancer cell lines. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8644–8660, 2014.

CROWLEY, P. D.; GALLAGHER, H. C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 611–617, 2014.

CUNHA-REIS, C. et al. Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 43–53, 2016.

D'SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

DAS NEVES, J. et al. Interactions of microbicide nanoparticles with a simulated vaginal fluid. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 11, p. 3347–3356, 2012.

DAUDT, R. M. et al. Nanotechnology as a strategy for the development of cosmetics. **Science and Culture**, v. 65, n. 3, p. 4–7, 2013.

DAWABA, A. M. et al. Fabrication of bioadhesive ocusert with different polymers: Once a day dose. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 309–317, 2018.

DAWN, A. et al. Itch characteristics in atopic dermatitis: Results of a web-based questionnaire. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 3, p. 642–644, 2009.

DE LA O-ESCAMILLA, N. O.; SIDBURY, R. Atopic dermatitis: Update on pathogenesis and therapy. **Pediatric Annals**, v. 49, n. 3, p. e140–e146, 2020.

DE LIMA, J. A. et al. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 886–893, 2017.

DE MELO, I. L. P. et al. Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.). **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 132–139, 2016.

DE MOURA, M. R. et al. Properties of novel hydroxypropyl methylcellulose films containing chitosan nanoparticles. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, 2008.

DE OLIVEIRA, R. P.; DE OLIVEIRA, J. M.; CAMELLA, C. Special issue on vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 1, 2015.

DI PRIMA, G.; CONIGLIARO, A.; DE CARO, V. Mucoadhesive Polymeric Films to Enhance Barbaloin Penetration Into Buccal Mucosa: a Novel Approach to Chemoprevention. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2019.

DIMER, F. A. et al. Impact of nanotechnology on public health: Production of medicines. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DING, Z. et al. W/O nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of Panax notoginseng saponins for brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 213, n. 2015, p. e11, 2015.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Oral strip technology: Overview and future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 2, p. 94–107, 2009.

DOBARIA, N. B.; BADHAN, A. C.; MASHRU, R. C. A novel itraconazole bioadhesive film for vaginal delivery: Design, optimization, and physicochemical characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 951–959, 2009.

DOR-WOJNAROWSKA, A. et al. The Impact of Sex and Age on the Prevalence of Clinically Relevant Sensitization and Asymptomatic Sensitization in the General Population. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 3, p. 253–261, 2017.

DRAELOS, Z. D. The science behind skin care: Moisturizers. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 138–144, 2018.

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

ESPOSITO, E. et al. Nanomedicines to Treat Skin Pathologies with Natural Molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 21, p. 2323–2337, 2019.

FAJARDO, A. R. et al. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 588–595, 2013.

FERREIRA, L. M. et al. Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective antiangioma formulation for intravenous administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 272–277, 2015.

FLATEN, G. E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10–24, 2015.

FRIEND, D. R. Pharmaceutical development of microbicide drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 15, n. 6, p. 562–581, 2010.

GARCÍA-BETANZOS, C. I. et al. The Evaluation of Mechanical, Thermal, Optical and Microstructural Properties of Edible Films with Solid Lipid Nanoparticles-Xanthan Gum

- Stored at Different Temperatures and Relative Humidities. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 10, p. 1756–1768, 2016.
- GARG, S. et al. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. **Antiviral Research**, v. 88, n. SUPPL., p. 19–29, 2010.
- GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016.
- GORMLEY, K.; BERRY, J. Animal welfare bien-être des animaux. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 11, p. 1166–1168, 2009.
- GOYAL, R. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77–92, 2016.
- GRAMMEN, C. et al. Development and characterization of a solid dispersion film for the vaginal application of the anti-HIV microbicide UAMC01398. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1, p. 238–244, 2014.
- GU, J.; YANG, S.; HO, E. A. Biodegradable Film for the Targeted Delivery of siRNA-Loaded Nanoparticles to Vaginal Immune Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 2889–2903, 2015.
- GUO, R. et al. Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 574–583, 2011.
- GUPTA, A.; GARG, S.; KHAR, R. No Title. **Indian Drugs**, v. 30, n. Measurement of bioadhesion strength of mucoadhesive buccal tablet: design of an in vitro assembly., p. 5, 1992.
- HAN, J. H. **Edible Films and Coatings: A Review**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2013.
- HASHEMI GAHRUIE, H. et al. Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with Zataria multiflora essential oil nanoemulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 93–103, 2017.
- HASSAN, P. A.; RANA, S.; VERMA, G. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2015.
- HORINAKA, J. ICHI; HASHIMOTO, Y.; TAKIGAWA, T. Optical and mechanical properties of pullulan films studied by uniaxial stretching. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 584–587, 2018.
- HUSSAIN, Z. et al. Recent Advances in Polymer-based Wound Dressings for the Treatment of Diabetic Foot Ulcer: An Overview of State-of-the-art. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 5, p. 527–550, 2017.



- IQBAL, B.; ALI, J.; BABOOTA, S. Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. **International Journal of Dermatology**, v. 57, n. 6, p. 646–660, 2018.
- IQBAL, Z.; DILNAWAZ, F. Nanocarriers For Vaginal Drug Delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 13, n. 1, p. 3–15, 2019.
- IRFAN, M. et al. Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 537–546, 2016.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.
- JALIL, A. et al. S-protected gellan gum: Decisive approach towards mucoadhesive antimicrobial vaginal films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 148–157, 2019.
- JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 137–147, 2007.
- K.R., S.; PONNUSAMI, V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 573–591, 2017.
- KALPANA S, P. et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 11, n. 11083, p. 109–131, 2010.
- KALYANWAT, R.; SHRIVASTAVA, B.; PATHAK, K. Preparation and evaluation of bioadhesive ocular inserts of aceclofenac. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 41, n. 2, p. 207–213, 2016.
- KANDA, N.; HOASHI, T.; SAEKI, H. The roles of sex hormones in the course of atopic dermatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019.
- KANG-MIELER, J. J.; OSSWALD, C. R.; MIELER, W. F. Advances in ocular drug delivery: Emphasis on the posterior segment. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 10, p. 1647–1660, 2014.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390–401, 2002.
- KAPLAN, D. H.; IGYÁRTÓ, B. Z.; GASPARI, A. A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 114–124, 2012.
- KAPUR, S.; WATSON, W.; CARR, S. Atopic dermatitis. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. s2, p. 1–10, 2018.
- KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559–574, 2016.

- KATZ, D. F.; YUAN, A.; GAO, Y. Vaginal drug distribution modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 2–13, 2015.
- KEVADIYA, B. D.; ZHANG, L.; DAVÉ, R. N. Sustained Release of Poorly Water-Soluble Drug from Hydrophilic Polymeric Film Sandwiched Between Hydrophobic Layers. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 6, p. 2572–2584, 2018.
- KHAJEBISHAK, Y. et al. Punicic acid: A potential compound of pomegranate seed oil in Type 2 diabetes mellitus management. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2112–2120, 2019.
- KIM, D.; KOBAYASHI, T.; NAGAO, K. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Atopic Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 984–990.e1, 2019.
- KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012.
- KNOOP, H. E.; HOWELL, M. Process for solvent casting a film. n. 19, p. 9, 1987.
- KOLA, R.; KUMAR, B. P. A detailed description of synthetic and natural polymers which are used in the formulation of sustained release drug delivery system: A review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 161–169, 2013.
- KRAISIT, P. et al. Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 34–43, 2018.
- KRULL, S. M. et al. Preparation and characterization of fast dissolving pullulan films containing BCS class II drug nanoparticles for bioavailability enhancement. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 7, p. 1073–1085, 2016.
- KULKARNI, V. S.; SHAW, C. Formulating Creams, Gels, Lotions, and Suspensions. **Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages**, p. 29–41, 2016.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.
- KURAKULA, M. et al. Solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of avanafil: optimization, formulation, in-vitro and ex-vivo studies. **Journal of Liposome Research**, v. 26, n. 4, p. 288–296, 2016.
- LADEMANN, J. et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.
- LAFFLEUR, F.; ATAIL, M. Preparation and evaluation of a novel dosage form for onychomycosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1–2, p. 105–110, 2017.

LAI, K. L. et al. Orally-dissolving film for sublingual and buccal delivery of ropinirole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 9–18, 2018.

LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 177–206, 2007.

LEYVA-GÓMEZ, G. et al. Approaches in polymeric nanoparticles for vaginal drug delivery: A review of the state of the art. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1–19, 2018.

LI, H. et al. The preparation of hyaluronic acid grafted pullulan polymers and their use in the formation of novel biocompatible wound healing film. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, n. February, p. 92–100, 2018.

LI, H. et al. Experimental Methods in Chemical Engineering: Particle Size Distribution by Laser Diffraction—PSD. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, n. 7, p. 1974–1981, 2019.

LI, X. et al. Filmes bucais mucoadesivos de tramadol para o controle eficaz da dor. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 67, n. 3, p. 231–237, 2017.

LIEW, K. BIN; TAN, Y. T. F.; PEH, K. K. Effect of polymer, plasticizer and filler on orally disintegrating film. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 1, p. 110–119, 2014.

LIU, Q. et al. Encapsulation of curcumin in zein/ caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. February, p. 432–442, 2019.

MAALI, A.; MOSAVIAN, M. T. H. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000-2010). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 92–105, 2013.

MACHADO, A. et al. Development and in vivo safety assessment of tenofovir-loaded nanoparticles-in-film as a novel vaginal microbicide delivery system. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 332–340, 2016.

MACHADO, R. M. et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 14–26, 2015.

MALGARIM CORDENONSI, L. et al. The role of chitosan as coating material for nanostructured lipid carriers for skin delivery of fucoxanthin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, n. June, 2019.

MANCA, M. L. et al. Sorbitol-penetration enhancer containing vesicles loaded with baicalin for the protection and regeneration of skin injured by oxidative stress and UV radiation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. November 2018, p. 175–183, 2019.

MANSURI, S. et al. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151–172, 2016.

- MARCHIORI, M. C. L. et al. Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 25–32, 2017.
- MARTÍNEZ-PÉREZ, B. et al. Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, n. November 2017, p. 185–195, 2018.
- MARTINS, L. E. A. M.; DOS REIS, V. M. S. Immunopathology of allergic contact dermatitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 419–433, 2011.
- MATHES, C. et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **Journal of Controlled Release**, v. 223, p. 207–214, 2016.
- MINAEI, S. E. et al. In vitro anti-cancer efficacy of multi-functionalized magnetite nanoparticles combining alternating magnetic hyperthermia in glioblastoma cancer cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 101, n. August 2018, p. 575–587, 2019.
- MINGHETTI, P.; CILURZO, F.; CASIRAGHI, A. Measuring adhesive performance in transdermal delivery systems. **American Journal of Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 193–206, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, A. N. DE V. S.-A. Farmacopeia Brasileira, 6a edição. **Farmacopeia Brasileira, 6a edição**, v. 1, p. 60–69, 72–85, 2019.
- MISHRA, R.; JOSHI, P.; MEHTA, T. Formulation, development and characterization of mucoadhesive film for treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 6, n. 1, p. 47, 2016.
- MIZRAHI, M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: The case of genetic CJD. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1353–1363, 2014.
- MOFAZZAL JAHROMI, M. A. et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 33–64, 2018.
- MONTANÉ, X. et al. Encapsulation for cancer therapy. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–25, 2020.
- MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.
- MOREIRA, M. I. D. M. C. G. Azóis: Farmacologia e Interações Medicamentosas. p. 65, 2010.
- MORSI, N. et al. Nanodispersion-loaded mucoadhesive polymeric inserts for prolonged treatment of post-operative ocular inflammation. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 3, p. 280–292, 2017.

- MOTA FERREIRA, L. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2968–2977, 2016.
- MUKHERJEE, D.; BHARATH, S. Design and Characterization of Double Layered Mucoadhesive System Containing Bisphosphonate Derivative. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1–10, 2013.
- MUSAZZI, U. M. et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences Poly ( methyl methacrylate ) salt as fi lm forming material to design orodispersible fi lms. v. 115, n. October 2017, p. 37–42, 2018.
- NAIR, A. B. et al. In vitro techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013.
- NASTITI, C. M. R. R. et al. Topical nano and microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 1–25, 2017.
- NEL, A. M. et al. Acceptability of vaginal film, soft-gel capsule, and tablet as potential microbicide delivery methods among African women. **Journal of Women's Health**, v. 20, n. 8, p. 1207–1214, 2011.
- NIELSEN, L. S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 231–239, 1998.
- NOTARIO-PÉREZ, F. et al. Development of mucoadhesive vaginal films based on HPMC and zein as novel formulations to prevent sexual transmission of HIV. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 570, n. May, 2019.
- OLIVEIRA, A. G. DE L. et al. Chorioallantoic membrane assays ( HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153–159, 2012.
- PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. et al. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. **Altex**, v. 35, n. 4, p. 495–503, 2018.
- PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. New strategies for local treatment of vaginal infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 105–122, 2015.
- PANTH, N.; MANANDHAR, B.; PAUDEL, K. R. Anticancer Activity of Punica granatum (Pomegranate): A Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 4, p. 568–578, 2017.
- PAOLICELLI, P. et al. Effect of glycerol on the physical and mechanical properties of thin gellan gum films for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 226–234, 2018.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015.

PARK, J. B. et al. Development of an antifungal denture adhesive film for oral candidiasis utilizing hot melt extrusion technology. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2015.

PATEL, R.; SHAH, D. Nanoparticles loaded sublingual film as an effective treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. **International Journal of PharmTech Research**, v. 8, n. 10, p. 77–87, 2015.

PEGORARO, N. S. et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 32–40, 2017.

PEREIRA, G. G. et al. Polymeric films loaded with vitamin e and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PILMIS, B. et al. Antifungal drugs during pregnancy: An updated review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 14–22, 2015.

PIOTROWSKI, M. et al. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing undecylenic acid: Synthesis, biocompatibility and neuroprotective properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 8–17, 2015.

PIRES, A. L. R. et al. Towards wound dressings with improved properties: Effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan-alginate films loaded with thymol and beta-carotene. **Materials Science and Engineering C**, v. 93, n. November 2017, p. 595–605, 2018.

PLANZ, V.; LEHR, C. M.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89–104, 2016.

PRAJAPATI, V. D. et al. Pullulan based oral thin film formulation of zolmitriptan: Development and optimization using factorial design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2075–2085, 2018.

PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; SANDLER, N. Perspective: Concepts of printing technologies for oral film formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 2, p. 578–584, 2015.

PRODDUTURI, S. et al. Stabilization of hot-melt extrusion formulations containing solid solutions using polymer blends. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, 2007.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, n. November 2017, p. 203–225, 2018.

REES, J. L.; FRIEDMANN, P. S.; MATTHEWS, J. N. S. Sex differences in susceptibility to development of contact hypersensitivity to dinitrochlorobenzene (DNCB). **British Journal of Dermatology**, v. 120, n. 3, p. 371–374, 1989.

REGEV, G. et al. Novel Application of Hot Melt Extrusion for the Manufacturing of Vaginal Films Containing Microbicide Candidate Dapivirine. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 1–11, 2019.

REPKA, M. A.; PRODDUTURI, S.; STODGHILL, S. P. Production and characterization of hot-melt extruded films containing clotrimazole. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 7, p. 757–765, 2003.

REZAEI, F.; GANJI, F. Formulation, Characterization, and Optimization of Captopril Fast-Dissolving Oral Films. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 2203–2212, 2018.

ROBERTS, M. S. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017.

ROESCH, G. C.; VOLPATO, N. M. A harmonização da avaliação farmacopéica da uniformidade de doses unitárias de medicamentos. **Infarma**, v. 22, p. 1–80, 2010.

RUSSO, E. et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 113–125, 2016.

S. PENDEKAL, M.; K. TEGGINAMAT, P. Formulation and evaluation of a bioadhesive patch for buccal delivery of tizanidine. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 3, p. 318–324, 2012.

SANTOS, S. S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1389–1394, 2013.

SHABBIR, M. A. et al. Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.

SHAHZAD, Y. et al. Natural and semisynthetic polymers blended orodispersible films of citalopram. **Natural Product Research**, v. 34, n. 1, p. 16–25, 2020.

SHESHALA, R. et al. In Vitro Drug Dissolution/Permeation Testing of Nanocarriers for Skin Application: a Comprehensive Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, 2019.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79, 2007.

SIANO, F. et al. Physico-chemical properties and fatty acid composition of pomegranate,

cherry and pumpkin seed oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1730–1735, 2016.

SIBBALD, C.; DRUCKER, A. M. Patient Burden of Atopic Dermatitis. **Dermatologic Clinics**, v. 35, n. 3, p. 303–316, 2017.

SIEMANN, U. Solvent cast technology - A versatile tool for thin film production. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 130, n. June, p. 1–14, 2005.

SINGH, R. S. et al. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 102–121, 2017.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. F. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 190–207, 2015.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.

SOGUT, E. et al. The properties of  $\kappa$ -carrageenan and whey protein isolate blended films containing pomegranate seed oil. **Polymer Testing**, v. 77, n. February, p. 105886, 2019.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 2012.

SONVICO, F. et al. Physicochemical and pharmacokinetic properties of polymeric films loaded with cisplatin for the treatment of malignant pleural mesothelioma. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. Suppl 2, p. S194–S206, 2018.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149–155, 2001.

STEILING, W. et al. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375–384, 1999.

TABASUM, S. et al. A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 603–632, 2018.

TEJADA, G. et al. Formulation and in-vitro efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 140–150, 2017.

THOMSEN, S. F. Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment. **ISRN Allergy**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

THOMSON, J.; WERNHAM, A. G. H.; WILLIAMS, H. C. Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a critical appraisal. **British Journal of Dermatology**, v. 178, n. 4, p. 897–902, 2018.



- TONG, Q.; XIAO, Q.; LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 1007–1014, 2008.
- TRAORE, Y. L. et al. Dynamic mechanical behaviour of nanoparticle loaded biodegradable PVA films for vaginal drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 8, p. 1119–1126, 2018.
- TROVATTI, E. et al. Pullulan-nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. **Composites Science and Technology**, v. 72, n. 13, p. 1556–1561, 2012.
- ULLOA, P. A. et al. Development of poly(lactic acid) films with propolis as a source of active compounds: Biodegradability, physical, and functional properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 8, p. 1–11, 2019.
- VENTURINI, C. G. et al. Vegetable oil-loaded nanocapsules: Innovative alternative for incorporating drugs for parenteral administration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1310–1320, 2016.
- VON KOBYLETZKI, L. B. et al. What factors are important to patients when assessing treatment response: An international cross-sectional survey. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 97, n. 1, p. 86–90, 2017.
- VOSS, G. T. et al. Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselanyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Materials Science and Engineering C**, v. 84, n. November 2017, p. 90–98, 2018a.
- VOSS, G. T. et al. Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising device to accelerate diabetic wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, n. 1–2, p. 340–351, 2018b.
- VOSS, G. T. et al. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. **Materials Science and Engineering C**, v. 114, p. 111074, 2020.
- VUDDANDA, P. R. et al. Effect of plasticizers on the physico-mechanical properties of pullulan based pharmaceutical oral films. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 290–298, 2017.
- WASILEWSKA, K.; WINNICKA, K. How to assess orodispersible film quality? A review of applied methods and their modifications. **Acta Pharmaceutica**, v. 69, n. 2, p. 155–176, 2019.
- WERKMAN, C. et al. - Revisao\_V10N3. p. 104–111, 2008.
- WILLIAMS, A. C. D. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420–2423, 2016.
- WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WORKOWSKI, K.; BOLAN, G. **Treatment guidelines**. [s.l: s.n.]. v. 64

WU, J. et al. Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 82–91, 2013.

YAYLA, M. et al. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1262–1268, 2018.

YOO, J. W.; ACHARYA, G.; LEE, C. H. In vivo evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide. **Biomaterials**, v. 30, n. 23–24, p. 3978–3985, 2009.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs And Dosage Forms**. [s.l: s.n.].

ZHANG, D. et al. Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 189–199, 2015.

ZHOU, X. et al. The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. **Mycoses**, v. 59, n. 7, p. 419–428, 2016.

ZHU, G.; SHENG, L.; TONG, Q. Preparation and characterization of carboxymethyl-gellan and pullulan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 341–347, 2014.

**ANEXOS**





**PARECER N°**  
**PROCESSO N°**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**140/2019/CEEA/REITORIA**  
23110.046760/2019-30

**Certificado**

Certificamos que a solicitação de **adendo** à proposta intitulada **“ AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS SINTÉTICOS INÉDITOS NA DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA POR 2,4-DINITROCLOROBENZENO EM CAMUNDONGOS ”** (CEEA 23357-2018), registrada com o n° 23110.046760/2019-30, sob a responsabilidade de **Ethel Antunes Wilhelm** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **13 de novembro de 2019**.

**Solicitação: Acréscimo de 200 camundongos BALB/c, fêmeas, com 60 dias.**

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEA*



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 18/11/2019, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0787026** e o código CRC **4FDF1DBF**.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de formulações de base nanotecnológica utilizando o ensaio de membrana cório- alantóide (HET-CAM)", protocolada sob o CEUA nº 5428271020 (ID 003287), sob a responsabilidade de **Letícia Cruz e equipe; Jéssica Brandão Reolon; Mailine Gehrcke; Vinicius Costa Prado; Bárbara Felin Osmari** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 05/01/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of nanotechnology-based formulations using the chorio-allantoic membrane assay (HET- CAM) ", utilizing 1452 Chick embryo (males and females), protocol number CEUA 5428271020 (ID 003287), under the responsibility of **Letícia Cruz and team; Jéssica Brandão Reolon; Mailine Gehrcke; Vinicius Costa Prado; Bárbara Felin Osmari** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 01/05/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2021** a **01/2024**

Área: **Departamento de Farmácia Industrial** Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Ovos embrionados de aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **9 a 10 dias**

N: **1452** Linhagem: **COBB**

Peso: **50 a 60 g**

Local do experimento: Serão mantidos durante o período experimental no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (anexo C, prédio 26) sob responsabilidade da Prof. Letícia Cruz.

Santa Maria, 21 de julho de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento

Lemos Pinto Filho Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Maria

Universidade Federal de Santa Maria

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu