

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

Fernanda Padoin dos Reis

**HIDROGEL DE GOMA DE ALFARROBA CONTENDO
NANOCÁPSULAS DE DISSELENETO DE DIFENILA PARA O
TRATAMENTO DA TRICOMONÍASE VAGINAL**

Santa Maria, RS
2021

Fernanda Padoin dos Reis

**HIDROGEL DE GOMA DE ALFARROBA CONTENDO NANOCÁPSULAS DE
DISSELENETO DE DIFENILA PARA O TRATAMENTO DA TRICOMONÍASE
VAGINAL**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leticia Cruz

Santa Maria, RS
2021

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

Reis, Fernanda Padoin dos
HIDROGEL DE GOMA DE ALFARROBA CONTENDO NANOCÁPSULAS
DE DISSELENETO DE DIFENILA PARA O TRATAMENTO DA
TRICOMONÍASE VAGINAL / Fernanda Padoin dos Reis.- 2021.
86 f.; 30 cm

Orientadora: Letícia Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Nanopartículas 2. Selênio 3. Via Vaginal 4.
Semissólidos 5. Trichomonas vaginalis I. Cruz, Letícia
II. 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, FERNANDA PADOIN DOS REIS, 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.

Fernanda Padoin dos Reis

**HIDROGEL DE GOMA DE ALFARROBA, CONTENDO NANOCÁPSULAS DE
DISSELENETO DE DIFENILA PARA O TRATAMENTO DA TRICOMONÍASE
VAGINAL**

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

Aprovado em 27 de setembro de 2021:



Leticia Cruz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)



Luana Mota Ferreira, Dr^a. (UNICENTRO)



Charlene Menezes, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me proteger e sempre guiar as minhas escolhas, sejam elas profissionais ou pessoais, e a mim por ser forte e não desistir dos meus sonhos.

À minha família, minha mãe Margarete, meu pai Sérgio e meu avô Napoleão, pelo amor, carinho e companheirismo, que foram essenciais para chegar até aqui. À minha avó Helena, por todos os momentos felizes que me proporcionou em vida, sinto imensas saudades.

Ao meu namorado, Guilherme, meu mestre e futuro doutor em química orgânica preferido. Meu maior incentivador para seguir no mestrado, agradeço por todo amor, companheirismo, força e suporte que me destes, além da compreensão e paciência durante os momentos difíceis.

Faço um agradecimento muito especial as minhas amigas de faculdade que viraram amigas de coração e de vida Alice, Diulia, Gabriela, Natieli e Tacieli, pelo apoio e carinho incondicional, por estarem comigo durante toda essa caminhada, me lembrando sempre que eu tenho muitos motivos para levantar a cabeça e seguir em frente.

Agradeço à minha orientadora, Letícia Cruz, por todo o ensinamento, compreensão, carinho e confiança no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do LabTec, grupo de pesquisa que admirei desde a graduação e sempre quis fazer parte. Agradeço também à professora Scheila Schaffazick pelos conhecimentos compartilhados.

Ao grupo LabTec, agradeço pelo convívio, colaboração e momentos de descontração. Por toda troca de conhecimento e crescimento pessoal que tive com pessoas incríveis e bondosas. Agradeço especialmente a Jéssica, por todo incentivo e generosidade que teve comigo, sempre me ajudando em tudo que precisei.

Aos grupo de pesquisa LASRAFTO e GPTrico pela ajuda tanto com matérias primas quanto nos experimentos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo ensino de qualidade, e à CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

HIDROGEL DE GOMA DE ALFARROBA CONTENDO NANOCÁPSULAS DE DISSELENETO DE DIFENILA PARA O TRATAMENTO DA TRICOMONÍASE VAGINAL

AUTORA: Fernanda Padoin dos Reis

ORIENTADORA: Leticia Cruz

A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST) que tem como vetor o parasita *Trichomonas vaginalis*. As terapias convencionais apresentam na maioria dos casos uma baixa eficácia e elevada toxicidade, sendo relevante a busca por novas terapias. O Disseleneto de Difenila (PhSe)₂ é um composto orgânico de selênio com propriedades antioxidante, antiinflamatória, além de atividade frente a alguns microorganismos. Porém, este composto apresenta elevada lipofilia e efeitos tóxicos, o que dificulta seu uso clínico. Nesse sentido, as nanocápsulas poliméricas tornam-se uma alternativa interessante para contornar as limitações do (PhSe)₂. Diante disso, esta dissertação teve como objetivo desenvolver suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 e óleo de coco contendo (PhSe)₂ e avaliar, de forma inédita, sua atividade anti-*trichomonas*, além de investigar a viabilidade da preparação de um hidrogel contendo as nanocápsulas, utilizando a goma de alfarroba como agente formador de gel, visando a aplicação vaginal. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e foram observadas características compatíveis com sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos, como tamanho médio de partícula na faixa nanométrica (193-206 nm), índice de polidispersão adequado (0,19-0,22), potencial zeta positivo, pH na faixa ácida (4,97-5,04), teor do composto próximo ao valor teórico (1,04 mg/mL), e elevada eficiência de encapsulamento (99,92 %). Na avaliação da atividade *in vitro* em células infectadas pelo *T. vaginalis*, (PhSe)₂ nanoencapsulado em concentrações intermediárias, reduziu a viabilidade do trofozoíto de forma mais expressiva em comparação à forma livre do ativo.. A capacidade antioxidante do (PhSe)₂ nanoencapsulado foi superior à forma livre. A avaliação do potencial mucoadesivo das nanocápsulas, com alteração do diâmetro médio e a inversão do potencial zeta, comprovou seu potencial mucoadesivo, atribuído ao polímero catiônico. Os hidrogéis foram preparados a partir do espessamento das suspensões de nanocápsulas com a goma de alfarroba (3%). As formulações desenvolvidas apresentaram características físico-químicas adequadas para aplicação vaginal, mantendo o tamanho nanométrico na faixa de 237-295 nm (espectroscopia de correlação de fótons), teor de ativo próximo ao valor teórico (1mg/g de (PhSe)₂) (CLAE), valores de pH próximo à faixa da neutralidade 6,16-6,20 (potenciometria), assim como comportamento reológico não-newtoniano pseudo-plástico (viscosímetro rotacional). A avaliação do potencial de irritação pelo método da membrana corioalantóide indicou ausência de hemorragia, coagulação ou lise, demonstrando que as formulações são consideradas não-irritantes. A força mucoadesiva dos hidrogéis foi aprimorada para o ativo nanoencapsulado em comparação ao (PhSe)₂ livre, demonstrando a escolha correta da goma. A permeação através da mucosa vaginal bovina utilizando células de *Franz* evidenciou que as formulações permaneceram na superfície da mucosa vaginal, o que é ideal para o tratamento de infecções vaginais superficiais. Portanto, baseado nos resultados obtidos, o desenvolvimento do hidrogel atendeu a finalidade terapêutica proposta, podendo ser uma alternativa promissora para o tratamento da tricomoníase.

Palavras-chave: Nanopartículas; Selênio; Via vaginal; Semissólidos; *Trichomonas vaginalis*.

ABSTRACT

LOCUST BEAN GUM HYDROGEL CONTAINING DIPHENYL DISELENIDE NANOCAPSULES FOR VAGINAL TREATMENT OF TRICHOMONIASIS

AUTHOR: Fernanda Padoin dos Reis

ADVISOR: Leticia Cruz

Trichomoniasis is a sexually transmitted infection (IST) whose vector is the parasite *Trichomonas vaginalis*. Conventional therapies have, in most cases, low efficacy and high toxicity, making the search for new therapies relevant. Diphenyl diselenide (PhSe)₂, is an organic selenium compound with antioxidant, anti-inflammatory properties, in addition to activity against some microorganisms. However, this compound has high lipophilicity and toxic effects, which makes its clinical use difficult. In this sense, polymeric nanocapsules become an interesting alternative to overcome its limitations. Therefore, this dissertation aimed to develop nanocapsule suspensions of Eudragit® RS100 and coconut oil containing (PhSe)₂ and to evaluate, in an unprecedented way, its anti-trichomonas activity, in addition to investigating the feasibility of preparing a hydrogel with this suspension, using locust bean gum as a gel-forming agent, aiming at vaginal application for the treatment of trichomoniasis. The nanocapsule suspensions were prepared by the preformed polymer interfacial deposition method and characteristics compatible with nanostructured drug delivery systems were observed, such as average particle size in the nanometric range (193-206 nm), adequate polydispersion index (0.19-0.22), positive zeta potential, pH in the acidic range (4.97-5.04), compound content close to theoretical value (1.04 mg/mL), and high encapsulation efficiency (99.92 %). In the evaluation of the *in vitro* activity in cells infected by *T. vaginalis*, (PhSe)₂ nanoencapsulated at intermediate concentrations reduced the viability of the trophozoite more significantly compared to the free form of the active, due to controlled release provided by the nanocarrier system. The antioxidant capacity of nanoencapsulated (PhSe)₂ was superior to the free form. The mucoadhesion evaluation of the nanocapsules, with change in the average diameter and the inversion of the zeta potential, confirmed their mucoadhesive potential, attributed to the cationic polymer. The hydrogels were prepared by thickening the nanocapsule suspensions with locust bean gum (3%). The developed formulations presented physicochemical characteristics suitable for vaginal application, maintaining the nanometer size in the range of 237-295 nm (photon correlation spectroscopy), active content close to the theoretical value (1mg/g of (PhSe)₂) (HPLC), pH values in the neutrality range 6.16-6.20 (potentiometry), as well as non-Newtonian pseudo-plastic behavior (rotational viscometer). The evaluation of the irritation potential by the chorioallantoic membrane method indicated the absence of hemorrhage, coagulation or lysis, demonstrating that the formulations are considered non-irritating. The mucoadhesive strength of hydrogels was improved for the nanoencapsulated active compared to the free (PhSe)₂, demonstrating the correct choice of gum. Permeation through the bovine vaginal mucosa using Franz cells showed that the formulations remained on the surface of the vaginal mucosa, which is ideal for the treatment of superficial vaginal infections. Therefore, based on the results obtained, the development of the hydrogel met the proposed therapeutic purpose and could be a promising alternative for the treatment of trichomoniasis.

Keywords: Nanoparticles; Selenium; Vaginal route; Semisolids; *Trichomonas vaginalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do (PhSe) ₂	19
Figura 2- Diagrama esquemático dos diversos tipos de nanocarreadores usados para entrega de ativos.....	24
Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco	25
Figura 4- Método de Deposição interfacial do polímero pré-formado para formação de nanocápsulas poliméricas	26
Figura 5- Estrutura química do Eudragit® RS100	27
Figura 6- Estrutura química da goma de alfarroba.....	32
Figura 7- Foto da suspensão NC-B (A) e da suspensão NC- (PhSe) ₂ (B)	47
Figura 8- Atividade anti- <i>T. vaginalis</i> (PhSe) ₂ , NC-(PhSe) ₂ e NC-B contra isolado ATCC 30236. Os dados são apresentados como média e desvio padrão do controle (considerando 100% de viabilidade dos trofozoítos) (ANOVA de uma via, seguida de <i>Tukey</i>). Onde: (***) p <0,001: diferença estatística entre controle e tratamento. (###) p <0,001: diferença estatística entre NC-B e NC-(PhSe) ₂ . (@@@) p <0,001: diferença estatística entre (PhSe) ₂ e NC-(PhSe) ₂	48
Figura 9- Potencial antioxidante avaliado pelo ensaio do DPPH (média ± desvio padrão, n = 3) (ANOVA de uma via, seguida de <i>Tukey</i>). (**) p < 0,01, (***) p <0,001: significa diferença significativa entre NC-(PhSe) ₂ e demais tratamentos. (#) p <0,05, (###) p <0,001: diferença significativa entre OC e demais tratamentos.....	51
Figura 10- Representação gráfica do diâmetro médio (A) e potencial zeta (B) das suspensões antes (NC-(PhSe) ₂ ; NC-B) e após (NC-(PhSe) ₂ + M; NCB + M) o contato com a dispersão de mucina (média ± desvio padrão, n = 3) (teste t pareado). (##) p < 0,01 e (###) p <0,001: indica diferença estatística entre tamanho da formulação de nanocápsulas antes e depois do contato com mucina. (**) p < 0,01 e p < 0,001(***): indica diferença estatística entre potencial zeta da formulação de nanocápsulas antes e depois do contato com mucina.....	52
Figura 11- Aspecto macroscópico dos hidrogéis de goma de alfarroba.....	53
Figura 12- Representação gráfica da espalhabilidade das formulações HG-(PhSe) ₂ , HG-NCB e HG-NC(PhSe) ₂ em função do peso adicionado (g) (média ± desvio padrão, n = 3). (ANOVA de uma via, seguido de <i>Tukey</i>)......	56
Figura 13- Representação gráfica da viscosidade dos hidrogéis (mPa.s) versus a taxa de cisalhamento (s ⁻¹). (n=3).....	57

Figura 14- Representação gráfica da tensão de cisalhamento (mPa) versus a taxa de cisalhamento (s ⁻¹), (n=3).....	57
Figura 15- Imagens do teste em membrana corioalantóide. Membranas expostas no tempo zero, e após 5 minutos, respectivamente, que correspondem: A e B ao (PhSe) ₂ livre; C e D à NC-(PhSe) ₂ ; E e F à NC-B; G e H à HG-NC(PhSe) ₂ ; I e J à HG-NCB; K e L à HG-(PhSe) ₂ ; M e N à HG-Veículo e O e P aos controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (NaOH 0,1 M).	60
Figura 16- Representação gráfica da força mucoadesiva dos hidrogéis em mucosa vaginal bovina (média ± desvio padrão, n = 3) (ANOVA de uma via, seguida de Tukey). (*) p<0,05 e (**) p <0,01: diferença estatística entre Carbopol Ultrez e os demais hidrogéis.). (#) p<0,05 e (###) p <0,001: diferença estatística entre HG-(PhSe) ₂ e os demais hidrogéis. (@) p<0,05: indica diferença estatística entre HG-NCB e HG-NC(PhSe) ₂	61
Figura 17- Estudo de permeação em mucosa vaginal bovina (média ± desvio padrão, n = 6) (teste t não pareado). p > 0,05: significa que não houve diferença estatística	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades farmacológicas do (PhSe) ₂	20
Tabela 2- Aplicações de hidrogéis de base nanotecnológica destinado ao tratamento de afecções vaginais.....	34
Tabela 3- Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (média ± desvio padrão, n=3, teste t).	48
Tabela 4- Características físico-químicas das formulações semissólidas desenvolvidas (média ± desvio padrão, n=3, teste t e ANOVA seguido de Tukey para pH).	54
Tabela 5- Determinação do fator de espalhabilidade dos hidrogéis. Média ± desvio padrão, n=3. (ANOVA de uma via, seguido de Tukey).	56
Tabela 6- Coeficientes de correlação (r) obtidos para os diferentes modelos matemáticos (média ± desvio padrão, n = 3).	58
Tabela 7- Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) dos hidrogéis (média ± desvio padrão, n = 3) (ANOVA de um fator, seguido de Tukey). (*) p <0,05: diferença estatística entre HG-(PhSe) ₂ e HG-NCB, (#) p <0,05: diferença estatística entre HG-(PhSe) ₂ e HG-NC(PhSe) ₂ . ..	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δALA-D	Ácido delta-aminolevulínico
ATP	Adenosina trifosfato
CEV	Células epiteliais vaginais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
COSe	Compostos orgânico de selênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EHL	Equilíbrio hidrófilico-lipofílico
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutationa reduzida
GPx	Glutationa peroxidase
HGs	Hidrogéis
HG-NCB	Hidrogel contendo nanocápsulas brancas
HG-(PhSe) ₂	Hidrogel contendo (PhSe) ₂ livre
HG-NC(PhSe) ₂	Hidrogel contendo nanocápsulas de (PhSe) ₂
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus humano
HSV-2	Vírus Herpes Simples 2
I3C	Indol-3-carbinol
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
IPD	Índice de polidispersão
MCA	Membrana corioalantóide
NC-(PhSe) ₂	Suspensão de nanocápsulas de Disseleneto de Difenila
NC-B	Suspensão de nanocápsulas branca
OC	Óleo de coco
OMS	Organização Mundial da Saúde
(PhSe) ₂	Disseleneto de difenila
PEG	Polietilenoglicol
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Se	Selênio
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TrxR	Tiorredoxina redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 TRICOMONÍASE: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, COMPLICAÇÕES E RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO	15
3.2 DISSELENETO DE DIFENILA: UM COMPOSTO DE ORGANOSSELÊNIO COM PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS PROMISSORAS	18
3.2.1 Selênio	18
3.2.2 Disseleneto de difenila	19
3.4 NANOTECNOLOGIA VOLTADA PARA APLICAÇÃO VAGINAL.....	22
3.5 HIDROGÉIS DE BASE NANOTECNOLÓGICA COMO FORMA FARMACÊUTICA FINAL PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAIS	38
4.1.1 Matérias Primas	38
4.1.2 Solventes	38
4.1.3 Equipamentos e outro materiais	38
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas	39
4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas	39
4.2.3 Avaliação da atividade anti-<i>T. vaginalis</i>	40
4.2.3.1 Cultura celular de <i>T. vaginalis</i>	40
4.2.3.2 Ensaio de atividade anti- <i>T. Vaginalis</i>	41
4.2.4 Determinação do potencial antioxidante	41
4.2.5 Avaliação da mucoadesão <i>in vitro</i> das suspensões de nanocápsulas	42
4.2.6 Preparação dos hidrogéis	42
4.2.7 Caracterização físico-química dos hidrogéis	43
4.2.8 Avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis	43
4.2.9 Avaliação reológica dos hidrogéis	44

4.2.10 Avaliação do potencial irritativo das formulações	44
4.2.11 Avaliação da força mucoadesiva dos hidrogéis	45
4.2.12 Estudo de permeação <i>ex vivo</i> em mucosa vaginal bovina	45
4.2.13 Análise estatística	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULA	47
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	48
5.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	50
5.4 AVALIAÇÃO DA MUCOADESÃO <i>IN VITRO</i> DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	51
5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS.....	53
5.6 ESPALHABILIDADE	55
5.7 REOLOGIA.....	56
5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DAS FORMULAÇÕES.....	59
5.9 AVALIAÇÃO DA FORÇA MUCOADESIVA DOS HIDROGÉIS	61
5.10 ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> EM MUCOSA VAGINAL BOVINA.....	62
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A tricomoníase é uma infecção parasitária causada por *Trichomonas vaginalis* e é considerada a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum no mundo, infectando aproximadamente 276,4 milhões de pessoas anualmente (DA SILVA et al., 2019; LIN et al., 2019). Além disso, a prevalência mundial da tricomoníase é muito maior quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia, sífilis e clamídia. Em contrapartida, a patologia não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento, recebendo relativamente pouca ênfase dos programas de saúde pública de controle de ISTs (SCHWEBKE; BARRIENTES, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2012).

Esta doença pode trazer graves consequências para a saúde, como risco aumentado em 50 % para aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MASHA et al., 2019), aumento do risco de câncer cervical (YANG et al., 2018), risco de aquisição do papilomavírus humano (HPV) e vírus do herpes simples (HSV-2) além de complicações reprodutivas (KISSINGER, 2015). Soma-se a isso que o tratamento padrão para tricomoníase humana com base na utilização de metronidazol e tinidazol permanece inalterado desde 1959. Em vista disso, a combinação de altas taxas de infecção, relatos de efeitos adversos, possíveis complicações e tratamentos baseados em apenas uma classe de antimicrobianos, com aumento de sua resistência, torna relevante a busca por novas terapias (KÜNG; FÜRNKRANZ; WALOCHNIK, 2019).

Neste contexto, o Disseleneto de difenila (PhSe)₂ é um composto orgânico de selênio sintético, o qual apresenta uma ampla gama de ações farmacológicas já relatadas na literatura. Estudos confirmam sua atividade antioxidante (BALDISSERA et al., 2020; MÜLLER et al., 2018; QUISPE et al., 2019), antiinflamatória e anti-nociceptiva (NOGUEIRA et al., 2003). Além disso, (PhSe)₂ já demonstrou atividade frente a microorganismos como fungos (CHASSOT et al., 2016; DENARDI et al., 2013), vírus (SARTORI et al., 2016) e protozoários (DOLESKI et al., 2017). Todavia, apesar das potencialidades terapêuticas do (PhSe)₂, sua toxicidade, baixa biodisponibilidade e problemas de solubilidade limitam o progresso de seu emprego terapêutico (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; PRIGOL et al., 2013; PRIGOL et al., 2012).

A utilização de nanotecnologia em sistemas farmacêuticos vem sendo amplamente estudada devido a uma série de benefícios conferidos às formulações. As vantagens em relação

as propriedades físico-químicas dos fármacos estão relacionadas com a formação de estruturas de tamanho inferior a 1 μm (JAIN; THAREJA, 2019; LEYVA-GÓMEZ et al., 2018). As nanocápsulas são um exemplo de nanoestruturas caracterizadas por uma parede polimérica que envolve o núcleo oleoso, o qual permite a incorporação de fármacos lipofílicos, como o $(\text{PhSe})_2$ (DA SILVA et al., 2014; DENG et al., 2020; ENGLERT et al., 2020). No entanto, nanocápsulas são obtidas sob a forma de suspensão aquosa líquida, o que dificulta sua residência sobre a mucosa vaginal. Ao delinear uma estratégia terapêutica para a administração vaginal, a incorporação das suspensões em hidrogéis tem demonstrado ser uma escolha inteligente para o desenvolvimento de terapias inovadoras (BOUCHEMAL, BORIES e LOISEAU, 2017; DE LIMA et al., 2017).

Hidrogéis são obtidos a partir da utilização de polímeros de origem natural ou sintética, também conhecidos como gomas ou hidrocolóides (AHMAD et al., 2019). No entanto, os polímeros de origem natural vem ganhando preferência, visto que estes oferecem propriedades ideais, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de obtenção, além de baixo custo (BHOSALE et al., 2014; VERMA et al., 2019). Dentre eles destaca-se a goma de alfarroba por oferecer propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes, além de apresentar natureza não iônica, não sofrendo influência pelo pH, sais e tratamento térmico (BARAK; MUDGIL, 2014; ZHU et al., 2019).

Formulações convencionais usadas para terapia vaginal local apresentam baixa eficácia devido ao escorrimento que leva a um curto tempo de residência da formulação no local da aplicação, baixa estabilidade do medicamento, além de problemas na liberação e distribuição do fármaco (DOS SANTOS et al., 2020). Em contrapartida, hidrogéis de base nanotecnológica propiciam melhor distribuição, retenção, controle da liberação e conseqüentemente melhor eficácia terapêutica e aceitabilidade do paciente (COOK; BROWN et al., 2018).

Desta forma, considerando: (1) as limitações e resistência relacionadas ao tratamento convencional para tricomoníase; (2) a relevância das propriedades farmacológicas apresentadas pelo $(\text{PhSe})_2$ e os resultados promissores anteriormente obtidos em trabalhos de nosso grupo de pesquisa através da incorporação do mesmo em sistemas nanoestruturados; (3) as características interessantes dos hidrogéis como plataforma para o manejo terapêutico da tricomoníase, este trabalho teve como objetivo a incorporação de suspensões de nanocápsulas de óleo de coco contendo $(\text{PhSe})_2$ em hidrogel de goma de alfarroba para o tratamento da tricomoníase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de suspensões de nanocápsulas de óleo de coco contendo $(\text{PhSe})_2$ frente à atividade anti-*trichomonas vaginalis*, bem como desenvolver hidrogéis a partir do espessamento de uma suspensão de nanocápsulas com a goma de alfarroba, com a finalidade de propor uma forma farmacêutica final para o tratamento da tricomoníase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar suspensões de nanocápsulas de óleo de coco e Eudragit[®] RS100 contendo disseleneto de difenila ($\text{NC}-(\text{PhSe})_2$) e caracterizá-las quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor de ativo e eficiência de encapsulação;
- ✓ Avaliar a atividade anti-*T. Vaginalis* das suspensões de nanocápsulas;
- ✓ Determinar a atividade antioxidante das suspensões de nanocápsulas;
- ✓ Avaliar o potencial mucoadesivo das suspensões de nanocápsulas;
- ✓ Preparar hidrogéis pelo espessamento das suspensões de nanocápsulas com goma de alfarroba;
- ✓ Caracterizar os hidrogéis quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, pH, teor de ativo, espalhabilidade e comportamento reológico;
- ✓ Avaliar o potencial de irritação das formulações desenvolvidas;
- ✓ Determinar o potencial mucoadesivo dos hidrogéis em mucosa vaginal bovina;
- ✓ Estudar a permeação do $(\text{PhSe})_2$ a partir dos hidrogéis em mucosa vaginal bovina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TRICOMONÍASE: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, COMPLICAÇÕES E RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST), não viral, considerada a mais comum do mundo, tendo como agente etiológico o *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado, que reside principalmente no trato geniturinário (VAN GERWEN; MUZNY, 2019). Esta doença é um problema de saúde global generalizado, e muitas vezes negligenciado, ocorrendo em uma taxa crescente (KISSINGER, 2015.)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu último relatório estimou um número de 142,6 milhões de novos casos causados pelo protozoário *T. vaginalis* (DA SILVA et al, 2019). Em 2016, os números estimados chegaram a 156 milhões de casos em todo o mundo, sendo a tricomoníase responsável por quase metade da incidência global de IST naquele ano (VAN GERWEN; MUZNY, 2019).

A prevalência mundial da tricomoníase é muito maior quando comparada a outras ISTs curáveis, como gonorreia e sífilis, ambas com 36,4 milhões, e clamídia, com 100,4 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos. Por outro lado, a tricomoníase não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento, recebendo relativamente pouca ênfase dos programas de saúde pública de controle de ISTs (BHAKTA; MORAN; MERCER, 2020; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Apesar do parasita infectar ambos os sexos, nos homens os sintomas são normalmente leves ou assintomáticos e as infecções são eliminadas pelo sistema imunológico do hospedeiro em semanas. Além disso, a concentração de zinco encontrada nas secreções prostáticas apresenta efeito tóxico ao parasita, impedindo sua adesão às células. Em compensação, 89% dos pacientes portadores da tricomoníase são do sexo feminino, onde as infecções podem perdurar por muito mais tempo, podendo apresentar uma série de sintomas e complicações (SEÑA et al., 2007; LEITSCH, 2016). A tricomoníase apresenta uma ampla variedade de padrões clínicos. O espectro da sintomatologia clínica em mulheres varia do estado de portador assintomático para sintomático e, de acordo com a gravidade da infecção, a tricomoníase pode ser classificada como aguda ou crônica. Esta última é particularmente importante do ponto de vista epidemiológico, pois é neste estágio que os indivíduos são a principal fonte de transmissão do parasita (PETRIN et al, 1998).

Os sintomas clássicos associados ao diagnóstico clínico de tricomoníase incluem, prurido, disúria, dor durante a relação sexual, irritação vulvar, dor abdominal, e corrimento vaginal amarelo-esverdeado com mau cheiro. Este corrimento é consequência da intensa infiltração leucocitária como resultado da morte de células epiteliais que promove inflamação e leva a um aumento do número de leucócitos no fluido vaginal (KISSINGER, 2015; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Ainda, há o risco de o paciente desenvolver vaginite, uretrite, cervicite, vaginose bacteriana, candidíase e endometrite aguda (KISSINGER, 2015; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). Pode ocorrer também a presença de secreção mucopurulenta cervical e outras complicações, como hemorragias microscópicas pontilhadas no colo do útero que conferem uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango, fazendo com que o mesmo pareça eritematoso, edematoso e friável (KHURANA; SINGH, 2018).

Consequências ainda mais graves foram reveladas em estudos que demonstram um risco aumentado em 50% de aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) quando o paciente é portador da tricomoníase (MASHA et al., 2019). Os mecanismos pelos quais a tricomoníase pode aumentar a aquisição do HIV incluem geração de uma resposta inflamatória do epitélio vaginal, exocérvice com recrutamento de linfócitos CD4, macrófagos e micro hemorragias, comprometendo potencialmente a barreira mecânica e alteração da microbiota vaginal normal, tornando-a mais permissiva para vaginose bacteriana que, por sua vez, pode aumentar o risco de aquisição de HIV (QUINLIVAN et al., 2012). Ainda, evidências mostram que a tricomoníase está associada à aquisição do papilomavírus humano (HPV) e vírus herpes simples (HSV-2) (KISSINGER, 2015).

Outro estudo revelou que a infecção por *T. vaginalis* foi significativamente associada ao aumento do risco de câncer cervical (KISSINGER, 2015; YANG et al, 2018), uma vez que a reação inflamatória resultante da infecção causa anomalias celulares (ZHANG; BEGG, 1994). Além disso, podem ocorrer também problemas reprodutivos, como doença inflamatória pélvica, infertilidade, parto prematuro e baixo peso do recém-nascido (KISSINGER, 2015).

Em relação à patogenicidade desta doença, o parasita *T. vaginalis* propicia diversos mecanismos multifatoriais para escapar da resposta imune do hospedeiro e estabelecer a infecção. O sítio urogenital apresenta diversos fatores protetores para impedir a colonização por microrganismos patogênicos visto que *T. vaginalis* necessita de uma intensa capacidade de adaptação para sobreviver à hostilidade do ambiente, como pH ácido, temperatura, presença de microbiota vaginal composta por lactobacilos e alteração hormonal cíclica. Desta forma, o

parasita produz múltiplos fatores de virulência envolvidos na citoaderência, citotoxicidade, fagocitose, hemólise e evasão do sistema imunológico que permitem seu estabelecimento na região e aquisição de nutrientes necessários (FIGUEROA-ANGULO et al., 2012).

A colonização do local da infecção é iniciada quando o parasita desencadeia dano celular no tecido do hospedeiro, secretando uma grande variedade de moléculas, conhecidas como fatores citolíticos. Após a aderência do parasita às células epiteliais vaginais (CEVs), ocorre uma profunda alteração morfológica de piriforme para amebóide, facilitando o contato com as células (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Concomitante ao contato, os parasitas secretam mucinases que solubilizam a mucina rompendo a barreira de muco e promovem a lise e fagocitose das CEVs, ocasionando dano ao epitélio. Em seguida, uma resposta inflamatória com liberação de interleucinas (IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral alfa, macrófagos e neutrófilos é desencadeada, gerando inflamação ao epitélio vaginal e por consequência resposta imune inata ao estabelecimento da infecção (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; MERCER; JOHNSON, 2018).

Para o diagnóstico desta patologia, algumas das amostras clínicas apropriadas incluem urina, fluido vaginal ou esfregaços endocervicais. Como forma de testagem, existem atualmente diversos exames, o quais incluem, isolamento a partir de cultura, testes de amplificação do ácido nucleico, exame de papanicolau, testes de detecção de antígenos, além de exame microscópico direto (KHURANA; SINGH, 2018).

De acordo com a agência americana Food and Drug Administration (FDA, EUA), o tratamento de primeira linha para tricomoníase inclui utilização de medicamentos da classe dos 5-nitroimidazóis, como metronidazol e tinidazol (DA SILVA et al, 2019). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA recomenda tratamento através da administração oral de dose única de 2 g de metronidazol ou 500 mg duas vezes ao dia por 7 dias. No caso deste tratamento falhar, as infecções são tratadas com 2 g de metronidazol ou tinidazol por 7 dias (KÜNG; FÜRNKRANZ; WALOCHNIK, 2019).

O metronidazol tem como mecanismo de ação penetrar no parasita por difusão passiva como pró-fármaco, onde age como acceptor de elétrons formando grupamentos nitro que desestabilizam a estrutura do DNA do parasita, impedindo sua replicação e causando sua morte (LEITSCH, 2017). Alguns dos efeitos adversos que podem ser causados pela administração do metronidazol são náuseas, vômitos, diarreia, desconforto abdominal, hipersensibilidade, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico (DA SILVA et al., 2019). Alguns pacientes podem desenvolver reações de hipersensibilidade do tipo alérgica, apresentando prurido, exantema,

broncoespasmo e febre (VIEIRA; TASCA; EVAN, 2017). Além disso, o uso de comprimidos orais de metronidazol por um longo período pode causar complicações mais graves como leucopenia e neutropenia (BADULESCU et al., 2016).

Atualmente é estimado que aproximadamente 2,5 a 9,6% dos casos de tricomoníase apresentem algum nível de resistência ao tratamento com metronidazol e, levando em consideração a alta prevalência mundial da tricomoníase, esta resistência torna-se um fator preocupante para a saúde pública (ALESSIO; NYIRJESY, 2019; DINGS DAG et al., 2018). Outro fato que chama atenção é que o primeiro caso de falha no tratamento de paciente com tricomoníase fazendo uso de metronidazol ocorreu em 1962, apenas três anos após a introdução do fármaco no mercado (ROBINSON, 1962).

O mecanismo de resistência ao metronidazol ainda não está completamente elucidado, no entanto sugere-se que a resistência clínica está correlacionada à diminuição da toxicidade do metronidazol frente ao parasita. Isto se justifica pela re-oxidação dos ânions de radicais nitro, que por consequência acabam inativando o fármaco, que acaba por voltar à sua estrutura inicial de pró-fármaco, perdendo sua ação (BRADIC et al., 2017).

3.2 DISSELENETO DE DIFENILA: UM COMPOSTO DE ORGANOSSELÊNIO COM PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS PROMISSORAS

3.2.1 Selênio

O Selênio (Se) é um elemento não metálico da família dos calcogênios que foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius (COMASSETO, 2010). Os primeiros relatos sobre este elemento foram sobre sua toxicidade, principalmente da sua forma inorgânica (NOGUEIRA; ROCHA, 2011), porém a pesquisa frente aos compostos orgânicos de Se (COSe) se intensificou durante a década de 1970, quando foram descobertas uma variedade de novas estruturas com propriedades incomuns e promissoras farmacologicamente (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001).

Selênio atua como um oligoelemento essencial ao corpo humano, obtido principalmente através de dieta ou suplemento nutricional, participando de uma ampla gama de processos fisiológicos naturais. Esses processos incluem regulação do hormônio da tireóide, respostas inflamatórias e imunológicas, metabolismo de carboidratos, saúde cardiovascular e reprodutiva,

além da manutenção da função cerebral (TAN et al., 2019). A ingestão diária de Se em baixas doses (55 para adultos) é recomendada pela OMS (NOGUEIRA; BARBOSA; ROCHA, 2021).

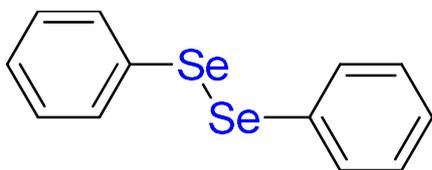
Na espécie humana, o selênio entra na composição de 25 selenoproteínas, as quais desempenham papel importante a nível celular em muitos processos metabólicos (KRYUKOV et al., 2003). Este elemento é conhecido por ser um componente essencial dos sítios ativos de várias enzimas, incluindo a glutathiona peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TrxR), que catalisam reações essenciais para a proteção dos componentes celulares contra danos oxidativos e radicais livres (MAY, 2002).

Estudos clínicos e epidemiológicos afirmam que o selênio tem papel importante em doenças tropicais como a tuberculose, leishmania, filariose e chagas, atuando como agente preventivo ou no diagnóstico e prognóstico. Estes estudos abordam a importância do selênio no estado oxidativo e sua capacidade de defesa antioxidante durante o curso da infecção e progressão de tais doenças em pacientes humanos e modelos experimentais (SANMARTÍN et al., 2011). Além disso, o conceito de que moléculas contendo selênio podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos têm levado ao desenvolvimento de organocalcogênicos sintéticos (SIES; ARTEEL, 2000).

3.2.2 Disseleneto de difenila

Disseleneto de difenila (PhSe_2) (Figura 1), é um COSe da classe dos disselenetos de diorganoila de coloração amarela e odor característico. É de fácil obtenção e é utilizado como reagente eletrofílico intermediário na síntese orgânica (ROSA et al., 2007).

Figura 1- Estrutura química do $(\text{PhSe})_2$



Fonte: Próprio autor

Diversos grupos estudam suas propriedades tanto farmacológicas quanto toxicológicas e resultados mostram que este se comporta como mimético da glutathiona peroxidase em sistemas biológicos, eficientemente com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos, através de

reação similar a catalisada pela GPx (NOGUEIRA; JOÃO, 2010). Adiciona-se a isso que $(\text{PhSe})_2$ demonstrou ser mais ativo como mimético da GPx () e menos tóxico em roedores em comparação ao ebselen, composto precursor dos organocalcogênios sintéticos (MEOTTI et al., 2003, NOGUEIRA et al., 2003; NOGUEIRA; ROCHA, 2011).

Os pesquisadores Nogueira e Rocha, os quais estudam a mais de uma década as propriedades farmacológicas e toxicológicas de compostos de selênio, publicaram um artigo de revisão intitulado “Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule”, onde relatam que $(\text{PhSe})_2$ é conhecido por apresentar uma dupla face, ou seja, existe uma relação dose dependente entre os efeitos tóxicos e farmacológicos, como por exemplo, seus efeitos antioxidantes e pró-oxidantes, o que apresenta impacto em outras atividades relatadas para o composto (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; ROSA et al., 2007).

Diante disso, o $(\text{PhSe})_2$ tornou-se alvo de muitos estudos, a fim de elucidar suas atividades terapêuticas e sua toxicidade. Na tabela 1 encontram-se diversas atividades farmacológicas já relatadas na literatura para o $(\text{PhSe})_2$ em diferentes modelos animais.

Tabela 1- Atividades farmacológicas do $(\text{PhSe})_2$

Atividade farmacológica	Modelo animal	Referências
Ansiolítica	Rato/Peixe-zebra/Frangos com 6 dias de vida	(ROSA et al., 2016; IBRAHIM et al., 2014; PRIGOL et al., 2011)
Antidepressiva	Rato/Camundongo	(QUINES et al., 2016)
Antitumoral	Rato	(FERREIRA et al., 2019b; BARBOSA et al., 2008)
Neuroprotetora	Rato/ <i>C.elegans</i>	(FULCO et al., 2020; BICCA et al., 2020)
Hepatoprotetora	Rato	(HECK et al., 2017; CARVALHO et al., 2013)
Gastroprotetora	Rato	(INEU et al., 2008)
Antihiperglicemiante	Peixe-zebra/Rato	(DOS SANTOS et al., 2020; BARBOSA et al., 2006)

Dentre as diversas atividades farmacológicas elencadas para esse composto, é de grande importância e relevância para este trabalho, destacar alguns estudos. Nogueira e colaboradores (2003) relataram pela primeira vez as potenciais atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do (PhSe)₂ em modelos térmicos e químicos de nocicepção em camundongos.

A atividade anti-inflamatória pode ser atribuída à inibição da síntese de eicosanóides como leucotrienos e prostaglandinas, bloqueando a síntese de mediadores da inflamação. Além disso, (PhSe)₂ produziu antinocicepção de longa duração, onde a redução da sensibilidade à dor pode estar relacionada à inibição da cascata da ciclooxigenase (NOGUEIRA et al., 2003b).

Petronilho e colaboradores (2016) demonstraram atividade anti-inflamatória e antioxidante do (PhSe)₂ em modelo animal apresentando colite ulcerosa. A lesão na mucosa do cólon, com presença de células inflamatórias propicia a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e neste caso, (PhSe)₂ exerceu um efeito protetor como antioxidante, atuando como mimético à GPx (PETRONILHO et al., 2016). Além disso, outros trabalhos demonstraram que (PhSe)₂ apresenta atividade antioxidante em alguns modelos experimentais para avaliação do estresse oxidativo (QUISPE et al., 2019; BALDISSERA et al., 2020; MÜLLER et al., 2018).

Loreto e colaboradores (2011) demonstraram pela primeira vez a atividade antifúngica *in vitro* de (PhSe)₂ frente aos fungos *Candida spp*, *Aspergillus spp* e *Fusarium spp*. Concluiu-se que a atividade antifúngica envolve a interação de (PhSe)₂ com grupos sulfidríla de biomoléculas presentes em fungos. Além disso, pode reduzir a principal defesa celular não enzimática antioxidante da levedura, sensibilizando a célula aos efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (LORETO et al, 2011). Outros estudos demonstraram a atividade antifúngica do (PhSe)₂ *in vitro* frente a espécies de *Candida*, fungo geralmente encontrado na mucosa vaginal, trazendo este composto como uma alternativa à resistência ao tratamento convencional (CHASSOT et al., 2016; DENARDI et al., 2013).

Na literatura também já são relatadas atividades do (PhSe)₂ frente a vírus e protozoários. Sartori e colaboradores (2016) investigaram as atividades antivirais de (PhSe)₂ contra a infecção por vírus da herpes simples (HSV-2) *in vitro* e *in vivo*, em um modelo de infecção vaginal em camundongos. A ação antiviral foi relacionada à sua imunomodulação, atividade antioxidante e propriedades antiinflamatórias, onde demonstrou uma lenta progressão das lesões, com uma notável reepitelização e redução da infiltração leucocitária, além de redução dos marcadores de dano oxidativo (SARTORI et al., 2016). Já Doleski e colaboradores (2017) demonstraram o efeito do (PhSe)₂ em camundongos infectados pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, onde o

tratamento foi capaz de reverter a inflamação hepática através do aumento da concentração de nucleotídeos, como ATP, e modulação de forma compensatória da atividade enzimática, como também interação covalente com as enzimas em questão, produzindo um efeito anti-inflamatório por meio da via de sinalização purinérgica (DOLESKI et al., 2017).

Apesar das potencialidades terapêuticas do $(\text{PhSe})_2$, sua toxicidade e problemas de solubilidade limitam o progresso dos estudos para a etapa clínica. Acredita-se que a toxicidade do $(\text{PhSe})_2$ esteja relacionada ao processo de oxidação de grupos tióis endógenos de importância biológica, provenientes principalmente da glutatona reduzida (GSH), proteínas ou de sítio ativo de diferentes enzimas endógenas sulfidrílicas, incluindo a 5-lipoxigenase, δ ALA-D, esqualeno monooxigenase e Na^+ , K^+ -ATPase (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; ROSA et al., 2007).

Prigol e colaboradores (2013) publicaram um estudo mostrando o perfil bioquímico e físico-químico do $(\text{PhSe})_2$. Este trabalho mostrou que a molécula é estável quimicamente frente aos meios gástrico e intestinal simulados, e biologicamente frente ao plasma humano e à albumina sérica bovina, não havendo produtos de degradação na análise. Entretanto, estudos de solubilidade e coeficiente de distribuição (Log D) mostraram que o $(\text{PhSe})_2$ tem uma alta lipofilia e Log D maiores de 3,0, indicando baixa solubilidade em água, dificultando a dissolução nos fluidos do trato gastrointestinal, conseqüentemente podendo levar a uma baixa biodisponibilidade oral (PRIGOL et al., 2013; PRIGOL et al., 2012).

3.4 NANOTECNOLOGIA VOLTADA PARA APLICAÇÃO VAGINAL

A via vaginal há muito tempo tem sido utilizada como rota de liberação de fármacos, visto que oferece muitas vantagens sobre a administração oral convencional. Tais vantagens são devido à grande superfície de contato, elevado suprimento sanguíneo e boa permeabilidade para muitos fármacos. É possível também evitar o metabolismo de primeira passagem e absorção a partir do trato gastrointestinal, através de um efeito local, com conseqüente redução da incidência e severidade de efeitos adversos. Não menos importante, a via vaginal oferece a possibilidade de utilização de dosagem prolongada, com baixas doses diárias e liberação contínua de medicamentos (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018).

Atualmente, os produtos vaginais são comercializados na forma de cremes, géis, comprimidos, cápsulas, óvulos, espumas, soluções, etc. Porém, estas formas farmacêuticas convencionais exibem baixa biodistribuição, eficácia limitada, efeitos indesejáveis, degradação química, depuração e falta de seletividade. Além disso, as formulações convencionais estão

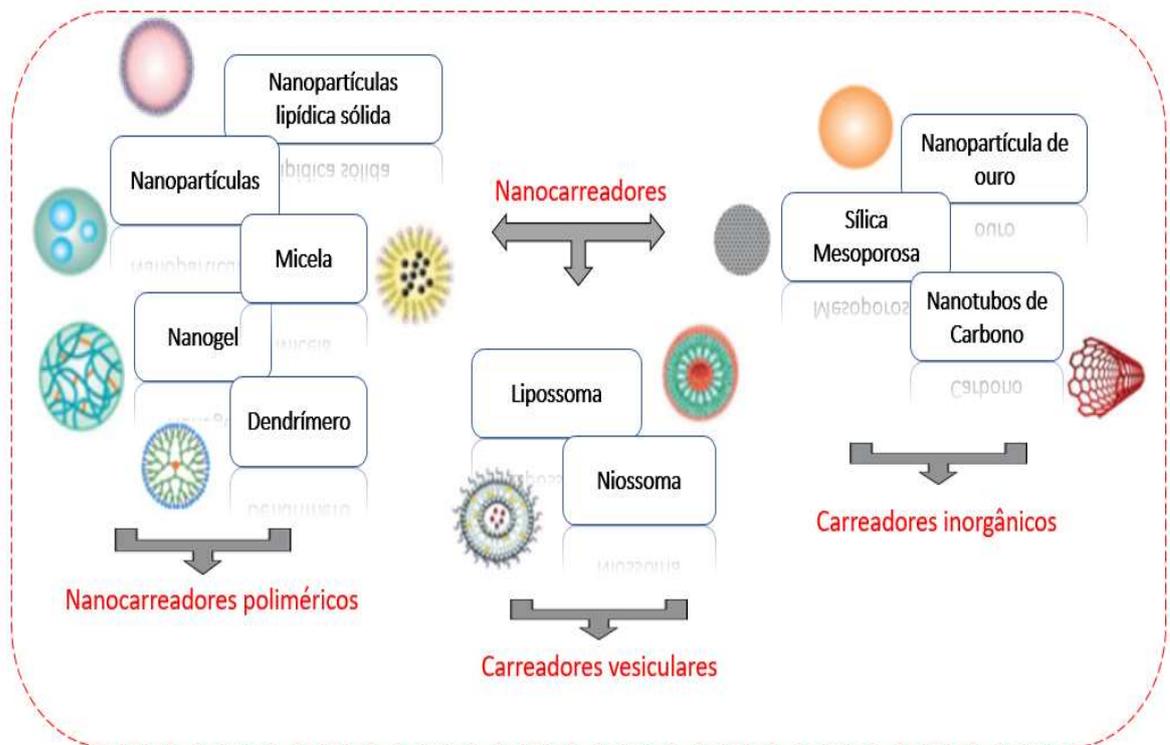
associadas à má distribuição e retenção, principalmente devido à ação de autolimpeza da vagina, sua posição anatômica, além de sua baixa capacidade para modular o destino dos compostos ativos, uma vez que são liberados no muco cervicovaginal (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, 2015).

Diante disso, formulações contendo fármacos para serem aplicados nesta via devem ser capazes de contornar todas essas dificuldades, somando-se à necessidade de uma baixa propensão para causar irritação genital e toxicidade sistêmica (VANIĆ; ŠKALKO-BASNET, 2013).

A nanotecnologia farmacêutica é um ramo multidisciplinar que atualmente vive um crescimento exponencial, sendo considerada uma das tecnologias-chave do século 21, apresentando importantes implicações no desenvolvimento de produtos farmacêuticos para diversas doenças (KRUKEMEYER et al., 2015). Sistemas nanoestruturados proporcionam importantes vantagens em comparação a sistemas convencionais e suas limitações, como capacidade que estes podem apresentar de veicular moléculas hidro e lipofílicas, além de conferir proteção físico-química, modulação da liberação, melhora da solubilidade aparente do fármaco, bem como diminuição da toxicidade. Em geral, essas características aprimoradas são explicadas por seus minúsculos tamanho de partícula ($\leq 1 \mu\text{m}$) e comportamento molecular (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; JAIN; THAREJA, 2019).

Alguns dos principais sistemas nanométricos (Figura 2) aplicados na terapêutica contemplam os lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, dentre outros. No entanto, o uso de nanopartículas poliméricas para desenvolver sistemas de entrega vaginal tem recebido considerável atenção, pois estas podem ser usadas para superar vários problemas e desafios que a via vaginal apresenta (ENSIGN; CONE; HANES, 2014).

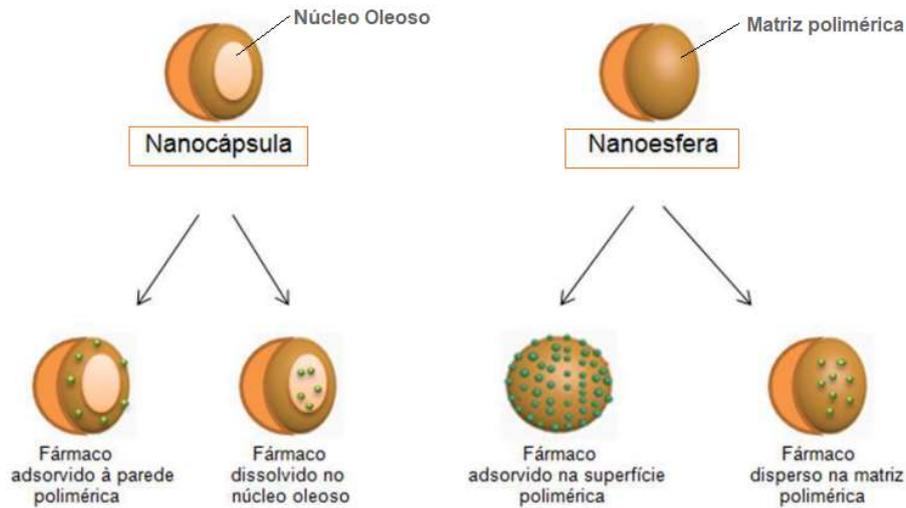
Figura 2- Diagrama esquemático dos diversos tipos de nanocarreadores usados para entrega de ativos.



Fonte: Adaptado de JAIN; THAREJA, 2019

Nanopartículas poliméricas englobam nanocápsulas e nanoesferas que diferem entre si pela composição quali e quantitativa das formulações e organização estrutural (Figura 3). As nanocápsulas são sistemas vesiculares submicrométricos, de tamanho médio entre 100-500 nm, compostos por um núcleo, geralmente oleoso, circundado por uma parede polimérica, nos quais o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido no material polimérico. Já as nanoesferas são sistemas matriciais onde o fármaco pode estar disperso e/ou adsorvido à parede polimérica (DA SILVA et al., 2014; DENG et al., 2020; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco



Fonte: Próprio Autor

O uso de nanopartículas poliméricas para desenvolver sistemas de entrega vaginal recebe considerável atenção, porque tais nanopartículas podem ser usadas para superar vários problemas responsáveis pelo baixo tempo de residência do ativo (DA SILVA et al., 2014).

De modo especial, nos últimos anos, as nanocápsulas poliméricas têm atraído mais interesse de aplicação na entrega de fármacos, beneficiando-se de sua nanoestrutura núcleo-casca. Estes sistemas por apresentarem núcleo oleoso, sobressaem-se por terem maior capacidade de incorporação de ativos lipofílicos, por aumentarem a estabilidade do ativo devido à proteção contra degradação química ou pela luz, pelo aumento da interação com tecidos e células, e direcionamento de fármacos para estes. Também favorecem a liberação prolongada do ativo, evitando o contato direto do fármaco com o tecido, conseqüentemente, diminuindo os efeitos adversos locais, e aumentando com isso a eficácia do tratamento (DENG et al., 2020; FRANK et al., 2015).

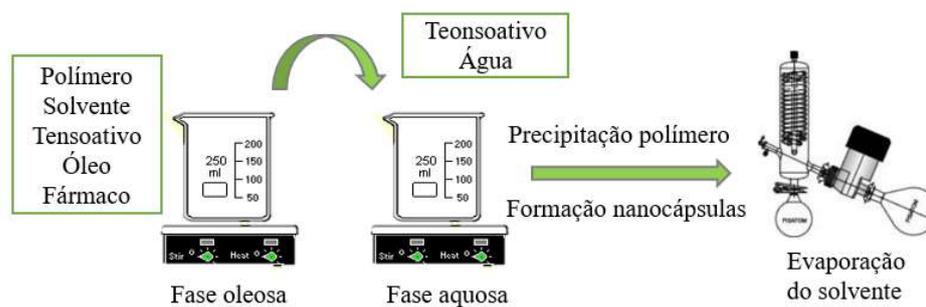
Outra vantagem é que esses nanossistemas poliméricos podem ser usados em diferentes formas farmacêuticas, como suspensões, hidrogéis ou pós, facilitando sua administração devido à flexibilidade de aplicação, além de manterem suas propriedades e nanoestruturas originais (FRANK et al., 2015; POHLMANN et al., 2013).

As propriedades físico-químicas e biológicas das nanocápsulas poliméricas são dependentes do método de preparação e das matérias-primas usadas para produzi-los. Um dos

métodos mais usuais para a preparação de nanocápsulas, explorado neste trabalho, é a deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 4), proposto por Fessi e colaboradores em 1988. Este método compreende uma fase orgânica composta por um fármaco a ser encapsulado, o tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilico-lipofílico), o óleo e o polímero, solubilizado em solvente miscível em água. Já a fase aquosa é composta por tensoativo hidrofílico de alto EHL e água (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Quando o solvente orgânico difunde na água inicia-se o processo de precipitação do polímero hidrofóbico, formando a estrutura casca-núcleo das nanocápsulas. Esse processo tem seu término após a evaporação total do solvente orgânico, permanecendo apenas uma suspensão coloidal (FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; MORA-HUERTAS et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 4- Método de Deposição interfacial do polímero pré-formado para formação de nanocápsulas poliméricas

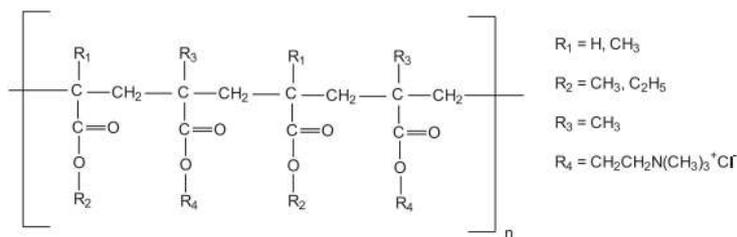


Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003

Esta metodologia traz algumas vantagens como fácil execução, eficiência e reprodutibilidade, obtenção de partículas com menor diâmetro, baixa polidispersão e a ausência de monômeros residuais apresentando também melhores resultados na encapsulação (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES et al., 2007). As características das nanocápsulas podem ser influenciadas principalmente pela concentração de polímero, método de injeção de fase orgânica, relação de volume entre a fase orgânica e a fase aquosa e também a natureza dos materiais (DENG et al., 2020). Além disso, cabe ressaltar que para a formulação de sistemas de entrega vaginal a interação entre nanopartículas e a mucosa como também sua penetração no epitélio pode ser influenciada diretamente pelo tamanho e área superficial das partículas. Esses fatores também afetam a retenção na mucosa e transporte das partículas (DA SILVA et al., 2014).

Em vista disso, as propriedades dos polímeros exercem influência significativa na estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e biodistribuição das nanocápsulas como sistema de liberação de fármacos (DENG et al., 2020). Materiais poliméricos biocompatíveis têm sido amplamente considerados como candidatos adequados para desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas. Dentre eles, destaca-se o Eudragit® RS100 (Figura 5), um copolímero contendo unidades de metacrilato de alquilamônio sintético. Polímeros sintéticos biocompatíveis têm sido empregados como carreadores de fármacos para diferentes condições vaginais, visto que geralmente oferecem maior controle nas propriedades físico-químicas, além de apresentarem qualidade e pureza reprodutíveis (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017; LEYVA-GÓMEZ et al., 2018).

Figura 5- Estrutura química do Eudragit® RS100



Fonte: DOMINGUES et al., 2008

Este polímero é solúvel em solventes orgânicos, o que facilita sua incorporação na maioria dos métodos tradicionais para obtenção de sistemas transportadores nanoparticulados, além de ser um material bastante empregado para obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada devido a sua insolubilidade nos meios fisiológicos, independente do pH (DA SILVA JÚNIOR et al., 2017; NIKAM et al., 2011).

Além disso, Eudragit® RS100 por ser um polímero de caráter catiônico, possui capacidade mucoadesiva por interagir com superfícies biológicas carregadas negativamente, como é o caso da mucosa vaginal. Desta forma, se consegue promover o aumento do tempo de residência de partículas quando interagirem com a mucina (DILLEN et al., 2006; NIKAM et al., 2011). Chaves e colaboradores (2018) demonstraram que nanocápsulas de Eudragit® RS100 apresentaram maior adesividade quando em comparação ao Eudragit S100 ou nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) (PCL). O Eudragit® RS 100, por ser catiônico, pode levar a obtenção de nanocápsulas bioadesivas, através de interações eletrostáticas entre o polímero com carga positiva e a mucosa, com carga negativa (CHAVES et al., 2018).

Quando falamos em nanocápsulas de núcleo oleoso, outro constituinte importante é o óleo, que pode ser de origem sintética como os triglicerídeos de cadeia média (TCM) (SANTOS et al., 2013), ou natural como o óleo de semente de uva, óleo de amêndoas doces (ALMEIDA et al., 2009), óleo de romã (MARCHIORI et al., 2017), óleo de rosa mosqueta (GEHRCKE et al., 2017), óleo de arroz (RIGO et al., 2015), entre outros. Os óleos de origem vegetal têm atraído o interesse por possuírem propriedades terapêuticas que podem vir a potencializar o desempenho das formulações, e dentre eles destaca-se o óleo de coco por seu alto valor nutricional e farmacêutico (YONG et al., 2009). O óleo de coco virgem é extraído de *Cocos nucifera* Linné (Palmae) e tradicionalmente usado na indústria farmacêutica como um emoliente em bases de pomadas, xampus, sabonetes e sabonetes líquidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Apresenta propriedades farmacológicas interessantes como atividades antifúngica (OGBOLU et al., 2007) e antioxidante (MARINA et al., 2009) já descritas para seus principais componentes, ácidos láurico e mirístico (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

Nosso grupo de pesquisa já vem desenvolvendo formulações nanotecnológicas para tratamento de afecções vulvovaginas. Santos e colaboradores avaliaram a viabilidade de formular nanocápsulas catiônicas usando Eudragit® RS100, TCM ou óleo de coco como polímero e núcleo oleoso, respectivamente. As formulações combinaram características físico-químicas adequadas, estabilidade com fotoestabilidade melhorada e liberação prolongada do fármaco, além de serem capazes de manter a atividade do clotrimazol contra espécies de *Candida* (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014).

Também, suspensões de nanocápsulas poliméricas de Eudragit® RS 100 contendo a associação de clotrimazol e (PhSe)₂, utilizando TCM ou óleo de coco (OC) para compor o núcleo oleoso desses nanocarreadores, foram estudadas como tratamento alternativo frente a candidíase (ENGLERT et al., 2020). Foi investigado se a co-encapsulação dos ativos proporcionaria qualquer impacto positivo na ação antioxidante, onde foi observado que nanocápsulas compostas por OC exibiram ação sequestrante superior em comparação às formulações contendo óleo de TCM, apontando a ação antioxidante já descrita para o OC. Além disso, todas as suspensões de nanocápsulas foram mais eficazes do que as formas livres. O ensaio antifúngico *in vitro* revelou aumento nos valores de concentração inibitória mínima (CIM), o que foi atribuído a uma limitação experimental tendo em vista a liberação lenta dos ativos. No entanto, a formulação ainda tinha níveis de atividade aceitáveis (ENGLERT et al., 2020).

Em relação às afecções vaginais, até agora, na literatura, os únicos sistemas de base nanotecnológica desenvolvidos como alternativa para o tratamento da tricomoníase, foco deste trabalho, foram nanopartículas de poli(cianoacrilato de isobutila) revestidas com quitosana e quitosana tiolada, sem ativo (PRADINES et al., 2015), nanopartículas lipofílicas de bismuto (RODRÍGUEZ-LUIS et al., 2017), além de nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos específicos para diagnóstico de tricomoníase e candidíase (HASHEMI et al., 2019).

Neste âmbito, além dos estudos citados acima, nosso grupo de pesquisa vem estudando alternativas para o tratamento da tricomoníase e desenvolveu nanocápsulas de Eudragit® RS100 e óleo de rosa mosqueta contendo indol-3-carbinol (I3C) e avaliou a atividade anti-*t. vaginalis*. O I3C nanoencapsulado foi capaz de reduzir a viabilidade dos trofozoítos em todas as concentrações testadas, tornando a formulação promissora como tratamento alternativo para esta patologia (OSMARI et al, 2020).

Em relação ao nosso composto de estudo (PhSe)₂, já foram encontrados na literatura estudos sobre nanoestruturas como forma de carreamento para o mesmo. Giordane e colaboradores (2014) desenvolveram nanocápsulas de PCL e óleo de canola para a incorporação de (PhSe)₂. Verificou-se a partir dos testes biológicos, de distribuição de selênio em diferentes tecidos de camundongos que houve o aumento significativo da biodisponibilidade para as nanocápsulas de (PhSe)₂, quando comparadas ao (PhSe)₂ livre. Na sequência, Stefanello e colaboradores (2015) demonstraram que após a administração intraperitoneal em camundongos, estas mesmas formulações não foram tóxicas. Além disso, as nanocápsulas contendo (PhSe)₂ mostraram atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *ex vivo* através da redução significativa na produção de ROS e peroxidação lipídica (STEFANELLO et al., 2015).

Também foram desenvolvidas nanopartículas de poliácido láctico (PLA) para encapsulação de (PhSe)₂, o qual apresentou características físico-químicas adequadas, melhorando a estabilidade do ativo, retardando sua degradação e prolongando sua liberação (JUNIOR et al, 2017).

Nosso grupo de pesquisa também vem explorando as potencialidades terapêuticas do (PhSe)₂ aliando seu uso a sistemas nanocarreadores. Nanocápsulas poliméricas contendo (PhSe)₂ empregando PCL como polímero e TCM como núcleo oleoso foram desenvolvidos com sucesso. Investigou-se o potencial citotóxico contra linhagens celulares de melanoma humano (A375) e a toxicidade da formulação em queratinócitos e células sanguíneas humanas. A formulação teve um potencial efeito citotóxico contra células de melanoma sem causar toxicidade às células saudáveis, tornando-se uma alternativa promissora para o tratamento de

melanoma devido a sua maior estabilidade química e falta de toxicidade em comparação ao composto livre (FERREIRA et al, 2018).

Na sequência, foi avaliado se a exposição aguda do peixe zebra frente a mesma suspensão de nanocápsulas causaria toxicidade. Não houve nenhuma alteração comportamental e locomotora exploratória, nem a modificação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em amostras cerebrais (FERREIRA et al, 2019a).

Também avaliou-se a capacidade antitumoral *in vitro*, utilizando células de glioma e *in vivo*, em modelo pré-clínico de glioblastoma. A nanoencapsulação do (PhSe)₂ melhorou seu efeito citotóxico contra células de glioma e atenuou o desenvolvimento do tumor cerebral, sem alteração nos marcadores renais e hepáticos, nem parâmetros de equilíbrio oxidativo no cérebro, fígado e rins (FERREIRA et al, 2019b).

Por fim, com o objetivo de maximizar o potencial terapêutico de (PhSe)₂ desenvolveu-se uma formulação de nanocápsulas de PCL contendo (PhSe)₂, peguiladas fisicamente, revestida com polietilenoglicol (PEG), destinada à administração intravenosa do (PhSe)₂ como uma nova abordagem para terapia de glioma. A formulação não desencadeou qualquer efeito hemolítico, sugerindo grande compatibilidade com a via intravenosa, além de exibir efeito seletivo antiglioma, sem causar toxicidade aos astrócitos (FERREIRA et al., 2020).

3.5 HIDROGÉIS DE BASE NANOTECNOLÓGICA COMO FORMA FARMACÊUTICA FINAL PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL

Para projetar um sistema de entrega ideal para via vaginal, é importante compreender totalmente os desafios deste sítio único, a fim de melhorar a distribuição, retenção, eficiência farmacêutica e aceitabilidade do paciente às formulações finais (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018).

Apesar de suas vantagens, as nanocápsulas são obtidas como uma suspensão líquida, o que complica sua aplicação vaginal, necessitando transformar essa suspensão em uma forma farmacêutica adequada para a via de administração de interesse (PITORRE et al., 2017). Além disso, aspectos como retenção, bioadesão e conveniência não são totalmente satisfatórios desta maneira. Logo, a combinação de tecnologias farmacêuticas pode ser uma escolha inteligente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras (BOUCHEMAL, BORIES e LOISEAU, 2017).

Os hidrogéis são redes de polímeros hidrofílicos que podem absorver uma quantidade significativa de água em relação ao seu peso seco, sem se dissolverem. São tipicamente obtidos pela copolimerização de monômeros ou polímeros hidrofílicos com co-monômeros polifuncionais promovendo a reticulação dos mesmos. Esta reticulação pode promover a captação de fluidos, o que favorece frequentemente a atividade farmacológica do ativo que contiver e aumentar sua interação com o local de entrega (DA SILVA et al, 2014).

A combinação tecnológica de diversos tipos de nanocarreadores e hidrogéis fornece uma plataforma interessante, com uma variedade de aplicações, demonstrando resultados promissores já relatados na terapia de câncer, tratamento de doenças infecciosas, cutâneas ou inflamatórias, anestesia /analgesia e aplicação ocular (PITORRE et al., 2017).

Os sistemas mais convencionais de administração de medicamentos vaginais são os hidrogéis. Estes são fáceis de fabricar e podem se espalhar sobre a superfície do muco. As propriedades reológicas do gel e seu teor de água oferecem vantagens de hidratação e lubrificação, essenciais em algumas situações patológicas, na qual a mucosa vaginal pode estar ressecada. Além disso, a adição de polímero mucoadesivo na formulação em gel pode melhorar o tempo de contato impedindo assim o vazamento ou perda de ativos prolongando seu efeito (DAS NEVES e BAHIA, 2006).

Também é válido destacar que a principal vantagem desta via de administração é que doenças vaginais podem ser tratadas localmente, fornecendo uma alta concentração de fármaco no local, potencialmente limitando quaisquer efeitos adversos sistêmicos (COOK; BROWN et al., 2018).

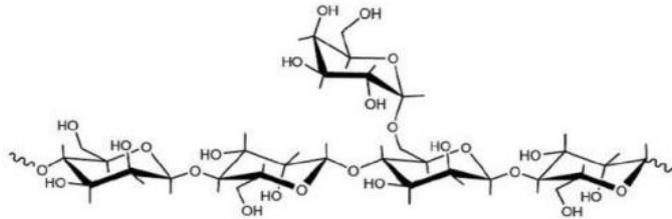
Hidrogéis são obtidos a partir da utilização de polímeros de origem natural ou sintética, também conhecidos como gomas ou hidrocolóides (AHMAD et al., 2019). No entanto, os polímeros de origem natural vem ganhando preferência visto que estes oferecem propriedades ideais, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de disponibilidade, baixo custo e capacidade de modificação química (BHOSALE et al., 2014; VERMA et al., 2019).

No que se refere ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, as gomas naturais vêm sendo utilizadas para produção de géis, filmes e dispositivos de liberação controlada, onde estes polímeros podem ser utilizados de forma isolada, em associação com outras gomas (AKKAYA et al., 2020; JANA et al, 2015; LAHA et al., 2019; MAITI et al. 2010).

Dentre esses polissacarídeos, destaca-se a goma de alfarroba (Figura 6), uma galactomanana, obtida a partir do endosperma da semente da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua L.*). Esta goma vegetal está em ascensão na área farmacêutica devido a seus efeitos benéficos à

saúde e por possuir propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes. Além disso, por ser de natureza não iônica, esta goma não sofre influência pelo pH, sais e tratamento térmico (BARAK; MUDGIL, 2014), mostrando-se biocompatível, bioabsorvível e biodegradável por natureza (ZHU et al., 2019).

Figura 6- Estrutura química da goma de alfarroba.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-Locust-bean-gum_fig4_236201251

Na área farmacêutica essa goma é utilizada na preparação de vários sistemas de entrega, como comprimidos (PRASANTHI; MANIKIRAN; RAO, 2010), invólucros para cápsulas duras (HE et al., 2017), microesferas (JANA et al., 2015), nanopartículas (JANA; SAN, 2017), matrizes mesoporosas (CORDEIRO et al., 2020), sistemas inaláveis e injetáveis, bem como líquidos viscosos, filmes (KAUR et al., 2019) e na formulação de hidrogéis (COVIELLO et al., 2015). As formulações à base desta goma podem apresentar comportamento de liberação sustentada além de transmitir mucoadesividade a algumas formulações (BARAK; MUDGIL, 2014; COVIELLO et al., 2007; VERMA et al., 2019).

Neste âmbito, em nosso grupo de pesquisa, hidrogéis contendo nanocápsulas foram obtidos pelo espessamento da suspensão com goma de alfarroba e se mostraram formulações promissoras para a aplicação cutânea dos ativos I3C e 3,3'-diindolmetano (GIULIANI, 2019). Embora a goma de alfarroba venha se destacando no âmbito farmacêutico, convém salientar que, até o momento, a maior parte dos estudos utilizou a mesma em associação com outras gomas (COVIELLO et al., 2015; HE et al., 2017; LAHA et al., 2019; PETINELLI et al., 2020), não havendo estudos que relatem o seu uso isolado para a obtenção de hidrogéis de aplicação vaginal.

Alguns estudos elencados na tabela 2 tem demonstrado que o uso de hidrogéis nanotecnológicos desempenha um papel fundamental e muito vantajoso na melhora da eficácia terapêutica por via vaginal. Todavia, a porcentagem de estudos sobre hidrogéis pretendidos ao

tratamento de infecções vaginais mostra a candidíase vulvovaginal como a desordem mais estudada, representando 56%, seguido por vaginose bacteriana (28%) e tricomoníase (16%) (DOS SANTOS et al., 2020).

Tabela 2- Aplicações de hidrogéis de base nanotecnológica destinado ao tratamento de afecções vaginais

Afecção vaginal	Nanossistema	Vantagens	Referências
Candidíase Vulvovaginal	Lipossomas catiônicos contendo AmB dispersos em hidrogel termorresponsivo de Poloxâmero	A dispersão dos lipossomas promoveu aumento na taxa de liberação	(KANG et al., 2010)
	Nanoestruturas lipídicas contendo fluconazol incorporadas em hidrogel de Carbopol 974P	Hidrogel desenvolvido apresentou maior capacidade mucoadesiva em relação ao comercial, bem como maior atividade	(TAKALLAR; DESAI, 2018)
	Complexo de ciclodextrina contendo AmB disperso em hidrogel Pluronic [®] termorresponsivo	Os complexos de ciclodextrina dispersos em hidrogel mostraram potencial para aplicação vaginal, destacando sua alta tolerabilidade <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	(KIM et al., 2010)
	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo itraconazol dispersas em hidrogel termorresponsivo de Carbopol 934 e Poloxamer P407	Sistema apresentou baixa citotoxicidade <i>in vitro</i> e alta tolerabilidade <i>in vivo</i> , bem como a otimização da atividade do itraconazol	(MIRZA et al., 2016)

Vaginose Bacteriana	Hidrogel de Hidroxipropilmetilcelulose e goma gelana contendo clindamicina	Hidrogel apresentou alta capacidade antimicrobiana bioadesiva e contra <i>Staphylococcus aureus</i>	(PATEL; PATEL, 2015)
	Hidrogéis degradáveis à base de nanocarreador de poli(etilenoglicol) (PEG) contendo ácido láctico	Hidrogéis degradáveis à base de nanocarreador prolongaram a liberação do medicamento	(RAJAN et al., 2014)
AmB: anfotericina B			

Seguindo a linha de desenvolvimento de hidrogéis para entrega vaginal, em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa, De Lima e colaboradores (2017) desenvolveram hidrogéis contendo nanocápsulas de Eudragit® RS 100 e núcleo de TCM e clotrimazol, através da associação inovadora de dois polímeros mucoadesivos Pemulen® TR1 e Pullulan. O estudo mostrou, com sucesso, a conversão tecnológica de uma suspensão de nanocápsula em uma formulação semissólida, com propriedades mucoadesivas ideais, efeito local, além de pH compatível com aplicação vaginal, tornando-se uma alternativa ao tratamento da candidíase (DE LIMA et al., 2017).

Como relatado anteriormente, na literatura são observados poucos estudos de desenvolvimento de hidrogéis de base nanotecnológica para tratamento da tricomoníase, em comparação com outras afecções vaginas. Em nosso grupo de pesquisa, Osmari e colaboradores (2020) formularam um hidrogel de goma gelana contendo nanocápsulas mucoadesivas de Eudragit® RS100 e óleo de rosa mosqueta contendo I3C. A formulação demonstrou ser segura e não irritativa, com excelentes propriedades mucoadesivas, sendo considerada uma alternativa promissora para tratar infecções do trato vaginal, causadas pelo parasita *Trichomonas vaginalis* (OSMARI et al., 2020)

Malli e colaboradores (2016) projetaram um hidrogel termossensível e mucoadesivo contendo Pluronic F127, quitosana e metronidazol, promovendo uma liberação controlada do medicamento para tratamento da tricomoníase, prolongando sua ação, com diminuição de efeitos adversos que o metronidazol oferecia. Visto que a motilidade de *Trichomonas vaginalis* nos fluidos biológicos desempenha um papel proeminente na infectividade do parasita, em estudo subsequente, com a mesma formulação, porém livre de metronidazol, verificou-se que houve o bloqueio da motilidade do parasita, podendo impedir a sua fixação à mucosa, reduzindo assim a aquisição da infecção, através da formação de uma barreira física pelo hidrogel (MALLI; LOISEAU; BOUCHEMAL, 2019)

Nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo auranofina, foram incorporadas em hidrogel termorresponsivo de quitosana para administração intravaginal no tratamento da tricomoníase. A formulação mostrou uma liberação sustentada do fármaco, aumentando o efeito antiparasitário com diminuição de efeitos adversos (ZHANG et al., 2019)

Por fim, nanopartículas de poli(cianoacrilato de isobutila) revestidas com quitosana e quitosana tiolada sem fármaco, dispersa em hidrogel Pluronic F127 mostraram-se ativas contra *T. Vaginalis* não apresentando qualquer toxicidade *ex vivo* em mucosa vaginal de suínos (PRADINES et al., 2015).

No que diz respeito ao ativo deste estudo (PhSe)₂, há relatos somente de dois trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa. No primeiro foi desenvolvido um hidrogel de base nanotecnológica, empregando goma xantana, o qual demonstrou características promissoras para aplicação no tratamento de melanomas cutâneos (FERREIRA et al, 2019c). Posteriormente, foi desenvolvido um hidrogel de goma gelana contendo nanocápsulas de poli (ε-caprolactona) carregada com (PhSe)₂, o qual demonstrou eficácia *in vivo* em um modelo animal de candidíase vulvovaginal (ZIMMERMANN e at., 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias Primas

- Disseleneto de Difenila: Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, LASRAFTO.
- Óleo de coco: Thera Herb (Niterói, Brasil)
- Eudragit[®] RS100: Röhm Pharma, Alemanha
- Monooleato de sorbitano (Span[®] 80): Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América;
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80): Delaware, Brasil
- Goma de Alfarroba: Cp-Kelco, Brasil;

4.1.2 Solventes

- Acetona P. A.: Dinâmica, Brasil;
- Metanol grau HPLC: Dinâmica, Brasil;
- Etanol: Dinâmica, Brasil;
- Dimetilsulfóxido: Vetec, Brasil.

4.1.3 Equipamentos e outro materiais

- Agitador magnético: Tecnal, Brasil;
- Balança analítica: Shimadzu, Japão;
- Células de difusão vertical de Franz: Vidrotec, Brasil;
- Centrífuga: Solab, Brasil;
- Coluna: - Coluna Inertsil[®] ODS-3 C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), Brasil;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: Shimadzu, Japão;
- Evaporador rotatório Buchi R-3: Buchi, Brasil;

- Filtro centrífugo de 10.000 MW: Amicon[®] Ultra, Millipore;
- Impressora multifuncional: Scanner HP Officejet 4500 Desktop, Brasil;
- Potenciômetro - mPA-210p - MS Tecnocon, Brasil;
- Pré-coluna SecurityGuard C₁₈ 4 x 3,0 mm, Brasil;
- Micrômetro digital: Digimess, Brasil;
- Ultrassom: Altsonic Clean, Brasil;
- Viscosímetro rotacional: Brookfield[®] modelo DV-I prime, Brasil;
- Vórtex - modelo AP-56: Phoenix Luferto, Brasil;
- Zetasizer Nanoseries (espectroscopia de correlação de fótons): Malvern Instruments, Reino Unido.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas em triplicata pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al, 1988), no qual uma fase orgânica contendo acetona (27 mL), Eudragit[®] RS100 (0,1 g), Span 80[®] (0,077 g) e óleo de coco virgem (0,3 g) foi mantida sob agitação magnética por cerca de 10 min a 40 °C. Em seguida, o (PhSe)₂ (0,01 g) foi adicionado a esta fase orgânica, que permaneceu por mais 10 min em agitação. Após completa solubilização dos componentes, esta fase foi vertida através de um funil em 53 mL de uma dispersão aquosa (fase aquosa) de Tween 80[®] (0,077 g). Após 10 min sob agitação magnética, a suspensão foi concentrada por evaporação sob pressão reduzida (rotaevaporador) para ajuste do volume final (10 mL) e eliminação do solvente orgânico, correspondendo a concentração final de (PhSe)₂ de 1 mg/mL, a qual foi denominada de NC-(PhSe)₂. Para fins comparativos, foram preparadas formulações sem (PhSe)₂ (nanocápsulas brancas) denominadas de NC-B.

4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Após a preparação das suspensões, estas foram caracterizadas quanto ao aspecto, cor, tamanho de partícula e índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de ativo. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata. O tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons a 25 °C (ZetaSizer, Malvern), após diluição das amostras em água ultrapura (500x). O pH das formulações foi avaliado através de potenciômetro previamente calibrado (mPA-210p - MS Tecnocon), por sua imersão direta nas suspensões de nanocápsulas. Para quantificação do (PhSe)₂ nas formulações, uma alíquota de 90 µL da suspensão foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com metanol. Este foi deixado em ultrassom por 30 minutos, para completa extração do (PhSe)₂. A amostra foi filtrada através de uma membrana de 0,45 µm e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu), utilizando metodologia já validada em nosso grupo de pesquisa (ENGLERT et al., 2020). A fase móvel isocrática constituiu-se de metanol e água ultrapura (90:10, v/v), a uma vazão de 1 mL/min e um volume de injeção de 20 µL, e comprimento de onda de 243 nm. Para determinar a eficiência do encapsulamento, uma alíquota da suspensão de NC- (PhSe)₂ foi colocada em um dispositivo de filtro centrífugo de 10.000 MW (Amicon® Ultra, Millipore) e o ativo livre separado das nanoestruturas usando a técnica de ultrafiltração/centrifugação (2200 rpm por 10 min). A eficiência de encapsulamento (%) foi calculada como a diferença entre as concentrações totais e livres de (PhSe)₂, determinadas nas nanoestruturas e no ultrafiltrado, respectivamente (Equação 1).

$$(EE\%) = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor Livre}}{\text{Teor Total}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.3 Avaliação da atividade anti-*T. vaginalis*

4.2.3.1 Cultura celular de *T. vaginalis*

Nesse estudo, foram utilizados isolados de *T. vaginalis* 30236 da American Type Culture Collection (ATCC). Os isolados foram cultivados *in vitro* em meio trypticase-estrato levedo de maltose (TYM), pH 6,0, suplementado com 10% (v/v) de soro inativado pelo calor e incubados à 37 °C (DIAMOND, 1957). *Trichomonas* com mais de 95% de viabilidade e

morfologia normal na fase de crescimento logarítmico foram utilizados para o teste de atividade anti-*T. vaginalis*.

4.2.3.2 Ensaio de atividade anti-*T. Vaginalis*

Suspensões de nanocápsulas contendo (PhSe)₂ na concentração de 1 mg/mL foram utilizadas para determinar a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀), com a concentração final por poço variando de 0,31 mg/mL a 0,008 mg/mL. Após, a suspensão do parasita foi adicionada em cada poço resultando em uma densidade final de 2,0x10⁵ trofozoítos/mL. A mesma diluição foi usada para a suspensão de nanocápsulas branca. As microplacas foram incubadas por 24 h à 37 °C com 5% de CO₂, e a viabilidade dos trofozoítos medida pela contagem de parasitas utilizando o método de exclusão por azul de tripano (0,2%) e hemocitômetro. A avaliação da atividade do (PhSe)₂, livre também foi realizada, onde este foi diluído com dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram expressos como organismos vivos em comparação com os parasitas não tratados e os valores de IC₅₀ foram avaliados usando o software GraphPad Prism 6.

4.2.4 Determinação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi avaliado usando o ensaio de eliminação de radicais DPPH, conforme descrito por Sharma; Bhat (2009). As amostras foram avaliadas nas concentrações 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 µg/mL. A suspensão NC-(PhSe)₂ foi diluída em água destilada para atingir as concentrações desejadas para o teste. (PhSe)₂ puro, óleo de coco virgem e a combinação de óleo de coco virgem e (PhSe)₂ foram diluídos em DMSO. O DPPH foi dissolvido em metanol e utilizado conforme obtido (50 µM). As amostras foram incubadas com a solução de DPPH por 30 min sob proteção da luz. A seguir, cada amostra teve a absorbância medida usando um espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, Japão) a 517 nm. Soluções puras de DPPH e ácido ascórbico foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Este experimento foi realizado em triplicata e a atividade de eliminação de radicais foi expressa como porcentagem da capacidade de eliminação, a partir da equação abaixo (Equação 2):

$$SC\% = 100 - \frac{(Abs - Abb) \times 100}{Abc} \quad (2)$$

Onde SC% é a capacidade *scavenger* em porcentagem, Abs é a absorbância da amostra incubada com DPPH, Abb é a absorbância do respectivo branco e Abc a absorbância do controle negativo.

4.2.5 Avaliação da mucoadesão *in vitro* das suspensões de nanocápsulas

A mucoadesividade das suspensões de nanocápsulas foi avaliada com base no método de partícula de mucina descrito por Takeuchi e colaboradores (2005). Mucina porcina Tipo II foi suspensa em 0,1% de água ultrapura (p / v). A suspensão de nanocápsulas foi diluída em solução de mucina (1: 500, v / v) e o tamanho médio das partículas e o potencial zeta foram determinados em Zetasizer[®]. Estas análises foram realizadas à temperatura ambiente em triplicata.

4.2.6 Preparação dos hidrogéis

A tabela 1 apresenta a composição quali-quantitativa dos hidrogéis desenvolvidos nesse estudo. As formulações foram preparadas em triplicata utilizando gral de vidro e pistilo. A goma de alfarroba foi empregada como polímero formador de gel na concentração de 3 %. As suspensões NC-(PhSe)₂, na concentração de 1 mg/mL foram incorporadas lentamente, a frio, junto a goma, até completa homogeneização dos componentes e formação de 10 g de hidrogel, o qual foi denominado HG-NC(PhSe)₂. Da mesma forma, o hidrogel com a suspensão de nanocápsulas brancas (HG-NCB) foi preparado. Também foi preparado o hidrogel livre contendo somente (PhSe)₂ denominado HG-(PhSe)₂ através de uma dispersão de goma de alfarroba em água, contendo uma mistura de óleo de coco e DMSO, para fins de comparação.

Tabela 1- Composição quali e quantitativa dos hidrogéis.

Componente	HG-NC(PhSe)₂	HG-NCB	HG-(PhSe)₂
Suspensão de NC (mL)	10	10	-
Goma de Alfarroba (g)	3	3	3
(PhSe) ₂ (g)	-	-	0,01
Óleo de coco (μL)	-	-	330

DMSO (μL)	-	-	670
Água destilada (mL)	-	-	9

4.2.7 Caracterização físico-química dos hidrogéis

Após a preparação, as formulações semissólidas foram caracterizadas quanto ao aspecto, cor, tamanho de partícula e índice de polidispersão, pH e teor de ativo. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata.

O diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão dos hidrogéis foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons a 25 °C (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK), após a diluição das amostras em água ultrapura (500x) e filtração em membrana de 0,45 μm . Para avaliação do pH, os hidrogéis foram diluídos a 10% em água destilada e as avaliações feitas à temperatura ambiente, em potenciômetro (mPA-210p - MS Tecnopon) previamente calibrado. Para a determinação do teor de $(\text{PhSe})_2$, os HGs (0,01 g) foram dispersos em 25 mL de metanol, submetidos a 30 min de agitação magnética à temperatura ambiente, seguido de 30 min em banho de ultrassom. Em seguida, as amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,45 μm e analisadas por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu), utilizando metodologia já validada em nosso grupo de pesquisa.

4.2.8 Avaliação da espalhabilidade dos hidrogéis

A espalhabilidade foi determinada, em triplicata, através do método das placas paralelas descrito por Borghetti e Knorst (2006) e modificado por Rigo e colaboradores (2012). Nessa técnica, a amostra foi cuidadosamente colocada no orifício central, apresentando 1,2 cm de diâmetro, de uma placa de vidro, removida lentamente. Sobre a amostra, em intervalos de 1 min, foram sendo colocadas placas de vidro (10 x 10 cm) com pesos conhecidos. A cada nova placa, utilizando um *scanner*, a imagem da formulação era registrada. Para verificar a área expandida da formulação a cada placa aplicada, utilizou-se o programa ImageJ (*Version 1.49q*, National Institutes of Health, EUA). O fator de espalhabilidade (FE), em mm^2/g , foi determinado utilizando a equação (3), onde A= área máxima espalhada e P= peso total aplicado.

$$\text{FE} = A (\text{mm}^2) / P (\text{g}) \quad (3)$$

4.2.9 Avaliação reológica dos hidrogéis

Para determinar o comportamento reológico ($n=3$), um viscosímetro Brookfield (modelo RVDV-IPRIME, Brookfield, EUA) com um *spindle* RV06 foi utilizado. Aproximadamente, 30 g de cada hidrogel foram submetidos a velocidades de cisalhamento de 2 a 100 rpm à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Para avaliar o modelo reológico que melhor descreveu o comportamento dos hidrogéis, as equações de Bingham (4), Casson (5) e Ostwald (6) foram testadas.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (4)$$

$$\sigma^{0,5} = \sigma_0^{0,5} + \eta^{0,5} \dot{\gamma}^{0,5} \quad (5)$$

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

Onde: η é a viscosidade, σ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ taxa de cisalhamento, n é o índice de plasticidade, K é o coeficiente de consistência e σ_0 é o valor de cedência.

4.2.10 Avaliação do potencial irritativo das formulações

O potencial de irritação das formulações foi avaliado pelo método da membrana corioalantóide (MCA), a partir da metodologia recomendada pelo Comitê Interinstitucional para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM). Esta avaliação foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA) (Processo nº 5428271020/2021). Para o ensaio foram utilizados ovos de galinha fertilizados no 10º dia de incubação ($36,0 \pm 0,5$ °C e 88 % de umidade), doados pela empresa Languiru (Teutonia, Brasil). Com auxílio de uma pinça foi retirada a casca na região da câmara de ar e a membrana externa, deixando exposta a MCA, que foi umedecida com solução fisiológica (NaCl 0,9%). Para as suspensões de nanocápsulas foram aplicados 300 μ L das mesmas ($n=6$) na MCA durante 20 s e para os hidrogéis 0,3 g foram aplicados em pelo menos 50% da membrana, analisando os resultados na parte não coberta pelo hidrogel. Em seguida, a membrana foi lavada com NaCl 0,9%. O aparecimento dos eventos de lise, coagulação e hemorragia foram observados durante 300 s. Para a validação, foram utilizadas soluções controle, onde o controle negativo utilizado foi uma solução aquosa de NaCl 0,9% e para o controle positivo uma solução de hidróxido de

sódio 0,1 M. O grau de irritação foi calculado conforme a equação 7 e os resultados foram classificados na faixa de 0 - 0,9 (não irritantes), 1 - 4,9 (ligeiramente irritante), 5 - 8,9 (moderadamente irritante), 9 - 21 (irritante severo) (CONTRI et al, 2016; LUEPKE, 1985).

$$EI = 5x \frac{(301-c)}{300} + 7x \frac{(301-l)}{300} + 9x \frac{(301-h)}{300} \quad (7)$$

Onde: *EI* representa o escore de irritação, *h* corresponde ao tempo de hemorragia, *l* ao tempo de lise e *c* equivale ao tempo de coagulação.

4.2.11 Avaliação da força mucoadesiva dos hidrogéis

A força mucoadesiva foi determinada pela metodologia descrita por Gonjari e colaboradores (2009) com algumas modificações. Para este ensaio, a mucosa vaginal bovina (4,5 cm) foi cortada e fixada sobre uma placa de vidro. Em um suporte superior foram adicionados 0,8 g de cada hidrogel (n=3) que foi colocado em contato com a mucosa por 1 min, aplicando um peso de 1 N. Após, foi adicionada água em um recipiente em lado oposto até que ocorresse a separação entre mucosa e formulação. A quantidade de água adicionada foi medida em uma proveta para determinação do volume necessário para a separação da formulação e mucosa. Para fins comparativos, como controle positivo, um gel de Carbopol foi preparado pesando-se 0,05 g do mesmo, o qual foi incorporado em 10 mL H₂O destilada e 100 µL de trietanolamina até o espessamento e formação do gel. A força mucoadesiva foi determinada utilizando a equação 8.

$$\text{Força mucoadesiva} = \frac{m \cdot g}{A} \quad (8)$$

Onde: *m* corresponde a quantidade de água necessária para a separação, *g* à aceleração da gravidade (980 cm/s²) e *A* à área da mucosa (4,5 cm).

4.2.12 Estudo de permeação *ex vivo* em mucosa vaginal bovina

Neste estudo a metodologia utilizada foi descrita por Nielsen e colaboradores (1998) com algumas modificações. Para a execução do experimento, células de difusão de Franz foram utilizadas, tendo como meio receptor tampão fosfato pH 5,5 a 37 ± 0,5 °C e mucosa vaginal

bovina como membrana ($n=6$). Para o teste, a mucosa foi cuidadosamente separada do tecido adjacente e cortada em tamanho apropriado para o experimento. Os fragmentos foram mantidos congelados em $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o teste. A área de difusão utilizada foi de $3,14\text{ cm}^2$, bem como $6,0\text{ mL}$ de meio receptor. Uma quantidade de $0,5\text{ g}$ de cada hidrogel foi aplicada na superfície da mucosa. Após 8 h de incubação, uma alíquota do meio foi coletada do compartimento receptor, a fim de avaliar se o ativo permeou através da mucosa. O excesso de formulação foi removido e a mucosa cortada em pedaços, sendo colocada em contato com 5 mL de metanol. Na sequência, as amostras foram submetidas ao processo de extração em vórtex (2 min) e ultrassom (15 min). Após, as amostras foram filtradas através de uma membrana de celulose regenerada de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e analisadas ($50\text{ }\mu\text{L}$) por CLAE.

4.2.13 Análise estatística

As formulações foram preparadas e analisadas em triplicata, sendo seus resultados expressos como média \pm desvio padrão. Foi analisada a normalidade dos resultados, que posteriormente foram tratados estatisticamente através do teste t ou de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey. Todos os testes foram conduzidos utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Após o preparo, todas as formulações (Figura 7) mostraram uma aparência macroscópica homogênea “semelhante ao leite”, sem qualquer precipitação visível. As suspensões NC- (PhSe)₂ apresentaram coloração levemente amarelada devido à incorporação do composto nas nanoestruturas. Observou-se também aspecto turvo e reflexo opalescente azulado, características do movimento caótico apresentado pelas partículas coloidais.

Figura 7- Foto da suspensão NC-B (A) e da suspensão NC- (PhSe)₂ (B)



Os resultados da caracterização estão expressos na Tabela 3. As suspensões de nanocápsulas apresentaram diâmetro médio na faixa nanométrica e valores de índice de polidispersão (IPD) na faixa adequada, em torno de 0,2, indicando uma distribuição estreita do tamanho de partícula e homogeneidade do sistema. Os valores do potencial zeta foram positivos, refletindo a carga positiva dos grupos de amônio quaternário presentes no copolímero acrílico Eudragit[®] RS 100 (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Os valores de pH foram levemente ácidos, coerentes com outras suspensões de nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] RS 100 (DE LIMA et al., 2017; ENGLERT et al., 2020) e compatíveis com o pH do trato vaginal (cerca de 4,5) (SCHAFFAZICK et al., 2006). O teor total de (PhSe)₂ na suspensão de nanocápsulas apresentou valores próximos ao valor teórico (1,0 mg/mL), indicando que não houve perdas durante o processo de preparação. Além disso, foi alcançada uma alta eficiência de encapsulação de 99,92 %, o que pode ser atribuído à alta lipofilicidade do (PhSe)₂ e à alta solubilidade do mesmo no óleo utilizado na preparação do nanocarreador. Esses resultados estão de acordo com outros relatos que mostram a incorporação de compostos de

organosselênio em nanoestruturas (ENGLERT et al., 2020; FERREIRA et al., 2018). Não foi observada diferença estatística significativa entre nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 3- Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (média \pm desvio padrão, $n=3$, teste t).

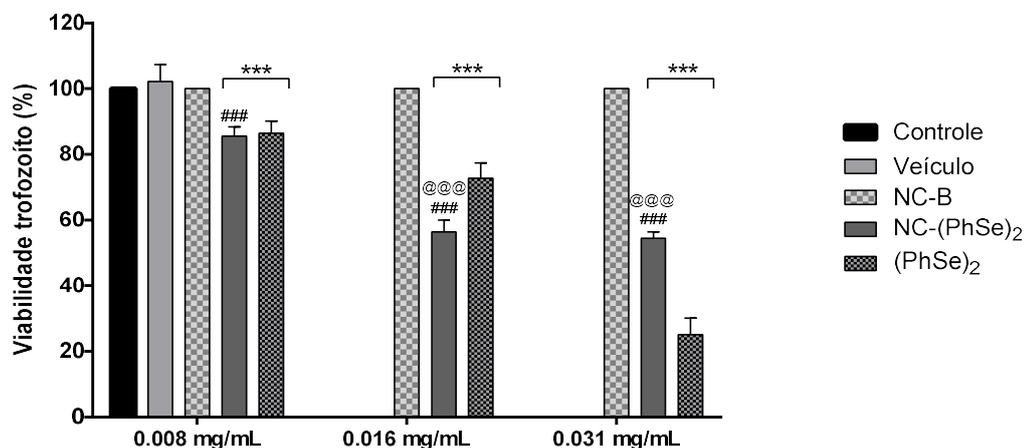
Formulação	DM (nm)	IPD	PZ (mV)	pH	Teor (mg/mL)	EE (%)
NC-B	206 \pm 20	0,22 \pm 0,05	+8,50 \pm 2,22	4,97 \pm 0,18	-	-
NC-(PhSe) ₂	193 \pm 14	0,19 \pm 0,07	+6,86 \pm 0,66	5,04 \pm 0,02	1,04 \pm 0,03	99,92

DM: Diâmetro médio; IPD: Índice de polidispersão; PZ: Potencial zeta

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- *TRICHOMONAS VAGINALIS*

No presente estudo, a atividade anti-*T. vaginalis* do (PhSe)₂ foi avaliada pela primeira vez, bem como o desempenho de uma suspensão de nanocápsulas contendo este composto (Figura 8). Os valores de IC₅₀ obtidos para (PhSe)₂ e NC-(PhSe)₂ foram de 0,027 mg/mL e 0,034 mg/mL, respectivamente.

Figura 8- Atividade anti-*T. vaginalis* (PhSe)₂, NC-(PhSe)₂ e NC-B contra isolado ATCC 30236. Os dados são apresentados como média e desvio padrão do controle (considerando 100% de viabilidade dos trofozoítos) (ANOVA de uma via, seguida de *Tukey*). Onde: (***) $p < 0,001$: diferença estatística entre controle e tratamento. (###) $p < 0,001$: diferença estatística entre NC-B e NC-(PhSe)₂. (@@@) $p < 0,001$: diferença estatística entre (PhSe)₂ e NC-(PhSe)₂.



Observou-se que na concentração mais baixa tanto o $(\text{PhSe})_2$ como NC- $(\text{PhSe})_2$ apresentaram atividade frente ao *T. vaginalis*, reduzindo a viabilidade do trofozoíto de forma semelhante. Na concentração intermediária, $(\text{PhSe})_2$ nanoencapsulado apresentou atividade anti-trichomonas superior ao $(\text{PhSe})_2$ livre, com redução de forma expressiva na viabilidade do trofozoíto. Para a maior concentração, a nanoencapsulação manteve a atividade anti-trichomonas do $(\text{PhSe})_2$, mesmo em uma concentração mais elevada, enquanto o composto livre aumentou sua ação citotóxica no parasita. De maneira geral, as nanocápsulas brancas (NC-B) não reduziram a viabilidade do trofozoíto, o que demonstra que os componentes da formulação não influenciam a atividade anti-*T. vaginalis*, sendo esta somente atribuída ao $(\text{PhSe})_2$. O fato de NC- $(\text{PhSe})_2$ manter o percentual de viabilidade dos trofozoítos da concentração intermediária em relação à maior concentração poderia ser explicado pela taxa lenta e altamente controlada de liberação que o ativo apresenta a partir das nanocápsulas, visto ser um composto com elevada lipofilia (PRIGOL et al., 2013; PRIGOL et al., 2012) As moléculas devem superar a barreira de partição entre o núcleo oleoso e a membrana polimérica para serem liberadas para o meio externo, que é aquoso e não oferece condições adequada para liberação de $(\text{PhSe})_2$. Logo, a barreira da casca polimérica impediria a liberação abrupta do ativo das estruturas e consequentemente a ação instantânea do ativo encapsulado frente ao parasita. Desta forma, acredita-se que as condições experimentais da avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* não favoreçam o gradiente de concentração para uma maior liberação do $(\text{PhSe})_2$ (ZIMMERMANN e at., 2021)

Todavia, $(\text{PhSe})_2$ livre reduz de forma mais acentuada a viabilidade do trofozoíto para maior concentração testada, visto que trabalhamos com uma molécula que tem uma toxicidade relevante. Compostos orgânicos de selênio, até uma determinada concentração, apresentam efeitos biológicos positivos, porém dependendo da sua atividade ou tecido em que interagem, começam a prevalecer os efeitos tóxicos, o que é conhecido como Efeito *Janus Face* (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; ROSA et al., 2007).

Assim, a nanoencapsulação de $(\text{PhSe})_2$ torna-se uma abordagem interessante para superar as restrições físico-químicas do composto, bem como sua toxicidade, sem comprometer suas propriedades biológicas potenciais. Trabalhos na literatura já demonstraram que a nanoencapsulação do $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de reduzir sua toxicidade, ampliando a perspectiva de sua aplicação terapêutica (FERREIRA et al., 2018; FERREIRA et al., 2019a).

A patogenicidade gerada pelo *T. vaginalis* desencadeia uma resposta inflamatória com liberação de interleucinas, fator de necrose tumoral alfa, macrófagos e neutrófilos, gerando

inflamação ao epitélio vaginal (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012; MERCER; JOHNSON, 2018). Todavia, as células do sistema imune de maior prevalência em infecções pelo *T. vaginalis* são os neutrófilos, e como resposta imunológica à tricomoníase ocorre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células atingidas pelo patógeno (SONG et al., 2008). Com isso, Hübner e colaboradores (2016) investigaram a capacidade de ativos em reduzir a produção de EROs em neutrófilos estimulados pelo *T. vaginalis*. No estudo, concluíram que os compostos capazes de controlar a produção de EROs pelos neutrófilos e que também apresentaram efeito anti-inflamatório, danificaram a sinalização celular levando a morte dos trofozoítos (HÜBNER et al., 2016). Nesse contexto, diversos trabalhos na literatura demonstram que $(\text{PhSe})_2$ é um agente antioxidante e anti-inflamatório (BALDISSERA et al., 2020; MÜLLER et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2003b; PETRONILHO et al., 2016; QUISPE et al., 2019; SANMARTÍN et al., 2011), o que pode justificar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* apresentada pelo composto.

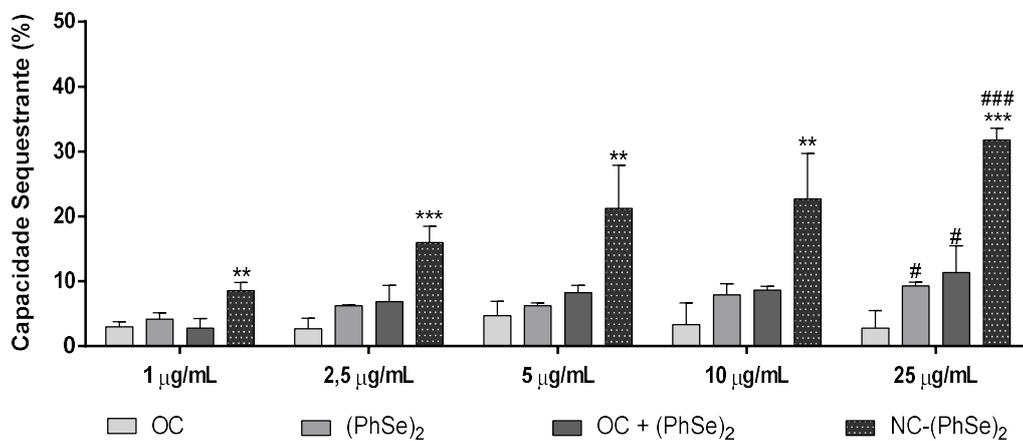
Além do exposto acima, trabalhos anteriores da literatura indicaram que o ácido siálico é o principal componente da membrana de *T. vaginalis*, contribuindo para a carga superficial negativa do protozoário. Pode-se sugerir que a superfície positiva das nanocápsulas de Eudragit® RS 100 tem potencial para interagir com a membrana carregada negativamente do parasita através de interações eletrostáticas (E SILVA FILHO; ELIAS; DE SOUZA, 1986; PRADINES et al., 2015). Também é bem conhecido que *T. vaginalis* tem intensa atividade endocítica através da superfície celular, onde já demonstrou sua capacidade de incorporar nanopartículas por meio de um processo que envolve vesículas endocíticas e vacúolos. Esta internalização de nanopartículas gera, conseqüentemente, vazamento de componentes intracelulares e morte parasitária (BENCHIMO et al., 1986, BENCHIMOL; BATISTA; DE SOUZA, 1990; MALLI et al., 2018).

5.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O ensaio de DPPH é uma metodologia muito útil para avaliar o potencial antioxidante de substâncias. O ácido ascórbico, que foi utilizado como controle positivo, nas concentrações testadas de 1; 2,5; 5 ;10 e 25 g/mL apresentou capacidade sequestrante de $55,36\% \pm 5,73$; $85,26\% \pm 2,03$; $88,00\% \pm 0,63$; $90,32\% \pm 1,59$ e $92,42\% \pm 0,63$ respectivamente, comprovando assim, a performance correta do teste.

Observou-se (Figura 9) que em todas as concentrações testadas, a suspensão de NC-(PhSe)₂ apresentou ação sequestrante superior em comparação com (PhSe)₂ livre (p< 0,01). Além disso, para a maior concentração testada, a nanoencapsulação do composto demonstrou maior capacidade antioxidante do que o óleo de coco livre, e a combinação de óleo de coco e (PhSe)₂, destacando a ação antioxidante já descrita para ambos os ativos (BALDISSERA et al., 2020; MARINA et al., 2009; MÜLLER et al., 2018; QUISPE et al., 2019).

Figura 9- Potencial antioxidante avaliado pelo ensaio do DPPH (média ± desvio padrão, n = 3) (ANOVA de uma via, seguida de Tukey). (**) p< 0,01, (***) p<0,001: significa diferença significativa entre NC-(PhSe)₂ e demais tratamentos. (#) p<0,05, (###) p<0,001: diferença significativa entre OC e demais tratamentos.



O aumento do potencial antioxidante através da nanoencapsulação pode ser explicado devido a uma maior superfície de contato proporcionado pela escala nanométrica das partículas em suspensão, facilitando a doação de hidrogênio para o sítio do radical (KUMAR et al., 2015; MARCHIORI et al., 2017b). Além disso, nossos resultados são corroborados por outros estudos que mostraram a melhora na atividade de eliminação de radicais proporcionada pelas nanopartículas (ENGLERT et al., 2020; GEHRCKE et al., 2017; MATTIAZZI et al., 2019).

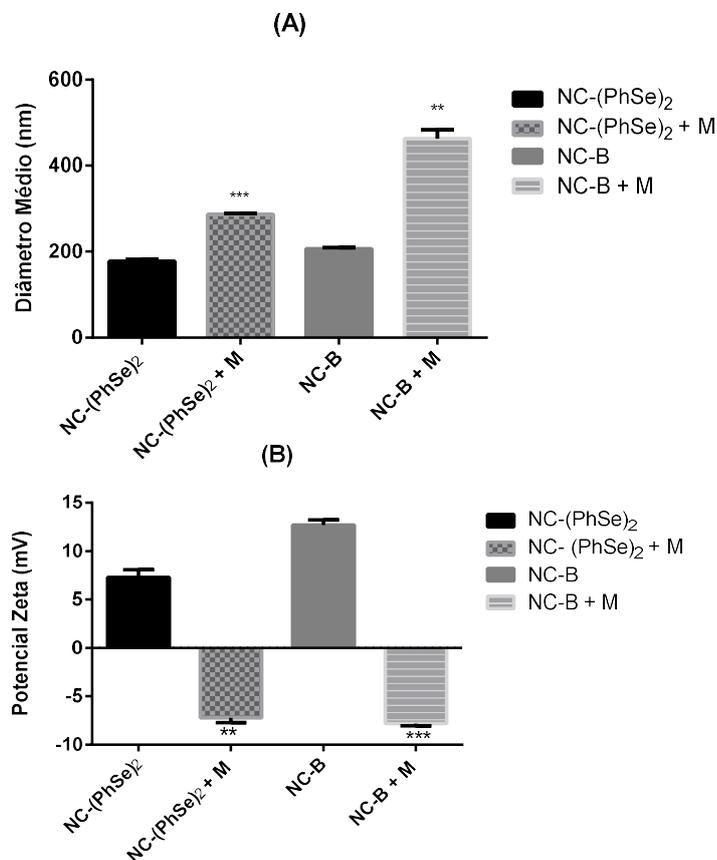
5.4 AVALIAÇÃO DA MUCOADESÃO *IN VITRO* DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Dado que a mucoadesividade pode influenciar na retenção da formulação para o tecido vaginal, a interação das nanocápsulas com a mucina foi avaliada considerando que a mucina é o principal componente do muco, sendo também responsável pelas propriedades viscosas e

elásticas (BANSIL; TURNER, 2006; DOS SANTOS et al., 2020). Ao medir a mudança no tamanho das partículas ou potencial zeta através da metodologia de partícula de mucina, em uma determinada concentração de solução de polímero, podemos estimar a extensão de sua propriedade mucoadesiva (TAKEUCHI et al., 2005).

Os resultados ilustrados na Figura 10 demonstraram que a exposição à mucina causou uma modificação com aumento significativo no tamanho médio de partícula ($p < 0,01$) e alteração do potencial zeta, através da inversão da carga do polímero em comparação com os valores iniciais. Como pode ser observado, os valores de potencial zeta iniciais das suspensões foram $+7,28 \pm 0,79$ mV e $+12,70 \pm 0,53$ mV para NC-(PhSe)₂ e NC-BR, respectivamente, e após o contato com mucina, o potencial mudou para $-7,21 \pm 0,50$ mV e $-7,82 \pm 0,21$ mV, respectivamente.

Figura 10- Representação gráfica do diâmetro médio (A) e potencial zeta (B) das suspensões antes (NC-(PhSe)₂; NC-B) e após (NC-(PhSe)₂ + M; NCB + M) o contato com a dispersão de mucina (média \pm desvio padrão, n = 3) (teste t pareado). (##) $p < 0,01$ e (###) $p < 0,001$: indica diferença estatística entre tamanho da formulação de nanocápsulas antes e depois do contato com mucina.



A modificação e aumento do diâmetro médio após contato com dispersão de mucina se deve à agregação de partículas de polímero / mucina. Além disso, a interação eletrostática é o mecanismo mucoadesivo que explica este fenômeno. Este, pode ser devido à interação de cargas negativas de grupos siálicos da mucina com a camada superficial das nanopartículas carregadas positivamente. Portanto, pode-se concluir que as nanocápsulas são capazes de interagir ionicamente com a mucina (DILLEN et al., 2006; NIKAM et al., 2011; CHAVES et al., 2018; BHATTA et al., 2012).

Esses resultados são corroborados por outros estudos que utilizaram a mesma metodologia de avaliação (CHAVES et al., 2018; DE LIMA et al., 2017; ENGLERT et al., 2020), além de serem esperados para as formulações devido ao material bioadesivo polimérico utilizado para compor as nanocápsulas, o que pode aumentar o tempo de residência da forma farmacêutica na mucosa vaginal (CHAVES et al., 2018).

5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS

As características macroscópicas dos hidrogéis (HGs) são demonstradas na Figura 11. Todos os HGs apresentaram características organolépticas satisfatórias com aspecto homogêneo, sem grumos ou precipitados. HG-NCB apresentou uma aparência branca leitosa, ao passo que ambos os hidrogéis contendo $(\text{PhSe})_2$ exibiram uma coloração amarelada, onde HG- $(\text{PhSe})_2$ era amarelo brilhante, enquanto HG-NC $(\text{PhSe})_2$ apresentou aspecto mais opaco.

Figura 11- Aspecto macroscópico dos hidrogéis de goma de alfarroba



Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos HGs estão representados na Tabela 4. As formulações HG-B e HG-NC $(\text{PhSe})_2$, em comparação as suas respectivas suspensões, apresentaram discreto aumento de tamanho ($p < 0,01$) devido à incorporação da

goma de alfarroba. No entanto, mantiveram os diâmetros médios na faixa nanométrica, indicando a manutenção do tamanho das nanoestruturas no hidrogel. A presença de nanocápsulas intactas nos HGs mostra-se importante para uma adequada distribuição, retenção e absorção da formulação na mucosa vaginal, melhorando assim, a eficácia terapêutica (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; OSMARI et al., 2020).

Tabela 4- Características físico-químicas das formulações semissólidas desenvolvidas (média \pm desvio padrão, n=3, teste t e ANOVA seguido de Tukey para pH).

Formulação	DM (nm)	IPD	pH	Teor (mg/g)
HG-(PhSe) ₂	-	-	7,52 \pm 0,10	1,08 \pm 0,09
HG- B	295 \pm 24	0,29 \pm 0,09	6,16 \pm 0,14	-
HG- NC(PhSe) ₂	237 \pm 4	0,25 \pm 0,01	6,20 \pm 0,14	0,96 \pm 0,01

DM: Diâmetro médio; IPD: Índice de polidispersão; PZ: Potencial zeta

O índice de polidispersão (IPD) nos permite avaliar a homogeneidade das formulações em relação ao tamanho das partículas. Valores abaixo de 0,25 indicam distribuição adequada (WU; ZHANG; WATANABE et al., 2011). Assim, os HGs apresentaram valores de IPD satisfatórios.

Os valores de pH dos HGs ficaram próximos da neutralidade, mesmo considerando o pH ácido das suspensões de nanocápsulas ($p < 0,01$). No delineamento de formulações vaginais, recomenda-se atenção ao pH vaginal (3,8 - 4.5) porque é considerado um fator de proteção contra a proliferação de patógenos (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018). No entanto, muitos fluidos biológicos podem aumentar o pH vaginal a um valor próximo à neutralidade ($pH > 5$), como menstruação, transudato vaginal e sêmen (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Além disso, vaginose bacteriana e tricomoníase também aumentam o pH vaginal (KISSINGER et al., 2015; MENARD, 2011). Desse modo, apesar do pH do hidrogel estar acima da faixa recomendada, a formulação desenvolvida não é potencialmente nociva e seus possíveis benefícios para o manejo da tricomoníase superam as possíveis consequências da alteração de pH. Para apoiar esta conclusão, formulações apresentando valores de pH próximos da neutralidade já foram descritas na literatura (OSMARI et al., 2020; SINGH et al., 2014; SZYMAŃSKA et al., 2018).

Em relação ao teor do ativo, valores próximos aos teóricos foram encontrados, onde as concentrações de (PhSe)₂ nos HGs foram próximas de 100 %, indicando que não houve perdas ou degradação do composto durante o processo de preparação dos hidrogéis (ENGLERT et al., 2020; FERREIRA et al., 2018).

De maneira geral, os resultados estão de acordo com outros relatos que mostraram a incorporação de nanoestruturas em gomas para obtenção de uma forma farmacêutica final (FERREIRA et al., 2018; PERINELLI et al., 2018; RIGON et al., 2019; SARI et al., 2020).

5.6 ESPALHABILIDADE

A avaliação da espalhabilidade é uma característica importante a ser determinada no desenvolvimento de formulações semissólidas, pois verifica a capacidade da formulação em espalhar-se sobre uma superfície, e está relacionada com a sua aplicação diretamente no local pretendido (GARG et al., 2002). Os perfis de espalhabilidade dos HGs (Figura 12) mostraram que a área espalhada de todos os HGs aumentou com a acumulação de peso. A análise estatística não revelou nenhuma diferença significativa entre esses perfis. Os fatores de espalhabilidade dos HGs também foram calculados e são representados na Tabela 5, que mostra semelhantes resultados para todos os HGs ($p > 0,05$). Valores de FE mais altos foram relatados, para hidrogéis de goma xantana contendo $(\text{PhSe})_2$ ($6,7 \pm 1,3 \text{ mm}^2/\text{g}$ e $8,3 \pm 0,7 \text{ mm}^2/\text{g}$ (FERREIRA et al., 2019c) e goma gelana contendo $(\text{PhSe})_2$ ($3,92 \pm 0,36 \text{ mm}^2/\text{g}$ e $3,77 \pm 0,22 \text{ mm}^2/\text{g}$) (ZIMMERMANN e at., 2021). Tratando-se de uma formulação para aplicação vaginal, essas diferenças podem indicar que os hidrogéis de goma de alfarroba possuem uma consistência superior quando comparada à goma xantana e gelana, proporcionando melhor fluidez e retenção do semissólido no local de aplicação.

Figura 12- Representação gráfica da espalhabilidade das formulações HG-(PhSe)₂, HG-NCB e HG-NC(PhSe)₂ em função do peso adicionado (g) (média ± desvio padrão, n = 3). (ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

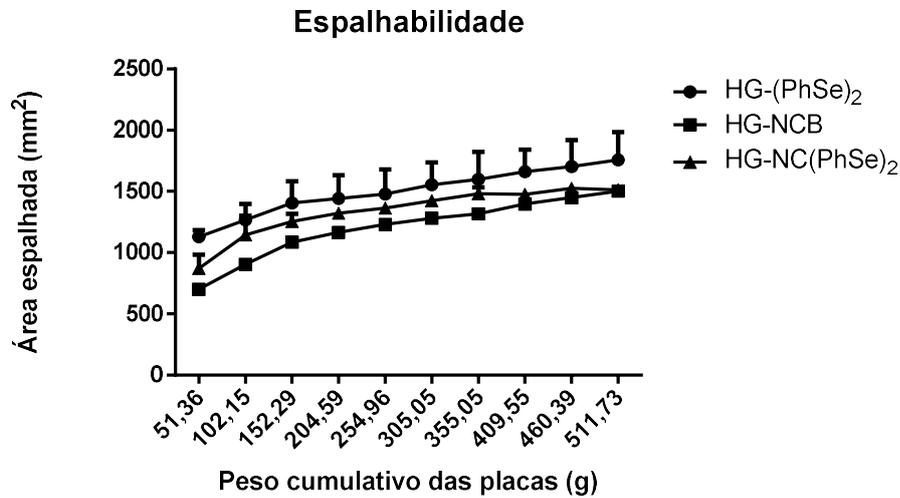


Tabela 5- Determinação do fator de espalhabilidade dos hidrogéis. Média ± desvio padrão, n=3. (ANOVA de uma via, seguido de Tukey).

Formulação	Espalhabilidade (mm²/g)
HG-(PhSe) ₂	3,43 ± 0,44
HG-NCB	2,94 ± 0,02
HG-NC(PhSe) ₂	2,95 ± 0,08

5.7 REOLOGIA

A caracterização reológica dos géis é importante para determinar o equilíbrio adequado entre a espalhabilidade e a retenção dos hidrogéis no local aplicado. Embora complexa, a viscoelasticidade é de interesse especial para a entrega vaginal de fármacos como modulação do equilíbrio viscoso. Portanto, através das propriedades interessantes dos géis, estes podem ser delineados para oferecer facilidade de aplicação, propagação intravaginal adequada e maior residência devido a uma melhor capacidade de resistir a tensões *in vivo*, particularmente após diluição nos fluidos vaginais (YU et al., 2011).

O viscograma e o reograma dos HGs foram obtidos através da representação gráfica da viscosidade versus taxa de cisalhamento (Figura 13), e tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento (Figura 14), respectivamente. A partir desses gráficos, pode-se observar que os hidrogéis apresentaram fluxo não-newtoniano, uma vez que as viscosidades não se mantêm constantes com a variação da taxa de cisalhamento aplicada e a relação da taxa de cisalhamento versus tensão de cisalhamento não é linear (LAHOUD; CAMPOS, 2020)

Figura 13- Representação gráfica da viscosidade dos hidrogéis (mPa.s) versus a taxa de cisalhamento (s^{-1}). (n=3)

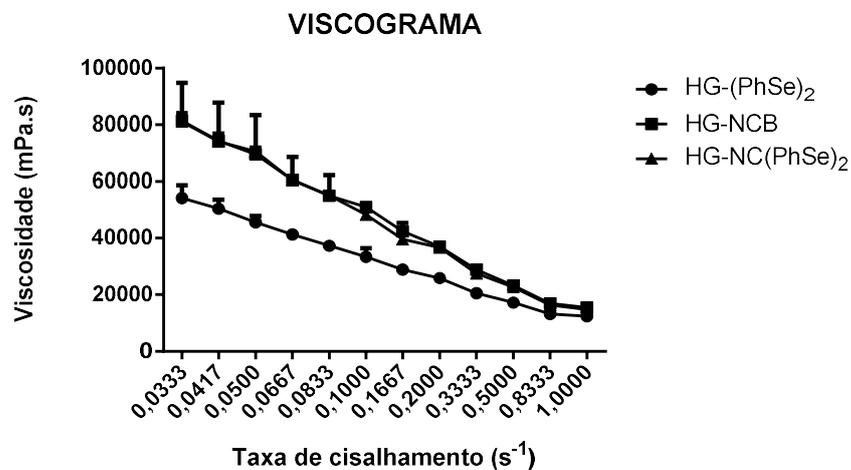
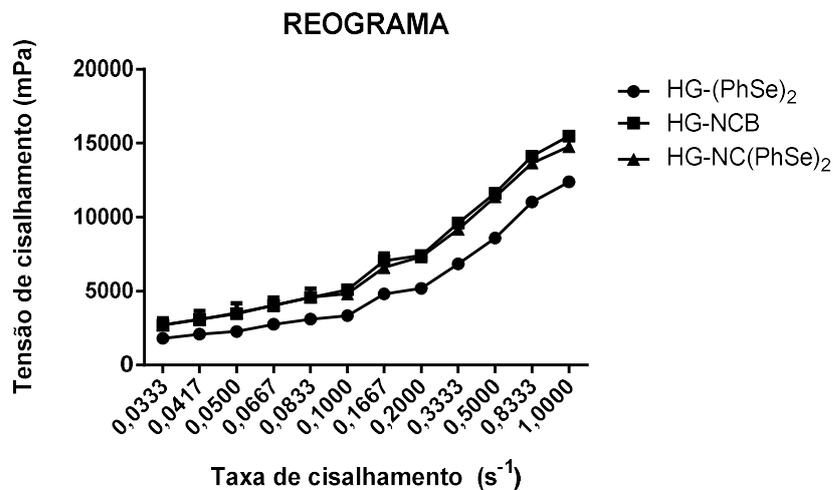


Figura 14- Representação gráfica da tensão de cisalhamento (mPa) versus a taxa de cisalhamento (s^{-1}), (n=3).



Em sistemas não-newtonianos os fluidos podem apresentar diferentes tipos de comportamento de fluxo: plástico, pseudoplástico ou dilatante. Assim sendo, todas as formulações adequaram-se melhor ao modelo de Ostwald, tendo em vista que foram obtidos os maiores valores de coeficiente de correlação (r). Este modelo descreve fluxo não-newtoniano pseudoplástico, o qual não necessita de tensão de cisalhamento mínima para começar a fluir (FERREIRA, 2008; LAHOUD; CAMPOS, 2020). Perfis semelhantes já foram relatados na literatura para outros estudos que utilizaram goma de alfarroba (HADDARAH et al., 2014) e HGs de outras gomas naturais, inclusive para aplicação vaginal (SARI et al., 2020; OSMARI et al., 2020).

Tabela 6- Coeficientes de correlação (r) obtidos para os diferentes modelos matemáticos (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

Formulação	Binghan	Casson	Ostwald
HG-(PhSe) ₂	0,982 \pm 0,006	0,992 \pm 0,004	0,998 \pm 0,001
HG- NCB	0,968 \pm 0,006	0,984 \pm 0,004	0,997 \pm 0,002
HG- NC (PhSe) ₂	0,968 \pm 0,006	0,985 \pm 0,004	0,997 \pm 0,001

Após estabelecer o melhor modelo, os índices de fluxo (n) e de consistência (k) foram calculados e estão representados na Tabela 7. O índice de consistência está relacionado com a própria viscosidade do produto, ou seja, com a resistência ao fluxo, enquanto que o índice de fluxo se refere ao grau de pseudoplastia do material (LAHOUD; CAMPOS, 2020). Todos os HGs apresentaram índices de fluxo menores que 1, confirmando o comportamento pseudoplástico, o qual é caracterizado pela diminuição da viscosidade aparente de forma gradual, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento e, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (CÔRREA et al., 2005).

Em geral, pode-se presumir que géis para administração vaginal com uma viscosidade mais baixa, tendem a se espalhar em uma taxa mais rápida e em maior extensão através da superfície vaginal. Isso torna-se uma desvantagem significativa, aumentando a probabilidade de vazamento do produto (YU et al., 2011). Neste contexto, em relação ao índice de consistência, foi possível observar que os hidrogéis contendo as nanoestruturas propiciaram uma maior viscosidade ao sistema ($p < 0,05$) em comparação ao hidrogel com ativo livre. Estes

resultados são corroborados por outros estudos que demonstraram o mesmo perfil reológico para a incorporação de nanoestruturas contendo compostos de organoselênio a HGs, onde a nanoencapsulação resultou em aumento da viscosidade das formulações em comparação ao ativo livre (FERREIRA et al., 2019c; SARI et al., 2020).

Nesse sentido, este resultado torna-se interessante para formulações de aplicação local, devido a maior facilidade de administração e também por melhorar a fluidez e retenção do semissólido no local de aplicação (BALESTRIN et al., 2016).

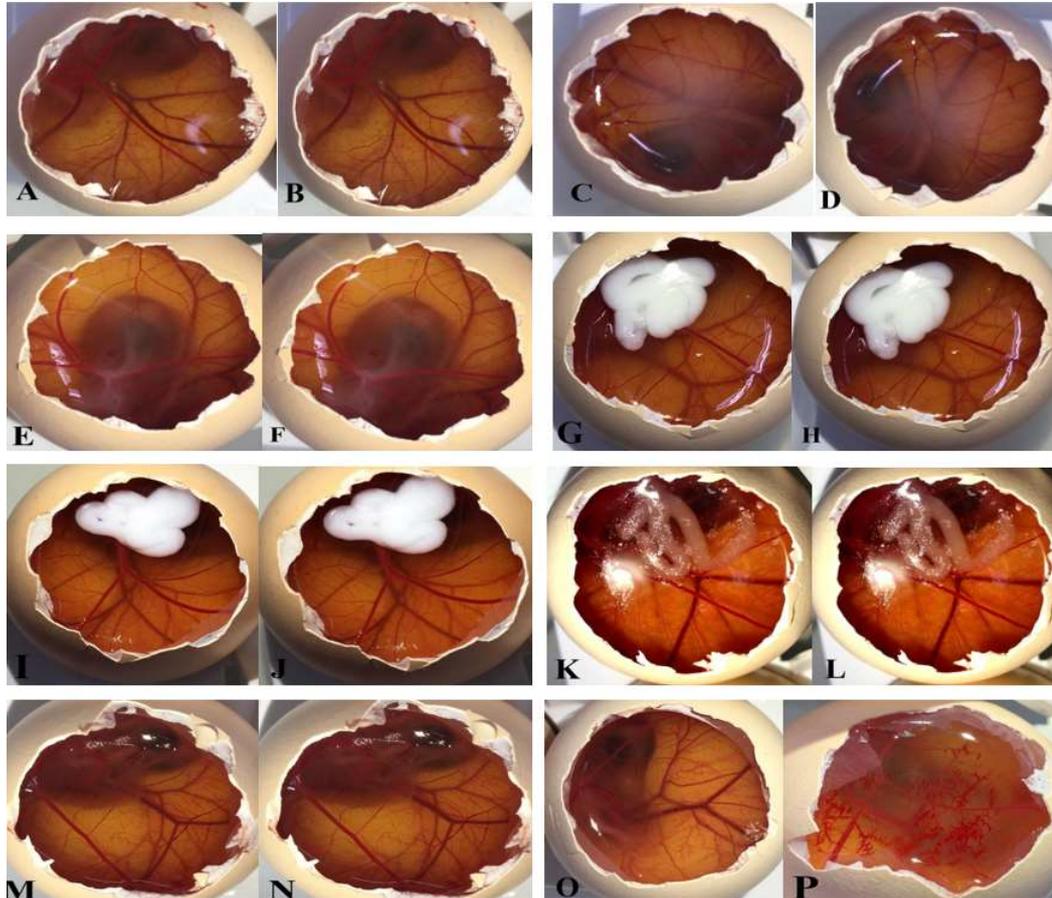
Tabela 7- Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) dos hidrogéis (média \pm desvio padrão, $n = 3$) (ANOVA de um fator, seguido de Tukey). (*) $p < 0,05$: diferença estatística entre HG-(PhSe)₂ e HG-NCB, (#) $p < 0,05$: diferença estatística entre HG-(PhSe)₂ e HG-NC(PhSe)₂.

Formulação	<i>N</i>	<i>K</i>
HG-(PhSe) ₂	0,565 \pm 0,0209	80896,54 \pm 7565,01
HG- NCB	0,5131 \pm 0,0114	153301,47 \pm 9511,48*
HG- NC (PhSe) ₂	0,5032 \pm 0,0588	155698,51 \pm 4410,87#

5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DAS FORMULAÇÕES

O teste da membrana Corioalantóide (HET-CAM) foi desenvolvido como alternativa à testes de toxicidade em modelos animais, sendo um teste rápido, sensível, barato e capaz de fornecer informações sobre embriotoxicidade, teratogenicidade, efeitos sistêmicos, metabólicos e imunopatológicos. Uma vez que os produtos vaginais são principalmente destinados à autoadministração e visam oferecer o máximo conforto tanto no momento da aplicação e durante o tempo de uso, a avaliação dos efeitos adversos como irritação local são especialmente importantes (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018; WINTER et al., 2020). Assim, todas as formulações desenvolvidas foram testadas, conforme demonstra a Figura 14.

Figura 15- Imagens do teste em membrana corioalantóide. Membranas expostas no tempo zero, e após 5 minutos, respectivamente, que correspondem: A e B ao $(\text{PhSe})_2$ livre; C e D à NC- $(\text{PhSe})_2$; E e F à NC-B; G e H à HG-NC $(\text{PhSe})_2$; I e J à HG-NCB; K e L à HG- $(\text{PhSe})_2$; M e N à HG-Veículo e O e P aos controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (NaOH 0,1 M).



Não foram visualizadas alterações como lise, coagulação ou hemorragia nas MCA frente às formulações em estudo, considerando-se que as imagens foram registradas em tempo zero e após 5 min de exposição. De mesmo modo procedeu-se com os controles positivo e negativo, classificados como severamente irritante ($\text{EI}=16,3 \pm 0,1$) e não irritante, respectivamente. Assim, tanto as suspensões de nanocápsulas, como os HGs desenvolvidos foram classificados como não irritantes, apontando que os componentes usados na formulação são considerados biocompatíveis (ENGLERT et al., 2020).

O teste do HET-CAM é tradicionalmente usado para avaliar o potencial de irritação de materiais para aplicação oftálmica. No entanto, a norma ISO 10993-10 considera que os epitélios oftálmico e vaginal apresentam sensibilidades semelhantes quanto ao potencial irritativo e por isso este teste também pode ser aplicado na avaliação de formulações vaginais (ISO 10993-10, 2010; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018).

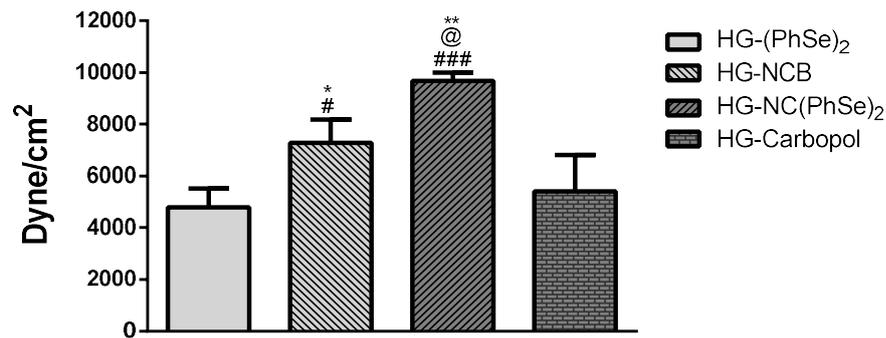
Em vista disso, qualquer material irritante para a pele ou olhos deve ser rotulado diretamente como um potencial irritante vaginal sem testes em animais. Embora várias técnicas não animais para a caracterização de formulações vaginais já foram descritas na literatura, a maioria tem sido aplicada apenas no desenvolvimento de formulações, sem correlações com resultados *in vivo* (CUNHA et al., 2014; GARG et al., 2001). Portanto, obter estes resultados através do ensaio HET-CAM e transpô-lo para aplicação ao teste de irritação vaginal, representa um resultado relevante para a avaliação de segurança pré-clínica de produtos vaginais (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018).

5.9 AVALIAÇÃO DA FORÇA MUCOADESIVA DOS HIDROGÉIS

O fenômeno de mucoadesão tem o potencial de otimizar a entrega localizada de um ativo, mantendo a formulação em contato íntimo com a mucosa vaginal. Desta forma, o tempo de residência da formulação é prolongado, resultando em um aumento na eficácia terapêutica, facilidade de administração do medicamento e melhora na adesão do paciente ao tratamento (MANSURI et al., 2016).

Neste sentido, foram avaliadas as propriedades mucoadesivas dos HGs de goma de alfarroba em comparação ao HG-carbopol, um agente formador de gel frequentemente empregado devido à sua capacidade bioadesiva já conhecida (KUMAR, et al., 2014). Observando os resultados obtidos na Figura 15, verificou-se que os hidrogéis de goma de alfarroba HG-(PhSe)₂, HG-NCB e HG-NC(PhSe)₂ apresentaram maior capacidade mucoadesiva ($p < 0,01$) quando comparados ao hidrogel de carbopol, reforçando a escolha adequada da goma de alfarroba.

Figura 16- Representação gráfica da força mucoadesiva dos hidrogéis em mucosa vaginal bovina (média \pm desvio padrão, $n = 3$) (ANOVA de uma via, seguida de Tukey). (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$: diferença estatística entre Carbopol Ultrez e os demais hidrogéis. (#) $p < 0,05$ e (###) $p < 0,001$: diferença estatística entre HG-(PhSe)₂ e os demais hidrogéis. (@) $p < 0,05$: indica diferença estatística entre HG-NCB e HG-NC(PhSe)₂



Características estruturais da goma de alfarroba, como elevado peso molecular e presença de grupamentos carbonila, poderiam contribuir para uma maior interação com a mucosa (ASATI; JAIN; CHOUBEY, 2019; ZHU et al., 2019). Um maior acúmulo de polímero sobre a superfície biológica, onde unidades de cadeias poliméricas estão disponíveis para interagir com o tecido por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, fortaleceriam a aderência, contribuindo para a retenção da formulação (MANSURI et al., 2016).

Estudos anteriores investigaram o potencial bioadesivo de comprimidos de goma de alfarroba combinada com outras gomas para uso por via vaginal (CAZORLA-LUNA et al., 2019). Também se observou que os hidrogéis contendo as nanocápsulas apresentaram força mucoadesiva superior ao hidrogel livre ($p < 0,05$). Esses dados confirmam que a estratégia de combinar nanocápsulas mucoadesivas de Eudragit[®] RS100 com polímero formador de gel com propriedades mucoadesivas resultou em um hidrogel superior, com maior potencial de ser retido na mucosa vaginal. Outros estudos também apresentaram mucoadesão aprimorada para formulações contendo sistemas nanoestruturados (CHAVES et al., 2018; GARG et al., 2001; RIGON, et al., 2019).

Dessa forma, a goma de alfarroba mostra-se como um polímero mais promissor para a formação de HGs contendo suspensões de nanocápsulas para aplicação vaginal, a fim de se obter uma formulação que permaneça retida por mais tempo no local de aplicação.

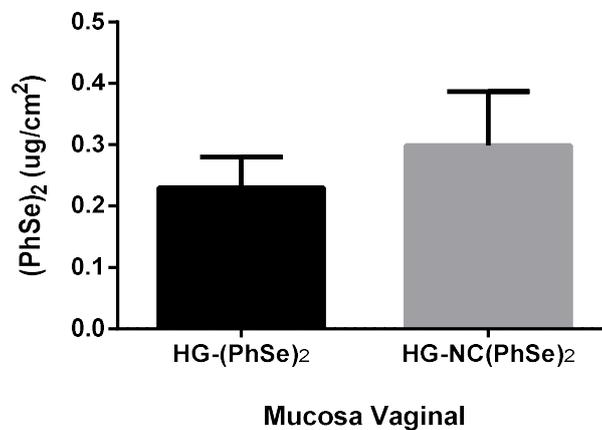
5.10 ESTUDO DE PERMEAÇÃO *EX VIVO* EM MUCOSA VAGINAL BOVINA

O estudo de permeação foi conduzido usando células de difusão do tipo Franz e mucosa vaginal bovina. Esta foi selecionada como substituta para tecidos humanos devido às

semelhanças anatômicas, fisiológicas e funcionais. Além disso, ambos os tipos de tecidos vaginais estão sob constante regulação hormonal cíclica pelos níveis plasmáticos de estrogênio e progesterona, que influenciam a espessura do epitélio vaginal, a taxa de secreção de muco e suas propriedades físico-químicas (BERGINC et al., 2012).

Observando os resultados mostrados na Figura 17, após 8 h de incubação, não foi detectado nenhuma concentração do ativo $(\text{PhSe})_2$ no meio receptor, estando presente somente na mucosa vaginal ($p < 0,05$) para ambos os hidrogéis HG- $(\text{PhSe})_2$ e HG-NC $(\text{PhSe})_2$.

Figura 17- Estudo de permeação em mucosa vaginal bovina (média \pm desvio padrão, $n = 6$) (teste t não pareado). $p > 0,05$: significa que não houve diferença estatística



Este resultado é promissor para uma aplicação local, pois é importante minimizar a absorção sistêmica do ativo, visto que o mesmo é sabidamente tóxico (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; ROSA et al., 2007). Quanto menos $(\text{PhSe})_2$ permear pela mucosa vaginal, mais o tratamento torna-se eficaz e menos efeitos sistêmicos são associados a ele (DE LIMA et al., 2017), principalmente levando-se em consideração que a tricomoníase é uma doença de caráter local, onde o parasita adere-se às células epiteliais da mucosa vaginal (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Além disso, o perfil de permeação obtido torna-se interessante em associação com a propriedade mucoadesiva apresentada pelos hidrogéis, a fim de prolongar o efeito do ativo quando administrado localmente (MANSURI et al., 2016; DE LIMA et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade da preparação de suspensões NC- (PhSe)₂, as quais apresentaram características físico-químicas adequadas, compatíveis com nanocarreadores para liberação de fármacos. Também, mostrou-se pela primeira vez a atividade *in vitro* anti-*T. vaginalis* do (PhSe)₂, da NC- (PhSe)₂, bem como sua atividade antioxidante aprimorada através da nanoencapsulação do ativo. Além disso, as suspensões mostraram-se mucoadesivas, devido a presença do polímero Eudragit[®] RS100 que interage com a mucosa vaginal.

O espessamento das nanocápsulas de (PhSe)₂ em goma de alfarroba, permitiu a formação de um hidrogel destinado à administração vaginal, com comportamento de fluxo não-newtoniano pseudoplástico e fator de espalhabilidade adequado para aplicação vaginal. A força mucoadesiva foi aprimorada para o ativo nanoencapsulado em comparação ao (PhSe)₂ livre, além de demonstrarem ser não-irritantes através do método da membrana corioalantóide. Os resultados do estudo de permeação mostraram que os hidrogéis desenvolvidos permaneceram na superfície da mucosa vaginal, o que é ideal para o tratamento de infecções vaginais superficiais, além de minimizar os riscos de absorção sistêmica do ativo livre, o qual apresenta toxicidade relevante.

Com base no número restrito de antiprotozoários disponíveis, resistência ao tratamento e consequentes efeitos adversos, o hidrogel desenvolvido pode ser considerado uma alternativa promissora para o tratamento da tricomoníase.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, C.; NYIRJESY, P. Management of resistant trichomoniasis. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 9, p. 1-7, 2019.

ALMEIDA, J. S. et al. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin american journal of pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 165–172, 2009.

ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. In: **Série Qualidade em Cosméticos**. v.1, p. 52, 2004.

ARPA, M. D. et al. New therapeutic system based on hydrogels for vaginal candidiasis management: formulation–characterization and in vitro evaluation based on vaginal irritation and direct contact test. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 10, p. 1238-1248, 2020.

ASATI, S.; JAIN, S.; CHOUBEY, A. Bioadhesive or mucoadhesive drug delivery system: a potential alternative to conventional therapy. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4-A, p. 858-867, 2019.

AKKAYA, N. E. et al. New biocompatible antibacterial wound dressing candidates; agar-locust bean gum and agar-salep films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.155, p. 430–438, 2020.

AHMAD, S. et al. A review on latest innovations in natural gums based hydrogels: Preparations & applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 136, p. 870-890, 2019.

BADULESCU, O. V. et al. Assessment of Hematological Toxicity in Case of Oral Administration of Metronidazole. **Revista de chimie**, v. 67, n. 6, p. 1137-1139, 2016.

BANSIL, R; TURNER, B. S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2-3, p. 164-170, 2006.

BARBOSA, N. B. V. et al. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chemico-biological interactions**, v. 163, n. 3, p. 230-238, 2006.

BARAK, S.; MUDGIL, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications—A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 66, p. 74-80, 2014.

BARBOSA, N. B. D., et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Archives of Toxicology**, 82(9): 655-663, 2008.

BALDISSERA, M. D. et al. Diphenyl diselenide dietary supplementation protects against fumonisin B1-induced oxidative stress in brains of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 231, p. 108738, 2020.

BALESTRIN, L. A. et al. Protective effect of a hydrogel containing Achyrocline satureioides extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 269-276, 2016.

BENCHIMOL, M. et al. Trichomonas foetus: ultrastructure and cytochemistry of endocytosis. **Experimental parasitology**, v. 62, n. 3, p. 405-415, 1986.

BENCHIMOL, M.; BATISTA, C.; DE SOUZA, W. Fibronectin-and laminin-mediated endocytic activity in the parasitic protozoa Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 1990.

BERGINC, K. et al. Development and evaluation of an in vitro vaginal model for assessment of drug's biopharmaceutical properties: Curcumin. **AAPS pharmscitech**, v. 13, n. 4, p. 1045-1053, 2012.

BICCA O. B., F. et al. Diphenyl diselenide protects a *Caenorhabditis elegans* model for Huntington's disease by activation of the antioxidant pathway and a decrease in protein aggregation. **Metallomics**, v. 12, n. 7, p. 1142-1158, 2020.

BHOSALE, R. R. et al. Gomas e mucilagens naturais: uma revisão sobre excipientes multifacetados na ciência e pesquisa farmacêutica. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research** , v. 15, n. 4, pág. 901-912, 2014.

BHATTA, R. S. et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: in vitro and pharmacokinetics studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 432, n. 1-2, p. 105-112, 2012.

BORGHETTI, G. S., KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1- 7, 2006.

BOUCHEMAL, K; BORIES, C; LOISEAU, P. M. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 811-825, 2017.

BHAKTA, S. B.; MORAN, J. A.; MERCER, F. Neutrophil interactions with the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*: implications for immunity and pathogenesis. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 200192, 2020.

BRADIC, M. et al. Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genome of *Trichomonas vaginalis*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1658-1672, 2017.

CARVALHO, N. R. et al. New therapeutic approach: diphenyl diselenide reduces mitochondrial dysfunction in acetaminophen-induced acute liver failure. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81961, 2013.

CAZORLA-LUNA, R. et al. Dapivirine Bioadhesive Vaginal Tablets Based on Natural Polymers for the Prevention of Sexual Transmission of HIV. **Polymers**, v. 11, n. 3, p. 483, 2019.

CHAVES, P. 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.

COMASSETO, J. V. Selenium and tellurium chemistry: historical background. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2027-2031, 2010.

CONTRI, R. V. et al. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. **International journal of pharmaceutics**, v. 507, n. 1-2, p. 12-20, 2016.

COOK, M. T.; BROWN, M. B. Polymeric gels for intravaginal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 145-157, 2018.

CORDEIRO, T. et al. Biocompatible locust bean gum as mesoporous carriers for naproxen delivery. **Materials Chemistry and Physics**, v. 239, p. 121973, 2020.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 19(2): 99-134, 2002.

COVIELLO, T. et al. Gel-embedded niosomes: Preparation, characterization and release studies of a new system for topical drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 291-299, 2015.

COVIELLO, T et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of controlled release**, v. 119, n. 1, p. 5-24, 2007.

CHASSOT, F. et al. Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and-resistant strains of *Candida parapsilosis*. **New Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 301-303, 2016.

CUNHA, A. R. et al. Characterization of commercially available vaginal lubricants: a safety perspective. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 530-542, 2014.

DA SILVA, C. C. et al. Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 367-377, 2019.

DA SILVA, P. B. et al. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs—A review. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218-2243, 2014.

DA SILVA JÚNIOR, Walter F. et al. Alternative technologies to improve solubility and stability of poorly water-soluble drugs. In: **Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics**. Elsevier, p. 281-305, 2017.

DA ROCHA, J. T. et al. Effects of diphenyl diselenide on depressive-like behavior in ovariectomized mice submitted to subchronic stress: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology**, v. 222, n. 4, p. 709-719, 2012.

DAS NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, n. 1-2, p. 1-14, 2006.

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.

DENARDI, L. B. et al. Antifungal Activities of Diphenyl Diselenide alone and in Combination with Fluconazole or Amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 165-169, 2013.

DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 847, 2020.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, n. 3, p. 241-247, 2011.

DEEPTHI, S.; JOBIN, J. Novel hydrogel-based ocular drug delivery system for the treatment of conjunctivitis. **International Ophthalmology**, p.1-12, 2018.

DIAMOND, L. S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures, **Journal of Parasitology**, v. 43, p. 488–490, 1957.

DINGS DAG, S. A.; HUNTER, N. Metronidazol: uma atualização sobre metabolismo, estrutura-citotoxicidade e mecanismos de resistência. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, pág. 265-279, 2018.

DILLEN, K. et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit[®] RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 72-82, 2006.

DOLESKI, P. H. et al. Diphenyl diselenide modulates nucleotidases, reducing inflammatory responses in the liver of *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 4, p. 489-496, 2017.

DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.

DOS SANTOS, M. M. et al. Modulation of redox and insulin signaling underlie the anti-hyperglycemic and antioxidant effects of diphenyl diselenide in zebrafish. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 158, p. 20-31, 2020.

DOS SANTOS, A. M. et al. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 119867, 2020.

ENGLERT, A. V. et al. Diphenyl Diselenide and Clotrimazole Co-loaded into Eudragit® RS 100 Nanocapsules Formulation Has Superior Antioxidant Potential and Promising Anti-candida Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

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.

E SILVA FILHO, F. C.; ELIAS, C. A.; DE SOUZA, W. Further studies on the surface charge of various strains of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Cell Biophysics**, v. 8, n. 3, p. 161-176, 1986.

FAO/OMS. Report 7^a Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok. Thailand. **Human Vitamin and Mineral Requirements**, 2002.

FESSI, H et al. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European patent**, v. 274961, p. A1, 1988.

FERREIRA, L. M. et al. Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 91, p. 1, 2018.

FERREIRA, L. M. et al. Zebrafish exposure to diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules caused no behavioral impairments and brain oxidative stress. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 53, p. 62-68, 2019a.

FERREIRA, L. M. et al. Antitumor action of diphenyl diselenide nanocapsules: In vitro assessments and preclinical evidence in an animal model of glioblastoma multiforme. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 55, p. 180-189, 2019b.

FERREIRA, L. M. et al. Xanthan gum-based hydrogel containing nanocapsules for cutaneous diphenyl diselenide delivery in melanoma therapy. **Investigational new drugs**, p. 1-13, 2019c.

FERREIRA, L. M. et al. Design of Pegylated-Nanocapsules to Diphenyl Diselenide Administration: In Vitro Evidence of Hemocompatible and Selective Antiglioma Formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 8, p. 1-12, 2020.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3ª ed. Pharmabooks: São Paulo, 2008.

FIGUEROA-ANGULO, E. E. et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1411-1427, 2012.

FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623-639, 2015.

FULCO, B. C. W. et al. Diphenyl diselenide is as effective as Ebselen in a juvenile rat model of cisplatin-induced nephrotoxicity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 60, p. 126482, 2020.

GARG, A. et al. Spreading of semisolid formulations: an update. **Pharmaceutical technology**, v. 26, n. 9, p. 84-105, 2002.

GARG, S. et al. Properties of a new acid-buffering bioadhesive vaginal formulation (ACIDFORM). **Contraception**, v. 64, n. 1, p. 67-75, 2001.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, 74: 279-286, 2017.

GIORDANI, C. F. et al. Diphenyl diselenide-loaded nanocapsules: preparation and biological distribution. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 755-766, 2014.

GIULIANI, L.M. **Hidrogéis de goma de alfarroba contendo compostos indólicos nanoencapsulados com ação anti-inflamatória em desordens cutâneas induzidas em camundongos**. 2019. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2019.

GONJARI, I. D., et al. Formulation and evaluation of in situ gelling thermoreversible mucoadhesive gel of fluconazole. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 3, n.1, p. 6-9, 2009.

GUTERRES, S. S., et al. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, 2: 147-157, 2007.

HASHEMI, H. et al. Rapid differential diagnosis of vaginal infections using gold nanoparticles coated with specific antibodies. **Medical microbiology and immunology**, v. 208, n. 6, p. 773-780, 2019.

HADDARAH, Amira et al. The structural characteristics and rheological properties of Lebanese locust bean gum. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 204-214, 2014.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 103, n. 2, p. 301-313, 2005.

HECK, S. O. et al. Combined Therapy With Swimming Exercise and a Diet Supplemented With Diphenyl Diselenide Is Effective Against Age-Related Changes in the Hepatic Metabolism of Rats. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1574-1582, 2017.

HE, H. et al. κ -Carrageenan/locust bean gum as hard capsule gelling agents. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 417-424, 2017

HONIGBERG, B. M. Trichomonads found outside the urogenital tract of humans. In: **Trichomonads Parasitic in Humans**. Springer, New York, NY, p. 342-393, 1990.

HÜBNER, D. P. G. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 476-484, 2016.

ICCVAM. Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. **Appendix B3 of ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products**. NIH Publication n.10-7553, 2010.

IBRAHIM, M. et al. Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 54, p. 187-194, 2014.

INEU, R. P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, 46(9): 3023-3029, 2008.

ISO 10993-10 (2010). International Standard. **Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and skin sensitization**. <https://www.iso.org/standard/40884.html>

JANA, S. et al. Metal ion-induced alginate–locust bean gum IPN microspheres for sustained oral delivery of aceclofenac. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 47-53, 2015.

JANA, S.; SEN, K. K. Chitosan—Locust bean gum interpenetrating polymeric network nanocomposites for delivery of aceclofenac. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 878-884, 2017.

JAIN, K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 524-539, 2019.

KANG, J-W. et al. A new vaginal delivery system of amphotericin B: a dispersion of cationic liposomes in a thermosensitive gel. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 8, p. 637-644, 2010.

KAUR, R. et al. Preparation and characterization of biocomposite films of carrageenan/locust bean gum/montmorillonite for transdermal delivery of curcumin. **BioImpacts**, v. 9, n. 1, p. 37, 2019.

KISSINGER, P. Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.

KIM, Y-T. et al. Uma formulação de gel vaginal termossensível com HP γ CD para a liberação dependente do pH e solubilização de anfotericina B. **European Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 41, n. 2, pág. 399-406, 2010.

KHURANA, S.; SINGH, S. Human Trichomoniasis. In: **Infectious Diseases and Your Health**. Springer, Singapore, p. 99-111, 2018.

KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.

KRUKEMEYER, M. G. et al. History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 6, n. 6, p. 336, 2015.

KUMAR, K. et al. Bioadhesive polymers: novel tool for drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 274-283, 2014.

KÜNG, E.; FÜRNKRANZ, U.; WALOCHNIK, J. Chemotherapeutic options for the treatment of human trichomoniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 2, p. 116-127, 2019.

LAHA, B. et al. Smart karaya-locust bean gum hydrogel particles for the treatment of hypertension: Optimization by factorial design and pre-clinical evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 274-288, 2019.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visao Academica**, v. 11, n. 1, 2020.

LEE, S. M. et al. Recent advances in the discovery of novel antiprotozoal agents. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3886, 2019.

LEITSCH, D. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. **F1000Research**, v. 5, 2016.

LEITSCH, D. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. **Parasitology**, v. 6, p. 1-12, 2017.

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. 1549, 2018.

LIN, H.C. et al. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of psychiatric disorders in women: a nationwide population-based cohort study. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2019.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure–activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e572-e576, 2011.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MAITI, S. et al. Tailoring of locust bean gum and development of hydrogel beads for controlled oral delivery of glipizide. **Drug Delivery**, v. 17, n. 5, p. 288-300, 2010

MALLI, S. et al. In situ forming pluronic[®] F127/chitosan hydrogel limits metronidazole transmucosal absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 112, p. 143-147, 2017.

MALLI, S.; LOISEAU, P. M.; BOUCHEMAL, K. *Trichomonas vaginalis* Motility Is Blocked by Drug-Free Thermosensitive Hydrogel. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. 114-123, 2019.

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

MASHA, S. C. et al. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 95, n. 1, p. 36-42, 2019.

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.

MARINA, A. M. et al. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, n. sup2, p. 114-123, 2009.

MATTIAZZI, J. et al. 3, 3'-Diindolylmethane nanoencapsulation improves its antinociceptive action: Physicochemical and behavioral studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 295-304, 2019.

MAY, S. W. Selenium-based pharmacological agents: an update. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 11, n. 9, p. 1261-1269, 2002.

MENEZES, C. B.; FRASSON, A. P.; TASCA, T. Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial cell**, v. 3, n. 9, p. 404, 2016.

MENARD, J. P. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. **International journal of women's health**, v. 3, p. 295, 2011.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-16, 2003.

MERCER, F.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 683-693, 2018.

MIRZA, M. A. et al. A vaginal drug delivery model. **Drug delivery**, v. 23, n. 8, p. 3123-3134, 2016.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E., et al. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 80(1): 235-239, 2012.

MUGESH, G.; DU MONT, W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 2125-2180, 2001.

MÜLLER, S. G. et al. Diphenyl diselenide regulates Nrf2/Keap-1 signaling pathway and counteracts hepatic oxidative stress induced by bisphenol A in male mice. **Environmental research**, v. 164, p. 280-287, 2018.

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.

NIKAM, V. K. et al. Eudragit a versatile polymer: a review. **Pharmacology on line**, v. 1, n. 5, p. 152-164, 2011.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. BT. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055-2071, 2010.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. BT. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

NOGUEIRA, C. W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 29-37, 2003.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003b.

NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. BT. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of Toxicology**, p. 1-48, 2021.

OSMARI, B. F. et al. Gellan gum-based hydrogel containing nanocapsules for vaginal indole-3-carbinol delivery in trichomoniasis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, p. 105379, 2020.

OGBOLU, D. O. et al. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. **Journal of medicinal food**, v. 10, n. 2, p. 384-387, 2007.

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.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. et al. Testing vaginal irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 35, n. 4, p. 495-503, 2018.

PATEL, P.; PATEL, P. Formulation and evaluation of clindamycin HCL in situ gel for vaginal application. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 5, n. 1, p. 50, 2015.

PRASANTHI, N. L.; MANIKIRAN, S. S.; RAO, N. R.. Formulation and evaluation of bi-layered tablets of propranolol HCl by using gums. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 3, n. 2, p. 104-105, 2010

PETRIN, Dino et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

PITORRE, M. et al. Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases? **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 140-155, 2017.

PETRONILHO, F. et al. Diphenyl diselenide attenuates oxidative stress and inflammatory parameters in ulcerative colitis: a comparison with ebselen. **Pathology-Research and Practice**, v. 212, n. 9, p. 755-760, 2016.

PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 2, p. 87-101, 2007.

PERINELLI, D. R. et al. Chitosan loaded into a hydrogel delivery system as a strategy to treat vaginal co-infection. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 23, 2018.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

PRADINES, B. et al. Drug-free chitosan coated poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles are active against *Trichomonas vaginalis* and non-toxic towards pig vaginal mucosa. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 4, p. 1229-1236, 2015.

PRIGOL, M. et al. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. **Biological trace element research**, v. 150, n. 1, p. 272-277, 2012.

PRIGOL, M. et al. Diphenyl diselenide induces anxiolytic-like and sedative effects on the chick social separation-stress behavior. **Neuroscience letters**, v. 495, n. 2, p. 140-143, 2011.

PRIGOL, M. et al. Physicochemical and biochemical profiling of diphenyl diselenide. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 3, p. 885-893, 2013.

QUISPE, R. L. et al. Diphenyl diselenide protects neuronal cells against oxidative stress and mitochondrial dysfunction: involvement of the glutathione-dependent antioxidant system. **Redox biology**, v. 20, p. 118-129, 2019.

QUINLIVAN, E. B. et al. Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. **Sexually transmitted diseases**, v. 39, n. 9, p. 671, 2012.

QUINES, C. B. et al. Diphenyl diselenide elicits antidepressant-like activity in rats exposed to monosodium glutamate: A contribution of serotonin uptake and Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Behavioural brain research**, v. 301, p. 161-167, 2016.

RIGO, L. A. et al. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 1387-1391, 2012.

RIGO, L. A., et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 93: 11-17, 2015.

RIGON, C. et al. Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents effective anti-inflammatory action in a model of irritant contact dermatitis in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, p. 104969, 2019.

ROBINSON, S. C. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. **Canadian Medical Association Journal**, v. 86, n. 14, p. 665, 1962.

ROSA, S. G. et al. Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. **European journal of pharmacology**, v. 758, p. 64-71, 2015.

ROSA, S. G. et al. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters. **Physiology & behavior**, v. 155, p. 1-8, 2016.

RODRÍGUEZ-LUIS, O. E. et al. Effect of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) on *Trichomonas vaginalis* growth. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, n. 7, p. 4618-4622, 2017.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.

SANMARTÍN, C. et al. Selenium and clinical trials: new therapeutic evidence for multiple diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 30, p. 4635-4650, 2011.

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.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270-276, 2014.

SARI, M. H. M. et al. Nanoencapsulation potentiates the cutaneous anti-inflammatory effect of p, p'-methoxyl-diphenyl diselenide: Design, permeation, and in vivo studies of a nanotechnological-based carrageenan gum hydrogel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 153, p. 105500, 2020.

SARTORI, G. et al. Antiviral action of diphenyl diselenide on herpes simplex virus 2 infection in female BALB/c mice. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 7, p. 1638-1648, 2016.

SARTORI, G. et al. Diphenyl Diselenide Reduces Oxidative Stress and Toxicity Caused by HSV-2 Infection in Mice. **Journal of cellular biochemistry**, v. 118, n. 5, p. 1028-1037, 2017.

SAVIAN, A. L. et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v.47, p. 69-76, 2015.

SEÑA, A. C. et al. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. **Clinical infectious diseases**, p. 13-22, 2007.

SIES, H.; ARTEEL, G. E. Interaction of peroxy nitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1451-1455, 2000.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

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

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SINGH, V. K. et al. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 151-158, 2014.

SONG, H. O. et al. *Trichomonas vaginalis*: reactive oxygen species mediates caspase-3 dependent apoptosis of human neutrophils. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 59-65, 2008.

STEFANELLO, S. T. et al. Free radical scavenging in vitro and biological activity of diphenyl diselenide-loaded nanocapsules: DPDS-NCS antioxidant and toxicological effects. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 5663, 2015.

SZYMAŃSKA, E. et al. Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: in vitro and in vivo studies. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 387, 2018.

RAJAN, S. S. et al. Poly (ethylene glycol)(PEG)-lactic acid nanocarrier-based degradable hydrogels for restoring the vaginal microenvironment. **Journal of Controlled Release**, v. 194, p. 301-309, 2014.

TAN, H. W. et al. Selenium species: current status and potentials in cancer prevention and therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, p. 75, 2019.

TAKALKAR, D.; DESAI, N. Nanolipid gel of an antimycotic drug for treating vulvovaginal candidiasis—development and evaluation. **AAPS pharmscitech**, v. 19, n. 3, p. 1297-1307, 2018.

TAKEUCHI, H. et al. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 11, p. 1583-1594, 2005.

TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1065-1074, 2009.

VAN GERWEN, O. T. MUZNY, C. A. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. **F1000Research**, v. 8, 2019.

VANIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 29-41, 2013.

VERMA, A. et al. Locust bean gum in drug delivery application. In: **Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications**. Academic Press, p. 203-222, 2019.

VIEIRA, P.; TASCA, T.; EVAN S. W. Challenges and persistent questions in the treatment of Trichomoniasis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1249-1265, 2017.

WINTER, G. et al. In vivo PET/MRI Imaging of the Chorioallantoic Membrane. **Frontiers in Physics**, v. 8, p. 151, 2020.

WILSON, S. R. et al. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5936-5939, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008**. World Health Organization, 2012.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, S. et al. *Trichomonas vaginalis* infection-associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 228, p. 166-173, 2018.

YONG, J. WH et al. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144-5164, 2009.

YU, T. et al. Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 10, p. 1309-1322, 2011.

ZHANG, Z.F; BEGG, C. B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 4, p. 682-690, 1994.

ZHANG, Y. et al. Composite Thermoresponsive Hydrogel with Auranofin-Loaded Nanoparticles for Topical Treatment of Vaginal Trichomonad Infection. **Advanced therapeutics**, v. 2, n. 12, p. 1900157, 2019.

ZHU, Bao-Jie et al. Functional polysaccharides of carob fruit: a review. **Chinese medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2019.

ZIMMERMANN, E. S. et al. Mucoadhesive gellan gum hydrogel containing diphenyl diselenide-loaded nanocapsules presents improved anti-candida action in a mouse model of vulvovaginal candidiasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 167, p. 106011, 2021.