

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

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES  
NANOTECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA  
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Sara Saurin dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES  
NANOTECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA  
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**Sara Saurin dos Santos**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Letícia Cruz**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Scheila Rezende Schaffazick**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS  
PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

elaborada por  
**Sara Saurin dos Santos**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Letícia Cruz, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Paulo Vitor Farago, Dr. (UEPG)**

**Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 21 de agosto de 2012.

*Dedico esta realização a minha familia e ao Lucas,  
pelo amor e apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à minha família e ao Lucas pelo apoio incansável durante esses dois anos, a conclusão deste mestrado também é mérito de vocês. À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Agradeço à professora Letícia Cruz, que me aceitou como sua primeira mestranda, pela sua dedicação, disponibilidade, orientação, confiança e pelo aprendizado que me proporcionou durante este tempo. À minha co-orientadora Scheila Schaffazick, pela amizade e grandes ensinamentos científicos que me transmitiu. À minha “IC” querida, dedicada, interessada e amiga, que me ajudou muito nos experimentos, Alessandra Lorenzoni. Aos meus amigos e colegas de laboratório Luana, Janaíne Micheli, Juliane, Daniele, Fernanda, Letícia, Natháli, Maíra, Martina, Roberta, Felipe, Isabel, Mônica, Aline e Lauren pela ajuda, trocas de aprendizado, coleguismo e boas conversas. Não posso esquecer-me das boas risadas, do carinho e dos momentos de descontração que minhas amigas do Laboratório de Farmacotécnica me proporcionaram. Muito obrigada aos funcionários Rose, Paulo Ricardo, Renatinho e “tia” Iva pelos pedidos sempre atendidos e atenção que vocês me deram. Gostaria de agradecer também ao Prof. Dr. Sydney Alves e à sua aluna Laura pela parceria nos experimentos microbiológicos. À Profa. Dra. Andréa Adams por todo o apoio disponibilizado nos experimentos de fotodegradação e à Profa. Dra. Cristiane de Bona Silva, pelas análises no Zetasizer. À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres e à Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann da UFRGS pelas análises iniciais no Zetasizer. À CAPES e à FAPERGS pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

AUTORA: SARA SAURIN DOS SANTOS

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

CO-ORIENTADORA: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de agosto de 2012.

Este trabalho objetivou a preparação de suspensões de nanocápsulas contendo clotrimazol para o tratamento de infecções fúngicas vulvovaginais. Pela primeira vez, o óleo de coco virgem e os triglicerídeos de cadeia média foram empregados como núcleo oleoso de nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol. A metodologia analítica para a quantificação do fármaco nas nanopartículas foi desenvolvida e validada. O método mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto. A partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, as nanopartículas foram preparadas com sucesso em três concentrações diferentes de clotrimazol (1, 2 e 3 mg/mL). Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, diâmetro de partícula, índice de polidispersão, teor, eficiência de encapsulamento, potencial zeta e estabilidade frente ao armazenamento por 60 dias. A eficiência de encapsulamento foi próxima a 100%, o valor do potencial zeta foi positivo devido ao polímero catiônico empregado, valor de pH em torno de 5,6 e teores de fármaco próximos aos teóricos. A distribuição de tamanho foi nanométrica (140-200 nm), com índice de polidispersão menor que 0,2. As formulações apresentaram características físico-químicas adequadas e foram estáveis durante o armazenamento. Estudos de fotodegradação mostraram que o nanoencapsulamento melhorou a estabilidade do clotrimazol sob radiação UVC, em comparação com a solução do fármaco livre, após 14 horas de experimento. A liberação do fármaco *in vitro*, a partir da técnica de sacos de diálise, foi caracterizada como uma liberação prolongada sem efeito *burst*, que foi mediada por transporte anômalo e seguiu cinética de primeira ordem, independente do óleo utilizado. As suspensões foram capazes de diminuir a velocidade de liberação do clotrimazol nas 24 horas de experimento. A partir do método de microdiluição, procedeu-se a avaliação microbiológica *in vitro* das suspensões de nanocápsulas contra *Candida albicans* e *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Em combinação com o clotrimazol nas nanopartículas, os triglicerídeos de cadeia média apresentaram valores de CIMs semelhantes à solução metanólica contendo o óleo e o fármaco. Além de apresentar atividade antifúngica em solução, o óleo de coco não perdeu sua atividade após a incorporação na nanoestrutura e, em associação com o fármaco, apresentou maior inibição do crescimento microbiano do que as nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média com clotrimazol. Por fim, as suspensões nanoparticuladas foram incorporadas em hidrogéis contendo polímeros com propriedades mucoadesivas, Pemulen® e Pullulan, que apresentaram teor, pH e espalhabilidade adequados. As formulações desenvolvidas neste estudo representam alternativas promissoras para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: nanocápsulas, candidíase vulvovaginal, óleo de coco virgem, clotrimazol, hidrogéis.

## ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### DEVELOPMENT OF NANO-SCALE FORMULATIONS FOR THE TREATMENT OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS

AUTHOR: SARA SAURIN DOS SANTOS

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

CO-ADVISOR: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Place and Date of Defense: Santa Maria, August 21, 2012.

This work aimed the preparation of clotrimazole-loaded nanocapsule suspensions for vulvovaginal fungal infections treatment. For the first time, virgin coconut oil and medium chain triglycerides were used as an oil core of polymeric nanocapsules containing clotrimazole. The analytical method for quantification of this drug into nanoparticles was developed and validated. The method proved to be selective, linear, precise, accurate and robust. Using the method of interfacial deposition of preformed polymer, the nanoparticles were successfully prepared at three different concentrations of clotrimazole (1, 2 and 3 mg/mL). The physicochemical parameters measured were pH, particle diameter, polydispersity index, drug content, encapsulation efficiency, zeta potential and stability in storage during 60 days. The encapsulation efficiency was near to 100%, zeta potential was positive due to the cationic polymer employed, the pH was around 5.6 and drug contents were close to the theoretical values. The size distribution was nanometer (140-200 nm) with polydispersity index lower than 0.2. The formulations had adequate physicochemical characteristics and were stable during storage. Photodegradation studies have shown that the nanoencapsulation improved the stability of clotrimazole against UVC radiation compared to free drug solution after 14 hours of experiment. The *in vitro* drug release using the dialysis bag technique was characterized by a prolonged release. No *burst* effect was observed. Profiles are based on an anomalous transport and first order kinetics, regardless of the oil used. The *in vitro* microbiological test of nanocapsules suspensions was performed against *Candida albicans* and *Candida glabrata* susceptible and resistant to fluconazole by microdilution method. In combination with clotrimazole into nanoparticles, medium chain triglycerides was reported to have similar MICs of methanolic solution containing the oil and the drug. In addition to the antifungal activity in solution, coconut oil did not lose its activity after incorporation into the nanostructures and, in combination with drug, showed greater inhibition of microbial growth than the nanocapsules of medium chain triglycerides with clotrimazole. Finally nanoparticle suspensions were incorporated into hydrogels containing polymers with mucoadhesive properties, Pemulen<sup>®</sup> and Pullulan, which presented appropriate drug content, pH and spreadability. The formulations developed in this study represent promising alternatives for treatment of vulvovaginal candidiasis.

Keywords: nanocapsules, vulvovaginal candidiasis, virgin coconut oil, clotrimazole, hydrogels.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Estrutura química do clotrimazol ( $C_{22}H_{17}ClN_2$ ) ..... 24

### CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do clotrimazol em suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100

FIGURA 1 - Chemical structure of clotrimazole ..... 34

FIGURA 2 - UV Chromatogram ( $\lambda = 229$  nm) obtained from the analysis of sample solution (clotrimazole-loaded nanocapsules, a) and without the drug (blank nanocapsules, b), using the mobile phase methanol: water (90:10) ..... 36

### CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas catiônicas contendo clotrimazol

FIGURA 1 - Drug content (A), pH (B), particle size (C), polydispersity (D) and zeta potential (E) of clotrimazole-loaded nanoparticles, after preparation and after 60 days ..... 52

FIGURA 2 - Clotrimazole content of nanocapsules (NC-1), methanolic solution (CMS) and methanolic solution protected from UVC radiation (dark control) ..... 53

FIGURA 3 - *In vitro* clotrimazole release profiles from methanolic solutions (CMS-1 and CMS-3) and from nanocapsules (NC-1 and NC-3) ..... 54

FIGURA 1 – Drug content (A), pH (B), particle size (C), polydispersity index (D) and zeta potential (E) of clotrimazole-loaded nanocapsules, after preparation and after 60 days ..... 72

FIGURA 2- Clotrimazole content of nanocapsules (NC-1), methanolic solution (CMS) and methanolic solution protected from UVC radiation (dark control) ..... 73

FIGURA 3 - *In vitro* clotrimazole release profiles from methanolic solutions (CMS-1 and CMS-3) and from nanocapsules (NC-1 and NC-3) ..... 74

### CAPÍTULO 3: Preparação de hidrogéis inéditos contendo nanocápsulas para liberação vaginal do clotrimazol

FIGURA 1 - Representação gráfica das espalhabilidades dos hidrogéis (n=3) ..... 92

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do clotrimazol em suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100**

TABELA 1 - Precision test .....	37
TABELA 2 - Accuracy .....	37
TABELA 3 - Robustness .....	37

### **CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas catiônicas contendo clotrimazol**

TABELA 1 - Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions (n=3) .....	51
TABELA 2 - Parameters calculated by first order and power law models for clotrimazole-loaded nanocapsules and free-drug solutions .....	55
TABELA 3 - Minimum inhibitory concentration (MIC) values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of clotrimazole-loaded nanocapsules and controls against tested yeasts .....	56
TABELA 4 - FICI values of clotrimazole-loaded nanocapsules (NC-1) and methanolic solution of clotrimazole and medium chain triglycerides (TCM-CMS) .....	57

TABELA 1 - Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions .....	71
TABELA 2 - Parameters calculated by first order and Korsmeyer-Peppas models for clotrimazole-loaded nanocapsules and free-drug solutions .....	75
TABELA 3 - Minimum inhibitory concentration (MIC) values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of clotrimazole-loaded nanocapsules and controls against tested yeasts .....	76

### **CAPÍTULO 3: Preparação de hidrogéis inéditos contendo nanocápsulas para liberação vaginal do clotrimazol**

TABELA 1 - Valores de pH, teor (mg/g) e fator de espalhabilidade dos hidrogéis (n=3) ..	91
---	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>1.1 Objetivo geral</b> .....	16
<b>1.2 Objetivos específicos</b> .....	16
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>1.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos</b> .....	18
<b>1.2 Nanopartículas poliméricas e aplicação tópica contra microrganismos</b> .....	21
<b>1.3 Clotrimazol, atividade no tratamento de candidíase e desenvolvimento de formulações</b> .....	24
<b>1.4 Óleos vegetais em sistemas nanoestruturados</b> .....	27
<b>1.4.1 Óleo de coco</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 1 Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do clotrimazol em suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100</b> .....	31
<b>1.1 Apresentação</b> .....	32
<b>PUBLICAÇÃO 1: A Simple RP-HPLC Method for the Determination of Clotrimazole from Acrylic Nanocapsule Suspensions</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 2 Desenvolvimento de nanocápsulas catiônicas contendo clotrimazol ..</b>	39
<b>2.1 Apresentação</b> .....	40
<b>PUBLICAÇÃO 2: Eudragit® RS100 nanocapsules intended for the vaginal delivery of clotrimazole in vulvovaginal candidiasis</b> .....	42
<b>PUBLICAÇÃO 3: Coconut oil-core polymeric nanocapsules as innovative carriers for the treatment of vulvovaginal candidiasis</b> .....	62
<b>CAPÍTULO 3 Preparação de hidrogéis inéditos contendo nanocápsulas para liberação vaginal do clotrimazol</b> .....	82

<b>3.1 Apresentação .....</b>	<b>83</b>
<b>PUBLICAÇÃO 4: Hidrogéis inovadores à base de Pemulen<sup>®</sup>/Pullulan para aplicação vaginal: estudo preliminar da incorporação de nanocápsulas contendo clotrimazol .....</b>	<b>84</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>



## INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal é um distúrbio ocasionado pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras do gênero *Candida* na mucosa do trato genital feminino. Trata-se de uma infecção da vulva e da vagina, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal, bem como as mucosas digestiva e respiratória. Essas leveduras podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável ao seu desenvolvimento. Cerca de 80 a 90% dos casos são devidos a *Candida albicans* (SOBEL; FARO; FORCE, 1998; ADAD; LIMA; SAWAN, 2001; NAGLIK *et al.*, 2011).

Os antifúngicos imidazólicos, por seu largo espectro de ação e baixa toxicidade, são usados em um grande número de formulações para uso tópico e sistêmico. Dentre esses, o clotrimazol é um dos fármacos mais prescritos para o tratamento da candidíase vulvovaginal (SAWYER *et al.*, 1975; SOBEL, 2007). Seu mecanismo de ação está baseado na sua ligação com o ergosterol da membrana fúngica, fato que ocasiona alteração na permeabilidade celular promovendo, assim, a morte do microrganismo (KATZUNG, 2006; NAGLIK *et al.*, 2011). Com relação às formas farmacêuticas contendo clotrimazol, estão disponíveis no mercado óvulos, comprimidos e cremes para o tratamento local da candidíase (NYIRJESY *et al.*, 1997; SOBEL, 2007).

Apesar do tratamento tópico com clotrimazol constar entre as terapias mais usadas no combate à candidíase, a sua administração pela via vaginal apresenta algumas limitações, tais como sensação de ardência, irritação e erupção cutânea (SOBEL, 2007), bem como baixo tempo de residência do fármaco no local de aplicação, devido à elevada tendência de escape da formulação a partir da cavidade vaginal (NEVES & BAHIA, 2006). Considerando esses aspectos, torna-se relevante o desenvolvimento de uma formulação tópica para o clotrimazol que proporcione sua permanência por longos períodos e permita que o fármaco atue no local da infecção de maneira sustentada, tornando, assim, o tratamento mais eficaz.

Nas últimas décadas, as nanopartículas poliméricas tem-se destacado como sistemas carreadores de fármacos por conferirem vantagens importantes, tais como liberação controlada, vetorização terapêutica, proteção do fármaco e proteção de mucosas do contato com a substância ativa (RAVI KUMAR, 2000; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Essas nanoestruturas apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000 nm e diferem entre si de acordo com a composição qualitativa e organização em nível molecular (COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995). As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico

disposto ao redor de um núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas são sistemas matriciais nanoestruturados constituídos de polímero (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, as nanocápsulas, por apresentarem núcleo oleoso, sobressaem-se por terem maior capacidade de incorporação de fármacos, conferirem melhor proteção da substância ativa e diminuírem a liberação abrupta do fármaco (efeito *burst*) (COUVREUR *et al.*, 2002). Dentre os óleos empregados para constituir o núcleo das nanocápsulas, os triglicerídeos de cadeia média são os mais utilizados. Esses óleos sintético destacam-se, principalmente, pela sua biocompatibilidade e capacidade de solubilizar uma grande quantidade de fármacos lipofílicos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Atualmente, no preparo de sistemas nanoestruturados, o interesse por produtos de origem natural, principalmente vegetal, e pelo emprego de produtos biodegradáveis é crescente (ALMEIDA *et al.*, 2009). Nesse contexto, alguns trabalhos relatam o desenvolvimento de nanocápsulas utilizando diversos óleos de origem vegetal, tais como óleo de girassol (FRIEDRICH *et al.*, 2008), óleo de semente de uva e amêndoas doce (ALMEIDA *et al.*, 2009), castanha do Pará, oliva, rosa mosqueta e cenoura (CONTRI *et al.*, 2012).

Dentre as plantas oleaginosas de grande interesse econômico pode-se destacar o coqueiro, *Cocos nucifera* Linné (família Palmae). De seu fruto, o coco, é extraído um óleo de alto valor nutricional e farmacêutico (YONG *et al.*, 2009). Tradicionalmente, o óleo de coco é utilizado na indústria farmacêutica como emoliente, em bases de pomadas, xampus, sabonetes e sabonetes líquidos (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010). Embora ainda existam poucos relatos na literatura, alguns trabalhos indicam que esse óleo apresenta atividade antioxidante (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; MARINA *et al.*, 2009; DEBMANDAL; MANDAL, 2011) e antifúngica. (OGBOLU *et al.*, 2007; AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010; DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Dessa forma, a combinação de óleo de coco e clotrimazol em um sistema nanoestruturado poderia conduzir ao desenvolvimento de uma formulação com atividade antifúngica superior.

Considerando a potencialidade dos sistemas nanoestruturados em controlar a liberação e o transporte de princípios ativos, aliado a possibilidade de redução da irritação e sensação de ardência causada pelos fármacos imidazólicos, este trabalho foi conduzido no sentido de desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol, usando triglicerídeos de cadeia média ou óleo de coco como núcleo oleoso. Para tanto, o Eudragit® RS100, um polímero catiônico com potencial bioadesivo foi empregado nas preparações. Além disso, com o intuito de obter uma forma farmacêutica final para os sistemas nanoestruturados desenvolvidos, a

preparação de hidrogéis a partir de dois polímeros mucoadesivos, Pemulen<sup>®</sup> e Pullulan, foi estudada.

Finalmente, é relevante mencionar que, até o momento, não há relatos na literatura sobre a preparação de nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol, assim como não há registros da utilização do óleo de coco para constituir o núcleo das nanocápsulas. Além disso, a combinação de Pemulen<sup>®</sup> e Pullulan para obtenção de hidrogéis com propriedades mucoadesivas superiores é inédita.



## OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 contendo clotrimazol, usando triglicerídeos de cadeia média ou óleo de coco virgem, e preparar hidrogéis de Pemulen<sup>®</sup> e Pullulan para a incorporação dos nanocarreadores, visando à obtenção de uma forma farmacêutica final para o tratamento local da candidíase vulvovaginal.

### 1.2. Objetivos específicos

- Validar um método analítico para a determinação do clotrimazol em nanocápsulas poliméricas;
- Preparar, pelo método de deposição interfacial do Eudragit<sup>®</sup> RS100, nanocápsulas contendo clotrimazol, usando como núcleo oleoso óleo de coco virgem ou triglicerídeos de cadeia média;
- Caracterizar as formulações quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e estabilidade;
- Avaliar a fotoestabilidade do clotrimazol incorporado nos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVC;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do clotrimazol a partir dos sistemas nanoestruturados;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos sistemas nanoestruturados;
- Preparar géis a partir de Pemulen<sup>®</sup> e Pullulan contendo os nanocarreadores de clotrimazol;
- Caracterizar os géis quanto ao teor de clotrimazol, pH e espalhabilidade.



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos

Nanocarreadores são sistemas de tamanho submicrométrico de atual interesse farmacoterapêutico e dentre os principais estão as nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas lipídicas e lipossomas. Cada um com sua particularidade, esses nanosistemas são os principais componentes no mercado futuro da alta tecnologia biofarmacêutica (ALONSO, 2004; KIM; MARTIN, 2006). O interesse nas nanopartículas está relacionado com as propriedades de controle da liberação e direcionamento do fármaco ao alvo terapêutico, com consequente aumento da eficácia terapêutica. Esses sistemas são capazes de carrear os fármacos sem comprometer sua integridade, protegendo-os frente à degradação enzimática, química ou imunológica (RAVI KUMAR, 2000; ALONSO, 2004). Devido ao seu tamanho reduzido, essas partículas são capazes de permear as barreiras biológicas tendo potencial aplicação oftálmica (GUPTA *et al.*, 2010), tópica (FONTANA *et al.*, 2011), intravenosa (THOMAS *et al.*, 2011) e oral (PANDEY *et al.*, 2005). O nanoencapsulamento pode também levar à redução dos efeitos adversos como, por exemplo, a proteção das mucosas de efeitos lesivos induzidos pela administração de anti-inflamatórios não-esteróides (RAFFIN *et al.*, 2003).

A liberação de fármacos em seus respectivos receptores biológicos apresenta obstáculos que impedem que o princípio ativo das formulações convencionais alcance o local específico de ação devido a sua baixa estabilidade e o transporte limitado através dos epitélios. A especificidade entre o carreador e o local de ação pode ser aumentada por meio da preparação e composição da partícula. Sistemas nanoparticulados têm sido explorados para vetorização de fármacos em diversas vias de administração e podem proporcionar a liberação controlada de substâncias ativas, o que reduz a frequência de administração para manter os níveis terapêuticos (BARRATT, 2000; NIMESH *et al.*, 2006).

A partir dos diversos métodos de preparação obtêm-se sistemas com diferentes propriedades, podendo empregar-se diversos agentes terapêuticos por meio de uma adequada seleção de matérias-primas.

Os lipossomas representam a primeira geração de carreadores coloidais, sendo sistemas vesiculares formados a partir de bicamadas de membranas fosfolipídicas concêntricas em torno de um núcleo aquoso. A vantagem da presença dos fosfolipídios é de conferir um caráter anfifílico a essas partículas, podendo encapsular substâncias hidrofílicas

na cavidade aquosa interna ou hidrofóbicas na membrana da bicamada. Todavia, esse sistema apresenta algumas desvantagens, tais como alto custo de produção, dificuldades de transposição de escala e estabilidade físico-química limitada (GABRIELLE-MADELMONT; LESIEUR; OLLIVON, 2003; JOSHI; MÜLLER, 2008).

Além dos lipossomas, foram desenvolvidas as nanopartículas poliméricas e as nanopartículas lipídicas, estas últimas abrangem os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Além de possuírem as vantagens dos sistemas nanométricos, os CLN e as NLS apresentam baixa toxicidade, boa compatibilidade, capacidade de encapsulamento de fármacos hidrofóbicos, ausência de solvente orgânicos na preparação e, principalmente, facilidade em transposição de escala, a partir de métodos como homogeneização à alta pressão (JOSHI; MÜLLER, 2008; PARDEIKE; HOMMOS; MÜLLER, 2009).

Nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, dependendo do método de preparação, diferentes tipos de partículas podem ser obtidos. Nanocápsulas são estruturas vesiculares heterogêneas compostas por um núcleo oleoso ou aquoso confinado por uma parede polimérica, nas quais o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido no material polimérico. São formuladas na presença de tensoativo para assegurar a estabilização das partículas. Por sua vez, nanoesferas configuram-se como sistemas matriciais, nos quais o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

As nanocápsulas tem demonstrado serem sistemas adequados para a incorporação de fármacos lipofílicos devido ao núcleo, geralmente oleoso, compatível com a solubilidade do fármaco e ao uso de polímeros de natureza hidrofóbica. A parede polimérica pode ser uma proteção a mais aos fármacos lábeis e contra outros fatores externos, como luz, oxidação e hidrólise (OURIQUE *et al.*, 2008, ALMEIDA *et al.*, 2009, FONTANA *et al.*, 2009), em comparação às nanoemulsões, as quais são dispersões de gotículas oleosas estabilizadas por uma combinação de tensoativos, sem a presença do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Em 2009, um novo tipo de nanopartícula polimérica foi descrito na literatura chamada de nanocápsulas de núcleo lipídico produzidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Estas se caracterizam por apresentarem um núcleo composto por um lipídio sólido (monoestearato de sorbitano) disperso em um lipídio líquido (triglicérides de cadeia média) envolto por uma membrana polimérica, a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (JÄGER *et al.*, 2009).

As formulações de nanopartículas são caracterizadas a partir de métodos físico-químicos, sendo os seguintes parâmetros normalmente avaliados: pH, diâmetro médio e distribuição de tamanho das partículas, potencial zeta, concentração de fármaco associado às nanoestruturas (eficiência de encapsulamento) e cinética de liberação *in vitro*. Em geral, as partículas coloidais, após a preparação, apresentam o efeito Tyndall, um reflexo azulado resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão. Diferenças no pH durante o tempo de armazenamento podem sugerir a degradação polimérica ou oxidação de outros componentes da formulação, sendo uma informação importante quanto à estabilidade do sistema. A distribuição de tamanho de partículas é determinada a partir dos métodos de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e microscopia eletrônica (varredura ou transmissão), buscando-se uma distribuição de tamanho nanométrica e estreita da formulação. Os fatores que influenciam o tamanho das nanopartículas poliméricas são: a concentração e a natureza química do polímero, do fármaco, do óleo e do tensoativo, o método de preparação e a presença ou ausência do óleo (nanocápsula e nanoesfera) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Quando um sistema coloidal entra em contato com outro meio, adquire cargas de polaridade inversa formando uma bicamada de cargas. A diferença de potencial entre essas duas camadas é o potencial zeta. A caracterização da superfície das nanoestruturas reflete o potencial elétrico e é importante que o valor em módulo do potencial zeta seja diferente de zero, o que conduz a sistemas mais estáveis. Os fenômenos de instabilidade que normalmente ocorrem nesses sistemas são a união de partículas que podem levar à formação de aglomerados, causando uma variação no tamanho de partícula, cremagem ou sedimentação, que correspondem à migração de partículas para o topo e para fundo da suspensão, respectivamente, além da coalescência, que é um fenômeno irreversível (MENGUAL *et al.*, 1999; LEMARCHAND *et al.*, 2003). Para a determinação da eficiência de encapsulamento do fármaco nas nanoestruturas é necessário determinar a concentração de fármaco livre e associado por meio de uma técnica que consiste na centrifugação e separação das duas fases da nanodispersão. A quantidade de fármaco associado é a diferença entre o teor total e o teor livre, este último quantificado no ultrafiltrado (GUTERRES *et al.*, 2000).

De uma maneira geral, para os sistemas contendo fármacos, os experimentos de liberação *in vitro* podem prever o comportamento *in vivo* da substância ativa a partir dos nanocarreadores. A liberação do fármaco pode depender do polímero, podendo ocorrer relaxamento das cadeias poliméricas, erosão ou dissolução da matriz polimérica, para a subsequente difusão do fármaco ou pela combinação destes processos (SOPPIMATH *et al.*,

2001; CRUZ *et al.*, 2006). Além disso, a cinética de liberação do fármaco pode ser influenciada pela viscosidade do núcleo oleoso (CRUZ *et al.*, 2006). Alguns dos métodos utilizados para estes experimentos são as membranas de diálise, as células de Franz e os experimentos que envolvam ultracentrifugação ou ultrafiltração-centrifugação (GUPTA *et al.*, 2010; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Dentre os diversos métodos de preparação de nanocápsulas, destaca-se o método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1988). Essa técnica utiliza solvente orgânico miscível com a água, tensoativos de alto e baixo EHL, óleo, fármaco e polímero. Este último deve ser insolúvel tanto no óleo quanto na fase aquosa para a formação de uma estrutura vesicular. A fase orgânica é lentamente vertida na fase aquosa e, por meio da emulsificação espontânea, há a formação das vesículas e o polímero precipita na interface dos dois componentes imiscíveis com a retirada do solvente orgânico por evaporação à pressão reduzida. As nanocápsulas formadas por esse método apresentam tamanho médio entre 200 e 350 nm e alta eficiência de encapsulamento para fármacos lipofílicos (GUTERRES *et al.*, 2007b).

## **1.2 Nanopartículas poliméricas e aplicação tópica contra microrganismos**

O desenvolvimento de nanopartículas objetivando a administração tópica tem recebido atenção especial. Para que os sistemas nanoestruturados tenham aplicação segura, deve-se ter cuidado ao escolher os componentes da formulação. Por exemplo, os polímeros utilizados devem ser biocompatíveis e, se possível, biodegradáveis. Os sistemas nanométricos apresentam uma grande área superficial que os torna aptos para importantes aplicações tópicas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Além disso, apresentam algumas vantagens, como a liberação sustentada, suprindo a pele com o fármaco por um período prolongado de tempo com efeitos sistêmicos diminuídos (ALVES *et al.*, 2007). Entre os princípios ativos associados a esses sistemas estão os antimicrobianos.

Nanopartículas poliméricas e outros carreadores coloidais podem aumentar o efeito antimicrobiano sobre alguns microrganismos devido ao seu tamanho diminuído e por apresentarem capacidade de carrear o fármaco mais próximo do alvo de ação ou mesmo intracelularmente (MOHAMMADI *et al.*, 2011). De modo geral, as nanopartículas associadas a antimicrobianos promovem uma melhora nos índices terapêuticos, reduzem a toxicidade local sem perda da eficácia de ação em comparação com as formas farmacêuticas usuais.

Dillen e colaboradores, em 2006, formularam nanopartículas poliméricas a partir de Eudragit® RS100, RL100 e do copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo ciprofloxacina e avaliaram a sua atividade antimicrobiana por meio do método de microdiluição frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As nanopartículas mostraram atividade bactericida, independente do polímero e das proporções empregadas. Para ambas as bactérias, os resultados foram semelhantes. Considerando que o fármaco em solução apresentou concentração inibitória mínima igual ou inferior a das formulações preparadas, os autores concluíram que a incorporação da ciprofloxacina nas nanopartículas não acarretou em perda da sua atividade antimicrobiana.

Esmaeili e colaboradores (2007) formularam nanopartículas de PLGA contendo rifampicina a partir do método modificado de emulsificação/difusão do solvente. A avaliação antibacteriana dessas partículas foi feita pelo método de difusão em ágar utilizando-se três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina e *Bacillus subtilis*) e duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). As nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana contra os três microrganismos Gram-positivos, no entanto, nenhum efeito foi observado contra os Gram-negativos. Na determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra as bactérias Gram-positivas, as nanopartículas aumentaram em quatro vezes a atividade antimicrobiana da rifampicina contra o *S. aureus* resistente à meticilina. Isso se deveu a possível penetração das nanopartículas nas células bacterianas e a liberação do fármaco diretamente no local de ação.

O desenvolvimento, as características microbiológicas e a citotoxicidade de nanopartículas de poliacrilato com diferentes tipos de tensoativos foram estudadas por Garay-Jimenez e colaboradores em 2009. As formulações com tensoativos catiônicos apresentaram uma maior inibição do crescimento da *S. aureus* resistente à meticilina e citotoxicidade, provavelmente devido à interação com as membranas das células, que tem característica aniônica. As formulações contendo tensoativo não-iônico não demonstraram efeito antimicrobiano, entretanto, quando associadas a um antibiótico, as CIMs apresentaram-se relativamente baixas comparadas com as da solução do fármaco livre. Os autores atribuem o efeito antimicrobiano à presença do antibiótico em si, e não aos outros componentes da formulação.

Empregando a técnica de leitura de halos, Gupta e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade antimicrobiana de nanopartículas de PLGA contendo esparfloxacina para a aplicação oftálmica. Foram feitas leituras após 12 e 24 horas, comparando-se a formulação nanoparticulada e a comercial contra *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismo responsável

pela conjuntivite. Os resultados sugeriram que as nanopartículas, além de apresentarem uma maior eficácia antimicrobiana, mostraram-se eficazes e com efeito duradouro nas duas leituras. A cinética de liberação *in vitro* dessas partículas mostrou uma liberação inicial abrupta (efeito *burst*), seguida de uma segunda fase mais lenta e constante de liberação. Os autores consideraram esta característica interessante para o efeito antimicrobiano, pois o fármaco atinge uma concentração terapêutica inicial mínima e, após o efeito *burst*, o fármaco é liberado em uma velocidade menor e sustentada, o que mantém o efeito do fármaco sobre a bactéria testada.

Para Patel e colaboradores (2010), a provável explicação para as nanopartículas de PLGA contendo itraconazol desenvolvidas apresentarem melhor eficácia antimicrobiana que a solução de fármaco livre é que, uma vez que as nanopartículas são solúveis em água, o contato com os esporos de fungos sobre a superfície da placa ocorre em maior grau. Esse evento é também facilitado pelo tamanho reduzido de partícula, pois elas podem acumular-se na superfície da parede celular e se internalizar com maior facilidade em comparação com partículas de tamanhos maiores. Essas características podem auxiliar na liberação do itraconazol mais perto da superfície da célula, resultando numa rápida internalização do fármaco, ou pode ocorrer também a internalização celular da partícula, seguida pela liberação do itraconazol no citosol.

Mohammadi e colaboradores (2011) avaliaram, por meio da técnica de diluição seriada, a ação antimicrobiana de nanopartículas de PLGA contendo claritromicina contra *Staphylococcus aureus*. As nanopartículas apresentaram concentração inibitória mínima oito vezes menor do que a solução de fármaco livre e a mistura física dos componentes da formulação. Os autores atribuem esse melhor desempenho à aderência das nanopartículas às células bacterianas.

Nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões foram desenvolvidas a partir do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no trabalho de Flores (2011) pelos métodos de deposição interfacial do polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente. O perfil de inibição do crescimento da *Candida albicans* pelas nanoestruturas foi estudado durante 72 horas e demonstrou uma maior inibição e manutenção do crescimento do que os tratamentos controle. A suspensão de nanocápsulas apresentou um melhor desempenho antimicrobiano que a nanoemulsão, resultado atribuído à presença do polímero ao redor do óleo volátil, tornando-o todo disponível para manter o efeito inibitório.

### 1.3 Clotrimazol, atividade no tratamento de candidíase e desenvolvimento de formulações

O tratamento da maioria das micoses mucocutâneas superficiais pode ser feito com medicamentos tópicos. O clotrimazol (Figura 1), um antifúngico imidazólico, conhecido por ser muito eficaz, age pela inibição da síntese do ergosterol, causando dano estrutural e funcional ao fungo. Este fármaco é caracterizado por ser um pó branco, inodoro, insípido e sólido cristalino e seu nome químico é 1-[(2-clorofenil) difenilmetil]-1H-imidazol (BURGESS; BODEY, 1972; PRABAGAR *et al.*, 2007; HASHEM *et al.*, 2011). O clotrimazol tem amplo espectro de atividade antimicótica, é usado topicamente para dermatomicoses (*Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*) e infecções fúngicas da vagina, inibindo o crescimento e a multiplicação de células como leveduras, geralmente espécies de *Candida*, outros fungos e algumas bactérias (KATZUNG, 2006). Além disso, o estudo de Borhade e colaboradores em 2012 sugere que o clotrimazol tem ação *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, o agente etiológico da malária. Para o tratamento de vulvovaginites, o clotrimazol é usualmente administrado na forma de creme a 1% usando-se um aplicador, uma vez ao dia ao deitar-se (GINO-CANESTEN, BAYER).

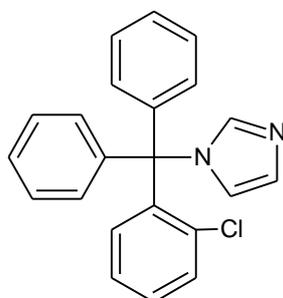


Figura 1- Estrutura química do clotrimazol (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>)

A candidíase vulvovaginal, causada por leveduras do gênero *Candida*, na maioria dos casos devido à *C. albicans*, caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de corrimento vaginal branco e espesso. Observa-se, geralmente, eritema vulvovaginal, que em casos mais graves pode estar acompanhado de escoriações e fissuras (ADAD; LIMA; SAWAN, 2001). As vulvovaginites são doenças sexualmente transmissíveis muito recorrentes, constituindo um problema para a mulher. As mais frequentes são a vaginose bacteriana e a vulvovaginite fúngica (SOBEL; FARO; FORCE, 1998).

Estima-se que 75% das mulheres sofrerão de candidíase pelo menos uma vez em suas vidas, enquanto que 40-50% apresentarão, no mínimo, dois episódios de infecção (ODDS, 1982; SOBEL; FARO; FORCE, 1998). A *Candida* pode também ser isolada no trato genital de cerca de 20% das mulheres em idade fértil em casos assintomáticos (SOBEL, 2007).

Os agentes antimicóticos tópicos para o tratamento da vaginite aguda por *Candida* estão disponíveis em forma de cremes, loções, sprays aerossóis, comprimidos vaginais, supositórios e tampões revestidos (KATZUNG, 2006). Porém, durante o tratamento com derivados imidazólicos, as mulheres relatam sensação de dor, irritação, ardência e aparecimento de erupções cutâneas, além de extravasamento da formulação e baixo tempo de residência no local de ação (SOBEL, 2007). Para que o tratamento tópico da candidíase seja eficaz, a formulação deve liberar o antifúngico de maneira sustentada ou residir no sítio de ação por um longo período de tempo (CHANG; OH; KONG, 2002).

O clotrimazol é praticamente insolúvel em água (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010), entretanto, a sua incorporação em nanopartículas poderia resultar em uma formulação aquosa contendo um fármaco lipofílico. Várias estratégias visam melhorar a eficácia terapêutica e aumentar a solubilidade do clotrimazol, entre elas a incorporação em comprimidos vaginais (KAST *et al.*, 2002), géis (SHAHIN *et al.*, 2011a; SHAHIN *et al.*, 2011b), lipossomas (PAVELIC; SKALKO-BASNET; JALSENJAK, 1999), complexação com ciclodextrinas (MEMISOGLU *et al.*, 2003, PRABAGAR *et al.*, 2007), nanoemulsões (BORHADE *et al.*, 2012) e nanopartículas lipídicas sólidas (SOUTO *et al.*, 2004).

Pavelic e colaboradores, em 1999, desenvolveram lipossomas contendo clotrimazol a partir de dois tipos de lipídios (fosfatidilcolina e distearoil fosfatidilcolina) e dois métodos de preparação (método de diluição do poliol e método do pró-lipossoma), com o objetivo de criar um novo sistema de liberação vaginal prolongada capaz de liberar o fármaco diretamente no sítio de ação. Os lipossomas preparados com a fosfatidilcolina e pelo método de diluição do poliol apresentaram tamanho de partícula menor (295 nm) e eficiência de encapsulamento maior (93,7%). No geral, os sistemas foram estáveis frente a diferentes valores de pH e em mucosa vaginal de vaca. Em 2005, os mesmos autores incorporaram lipossomas contendo clotrimazol e metronidazol em géis à base de Carbopol<sup>®</sup> para liberação intravaginal. A liberação *in vitro* foi conduzida mimetizando-se as condições vaginais e, após 24 horas, 30% do clotrimazol encapsulado ainda estava intacto no gel.

Com o mesmo objetivo de desenvolver uma formulação vaginal de liberação controlada, Kast e colaboradores (2002) desenvolveram um comprimido bioadesivo contendo clotrimazol a partir da quitosana, com o intuito de promover por mais tempo a liberação do

fármaco no sítio de ação em concentrações terapêuticas. Estes comprimidos apresentaram maior tempo de retenção e liberação controlada do clotrimazol, comparado com o grupo controle.

Shahin e colaboradores (2011b) utilizaram Pemulen<sup>®</sup> (TR1 e TR2) para preparação de géis com clotrimazol para liberação tópica. A incorporação do clotrimazol na base hidrofílica foi a partir da solubilização do fármaco no óleo de jojoba. As formulações apresentaram características reológicas apropriadas, porém a liberação do fármaco foi mais rápida do que a proporcionada pela pomada comercial.

Em um dos estudos associando clotrimazol a nanocarreadores, SOUTO e colaboradores (2004) desenvolveram NLS e CLN para liberação tópica do clotrimazol. As formulações foram estáveis por 90 dias a três temperaturas diferentes: 4 °C, 20 °C e 40 °C. Ao final do período da estabilidade, o diâmetro das partículas foi maior à temperatura de 4°C comparada com as mesmas formulações nas outras temperaturas, porém todas permaneceram com diâmetro menor que 300 nm. A eficiência de encapsulamento de 55 a 72% foi atribuída à elevada lipofilia do clotrimazol. A liberação do fármaco a partir das nanoestruturas foi prolongada por mais de 10 horas, sendo que as CLN apresentaram um perfil de liberação mais lento.

Pandey e colaboradores, em 2005, nanoencapsularam dois antifúngicos (clotrimazol e econazol) usando dois diferentes polímeros (PLGA e alginato) para aumentar a biodisponibilidade oral destas substâncias. As partículas com alginato apresentaram maior tamanho médio (235 nm) e eficiência de encapsulamento superior (clotrimazol =  $90 \pm 3\%$ , econazol =  $95 \pm 2,5\%$ ) que as de PLGA (tamanho médio = 217 nm; clotrimazol =  $48,33 \pm 5,21\%$ , econazol =  $52,27 \pm 3,80\%$ ). Os estudos de biodisponibilidade e farmacocinética demonstraram que os antifúngicos nanoencapsulados, após administração oral, foram detectados no plasma de camundongos de 3 a 5 dias (PLGA) até 6 dias (alginato), ao passo que as soluções do fármaco livre, após administração intravenosa, permaneceram no organismo por 3 a 4 horas. As formulações de alginato com ambos os fármacos apresentaram melhor resultado neste estudo pelo efeito mucoadesivo deste polímero, permanecendo por mais tempo liberando os fármacos na mucosa intestinal. Os resultados indicam que é possível obter uma liberação lenta e controlada destes antifúngicos a partir do nanoencapsulamento e aumentar a biodisponibilidade oral que é muito baixa ( $0,35 \mu\text{g/mL}$  para o clotrimazol e  $0,37 \mu\text{g/mL}$  para o econazol).

#### 1.4 Óleos vegetais em sistemas nanoestruturados

Diversos tipos de óleos são utilizados no preparo de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões, entre eles, destacam-se os triglicerídeos de cadeia média (TCM). Este óleo é amplamente utilizado devido a sua capacidade de solubilizar diversos tipos de fármacos e também, devido a sua biocompatibilidade (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

A escolha adequada do óleo é de fundamental importância para a formulação de nanocápsulas, quanto maior a afinidade do óleo com o fármaco, maior o percentual de encapsulamento e menor a tendência de problemas de instabilidade dos sistemas. Os óleos utilizados na preparação de nanocápsulas poliméricas possuem funções importantes, como solubilizar substâncias ativas, melhorar a estabilidade das formulações, aumentar a eficiência de encapsulamento e controlar a liberação do fármaco (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Esse importante componente da formulação de nanocápsulas, dependendo da quantidade, pode influenciar a estabilidade, o tamanho de partícula e a polidispersão devido a suas características hidrofóbicas, viscosidade ou tensão superficial. No caso das nanocápsulas poliméricas, o óleo deve ser compatível com a substância ativa e não deve interagir com o polímero (GUTERRES *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nesse contexto, os óleos de origem vegetal vem ganhando importância como matérias-primas alternativas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados e alguns estudos relatam sua utilização. Conforme descrito por Santos-Magalhães e colaboradores (2000), o óleo de soja e de girassol foram empregados na preparação de nanoemulsões (175 nm) e nanocápsulas de PLGA (180 nm), respectivamente, contendo penicilina, por meio do método de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado. As formulações apresentaram distribuição de tamanho nanométrico e características físico-químicas adequadas, porém no teste de estabilidade acelerada, a suspensão de nanocápsulas de óleo de girassol apresentou maior estabilidade do que as nanoemulsões de óleo de soja. Ourique e colaboradores, em 2008, utilizaram o óleo de girassol no preparo de nanocápsulas de PCL e nanoemulsões contendo tretinoína com o objetivo de aumentar a estabilidade deste fármaco fotolábil. O estudo demonstrou que as nanocápsulas e as nanoemulsões preparadas apresentaram tamanho de partícula de 222 e 227 nm, potencial zeta de -5,72 e -6,26 mV, respectivamente, e protegeram eficientemente o fármaco da fotodegradação.

Friedrich e colaboradores (2008) utilizaram o óleo de girassol com o objetivo de melhorar a eficiência de encapsulamento do fármaco dexametasona em nanocápsulas poliméricas. Para fins comparativos, o óleo triglicerídeos de cadeia média foi utilizado e três

diferentes concentrações de fármaco (1,0; 0,5 e 0,25 mg/mL). Não foi possível o preparo com a concentração mais alta de dexametasona e não houve diferença significativa entre os valores de distribuição de tamanho (227 a 253 nm) e eficiência de encapsulamento (80 a 90%) entre as formulações contendo óleo de girassol e triglicerídeos de cadeia média (0,5 e 0,25 mg/mL). O óleo não alterou a eficiência de encapsulamento do fármaco, porém, foi possível demonstrar a viabilidade do uso deste no preparo de tais nanopartículas.

Almeida e colaboradores (2009) elaboraram nanocápsulas de PCL e nanoemulsões a partir dos óleos de semente de uva e amêndoas doce, empregando a benzofenona-3, um fotoprotetor que foi usado como substância modelo. As nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo de semente de uva apresentaram menor tamanho de partícula (228 e 239 nm) e maior potencial zeta (8,22 e 8,88 mV) em módulo que as formulações com óleo de amêndoas doce (243 e 275 nm; 7,34 e 6,64 mV). Além disso, também foi realizado um estudo de fotodegradação da benzofenona-3 nestes sistemas nanoestruturados, a fim de avaliar a estabilidade frente à radiação UVC. O fotoprotetor foi eficientemente associado em ambos os sistemas nanoestruturados, independente do óleo vegetal utilizado, e houve proteção da benzofenona-3 frente à fotodegradação nestas formulações por sete dias. Mais tarde, em 2010, os mesmos autores desenvolveram nanocápsulas (124,3 nm) e nanoemulsões (124,2 nm) a partir do óleo de semente de uva empregando, desta vez, a rutina, um flavonoide com propriedades antioxidantes. As formulações levaram a um aumento na fotoestabilidade da rutina durante 30 minutos de exposição à radiação UV e demonstraram prolongar a atividade antioxidante da rutina em testes *in vitro*.

#### 1.4.1 Óleo de coco

O óleo de coco virgem é obtido do *Cocos nucifera* Linné (família Palmae) e tradicionalmente utilizado na indústria farmacêutica como emoliente, em bases de pomadas, supositórios, xampus, sabonetes e sabonetes líquidos e é rico em ácidos graxos de cadeia média (ROWE et al., 2009). O óleo de coco é muito importante para a economia de países como Indonésia, Filipinas e Índia, sendo este último responsável pela maior produção desse óleo no mundo. A medicina popular acredita que esse óleo possa curar ou auxiliar no tratamento de diversas doenças, com alguns efeitos comprovados pela literatura (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). O óleo de coco virgem demonstrou efeito cardioprotetor (NEVIN; RAJAMOHAN, 2005), repelente de insetos (SYLLA et al., 2003), antitrombótico (NEVIN; RAJAMOHAN, 2008), antiviral (ARORA et al., 2011), entre outros.

O óleo de coco apresenta-se como uma massa branca com ponto de fusão entre 23 e 26 °C e os principais ácidos graxos presentes são o ácido láurico (40-50 %) e o ácido mirístico (15-20 %) (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010). O óleo de coco virgem é obtido a partir de cocos frescos por meio do método úmido utilizando-se o leite de coco, extraído da prensagem da polpa do coco, evitando-se, assim, a utilização de solventes. O método de extração a partir do leite mais comum e de baixo custo envolve a desestabilização da emulsão por cremagem, floculação ou coalescência, seguida de centrifugação. Através do método de via úmida, foram desenvolvidas outras maneiras de obtenção do óleo de coco virgem. Além da centrifugação pode-se empregar a fermentação, a refrigeração seguida de descongelamento e processos enzimáticos. O óleo virgem não passa pelo processo de refino, branqueamento e desodorização, pois exigem altas temperaturas e tratamentos químicos que levam a alteração e perda dos constituintes biologicamente ativos. O óleo que passa por esses processos é chamado de copra (MARINA *et al.*, 2009b).

Em média, dois terços dos ácidos graxos do óleo de coco são triglicerídeos de cadeia média e, aproximadamente, 90% dos ácidos graxos do óleo de coco virgem são saturados. Comparando-se com outros óleos vegetais, o óleo de coco possui, aproximadamente, 4% de ácidos graxos insaturados (oleico, linolêico e linolênico), enquanto que o óleo palma, amendoim, milho, soja e linhaça contêm de 53 a 90% (GUARTE; MFIHLBAUER; KELLERT, 1996; MARINA *et al.*, 2009). O óleo de coco virgem, com este tipo único de ácidos graxos saturados de cadeia média, pode fornecer benefícios para a saúde, tais como proteção contra doenças cardíacas e acidente vascular cerebral, pois não tendem a ser armazenados, e sim usados como energia pelo organismo (NEVIN; RAJAMOHAN, 2008; ZAMIRI *et al.*, 2011).

O estudo de MARINA e colaboradores (2009) atribui o efeito antioxidante do óleo de coco virgem aos compostos fenólicos presentes, ao contrário do óleo refinado, que devido aos processos químicos do refino perde essa importante propriedade. O óleo de coco também é conhecido pela sua atividade antifúngica, porém existem poucos relatos na literatura comprovando este efeito (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). OGBOLU e colaboradores (2007) relataram que o óleo de coco foi mais ativo contra espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*) em relação ao fluconazol pela técnica de difusão em ágar. Os autores relataram que o óleo de coco pode ser usado no tratamento de infecções fúngicas em vista de novas espécies resistentes aos medicamentos convencionais. Por outro lado, o trabalho de AGARWAL e colaboradores (2010) mostrou

moderada efetividade desse óleo contra *Candida albicans* utilizando o método de diluição em ágar.

Bergsson e colaboradores (2001) testaram a susceptibilidade de *Candida albicans* frente a ácidos graxos e monoglicerídeos. Os resultados mostram que tanto o ácido cáprico quanto o láurico são ativos contra *C. albicans* e sugerem que estes podem ser úteis para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno ou outros que infectam a pele e mucosa, possivelmente em conjunção com terapia antibiótica durante um longo período de tempo. Cabe ressaltar que estes ácidos graxos são os mesmos que compõem o óleo de coco.

São poucos os relatos na literatura empregando este óleo em sistemas nanoestruturados. Lee e colaboradores (2008) prepararam NLS com diferentes quantidades de óleo de coco e curdlana para liberação tópica do ácido all-trans-retinóico (ATRA). Este fármaco é caracterizado pela baixa estabilidade química, por ser fotolábil e ter baixa solubilidade em água. Essas nanopartículas demonstraram-se potenciais carreadores para o ATRA, apresentando tamanho de partícula de 50 a 100 nm e eficiência de encapsulamento de 96 a 99%, proporcionando, inclusive, a fotoestabilidade do mesmo frente à luz UV. Após 5 horas de experimento, 82,9% do ATRA associado às nanoestruturas permaneceu intacto, enquanto que para a solução metanólica este valor ficou em 55%. A liberação *in vitro* do fármaco a partir das NLS foi avaliada em 4 °C e 37 °C. Considerando-se que a temperatura de fusão do óleo de coco é de 20 a 23 °C, o experimento foi conduzido com o óleo no estado sólido e líquido, respectivamente. Após 96 horas de liberação, observou-se que a temperatura influenciou na liberação do ATRA. Em 4 °C a liberação do fármaco foi de apenas 15%, enquanto que em 37°C, 60% do fármaco foi liberado.

Kang e colaboradores (2009) também formularam NLS (A/O/A), porém com três diferentes tipos de óleos: óleo de coco, óleo de jojoba e óleo de macadâmia incorporando um fármaco hidrofílico (éster peguilado do ácido lipoico). A formulação contendo apenas o óleo de coco apresentou maior eficiência de encapsulamento, com menor tamanho de partícula (220 nm) e liberação mais controlada do que os outros óleos.

**CAPÍTULO 1:** Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do clotrimazol em suspensões de nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100

---

## **CAPÍTULO 1:** Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do clotrimazol em suspensões de nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100

### **1.1 Apresentação**

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica requer a utilização de uma metodologia analítica validada que permita o doseamento do fármaco incorporado na formulação (AULTON, 2005). No entanto, em algumas situações, não há monografia da substância ativa descrita em compêndios oficiais, ou, ainda, os métodos relatados em artigos científicos não são aplicáveis à determinação do fármaco nas formulações em desenvolvimento. No caso do clotrimazol, alguns métodos de cromatografia e espectrofotometria têm sido relatados na literatura para a sua quantificação em diversas preparações farmacêuticas (ABDEL-MOETY *et al.*, 2002; ADLNASAB *et al.*, 2010, FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010). Entretanto, tentativas de utilizar tais métodos no doseamento do clotrimazol em nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 mostraram que estes, muitas vezes, careciam em especificidade ou sensibilidade. Além disso, as metodologias relatadas apresentam importantes desvantagens analíticas, como a utilização de solventes orgânicos de alto custo e de soluções tampão (PANDEY *et al.*, 2005, FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2010), longos tempos de retenção (GAGLIARDI *et al.*, 2003), além de apresentarem etapas laboriosas na preparação das amostras e das fases móveis.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar uma nova metodologia analítica para a quantificação do clotrimazol nas nanoestruturas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os resultados foram publicados no periódico *Latin American Journal of Pharmacy*.

**PUBLICAÇÃO 1:** A Simple RP-HPLC Method for the Determination of Clotrimazole from Acrylic Nanocapsule Suspensions

*Short communication* publicada no periódico Latin American Journal of Pharmacy

---

## A Simple RP-HPLC Method for the Determination of Clotrimazole from Acrylic Nanocapsule Suspensions

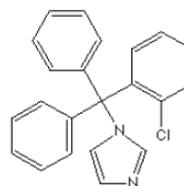
Sara S. SANTOS, Luana M. FERREIRA, Scheila R. SCHAFFAZICK & Letícia CRUZ\*

Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria,  
 Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil.

**SUMMARY.** A simple and fast HPLC method has been validated for the determination of clotrimazole in nanocapsule suspensions prepared from an acrylic polymer, Eudragit RS100®. Chromatographic runs were performed on a RP C18 column with a mobile phase comprising methanol and water (90:10, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min with UV detection at 229 nm. The method was shown to be specific, linear ( $r = 0.9987$ ), precise and accurate in a concentration range of 2.0-10.0  $\mu\text{g/mL}$ . The proposed method can be successfully used to quantify clotrimazole content in acrylic nanocapsule formulations, as well as to estimate drug encapsulation efficiency.

### INTRODUCTION

The imidazole antifungals, for its broad spectrum of activity and low toxicity, are employed in a large number of formulations for topical use. Among these, clotrimazole is one of the most prescribed drugs for the treatment of vulvovaginal candidiasis<sup>1,2</sup>. Clotrimazole, (1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-imidazole (Fig. 1), is a white or pale yellow crystalline powder practically insoluble in water but soluble in ethanol and in methylene chloride<sup>3</sup>. It is an inhibitor of ergosterol biosynthesis and a broad-spectrum antimycotic agent effective against pathogenic dermatophytes, yeasts and several species<sup>1,2</sup>. Topical treatment with this drug is safe and well tolerated, although some patients report a burning sensation, irritation and rash<sup>2</sup>. For the topical treatment of candidiasis to be effective, the formulation should release the drug in a sustained manner or reside in the site of action for a long period of time. In this sense, the development of a suitable topical



**Figure 1.** Chemical structure of clotrimazole.

delivery system containing clotrimazole from the appropriate raw materials, could promote a prolonged release of the drug at the site of infection, thereby making the treatment effective.

Polymeric nanocapsules are colloidal drug carriers which have been extensively studied for controlled release with consequent increase in therapeutic efficacy and reduced side effects<sup>4</sup>. This delivery system is formed by a polymer shell wrapped around an oily core, where the drug can be dissolved in this core and/or adsorbed at polymer wall<sup>5</sup>. In this context, Eu-

**KEY WORDS:** Clotrimazole, HPLC, Validation.

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* leticiacruz@smail.ufsm.br

dragit RS100® is an acrylic polymer frequently employed due its sustained release and bioadhesive properties.

Although nanoencapsulation is considered a promising approach for clotrimazole delivery, there is no report in the literature about the development of polymeric nanocapsules containing the referred drug. In this way, studies on the development of Eudragit RS100®-based nanocapsules containing clotrimazole are in progress in our laboratory.

Some methods of chromatography and spectrophotometry<sup>6,7</sup> had been reported in the literature to quantify clotrimazole in several pharmaceutical preparations<sup>3,8,9</sup>. However, most reported methods are laborious, employ expensive organic solvents such as acetonitrile, buffer solutions<sup>3,10,11</sup> and present a long retention time<sup>12</sup>, factors that are not convenient when a quick and simple analysis is looking for. Moreover, it is noteworthy that most of these methods are not applicable to the determination of clotrimazole-loaded nanocapsules, thereby being required to validate a new analytical method suitable for the assay of the nanostructured drug.

Taking all of this into account, the aim of this work was to validate a simple RP-HPLC method for the assay of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions. The experiments were conducted in accordance with the International Conference Harmonization (ICH) guidelines<sup>13</sup> parameters.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Clotrimazole (99.22 %, w/w) was obtained from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Eudragit RS 100® (Röhm Pharma, Germany) was kindly donated by Almapal (São Paulo, Brazil). Span 80® (sorbitan monooleate) was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Tween 80® (polysorbate 80) was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Medium chain triglycerides mixture was obtained from Brasquim (Porto Alegre, Brazil). HPLC-grade methanol was acquired from Tedia (São Paulo, Brazil). All other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

### Apparatus and chromatographic conditions

The experiments were performed on a Shimadzu LC-10A HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an UV-

VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller, and a Rheodyne valve sample manual injector with 20 µL loop. Separation was achieved using a RP C<sub>18</sub> Phenomenex column (250 mm x 4.60 mm, 5 µm; 110 Å) at room temperature. The isocratic mobile phase consisted of methanol and water (90:10 v/v) at flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 20 µL, and the detection was performed at 229 nm. The peak areas were integrated automatically by computer employing a Shimadzu LC solution software program. For protect the analytical column, a guard column (SecurityGuard C18 4 x 3.0 mm) was used. A photodiode array (PDA) detector was employed to select the wavelength.

### Preparation of nanocapsule suspensions

Clotrimazole-loaded nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method as described by Fessi *et al.*<sup>14</sup>. A solution of Eudragit RS 100® (0.100 g), clotrimazole (0.010 g), medium chain triglycerides (0.300 g) and sorbitan monooleate (0.077 g) in acetone (27 mL) was added into an aqueous solution (53 mL) of polysorbate 80 (0.077 g) under magnetic stirring at 40 °C. After 60 min, the acetone was eliminated and the aqueous phase concentrated under reduced pressure. The final volume was adjusted to 10 mL. The sample was named NC-CTZ. Another formulation was also prepared omitting the drug, which was called NC-B (blank nanocapsules).

### Preparation of standard solutions

A stock standard solution of 1.0 mg/mL of clotrimazole was prepared by accurately weighing 25 mg of drug, transferring to 25 mL volumetric flask and making up to volume with methanol. This solution was further diluted to prepare five different standard solutions ranging to 2.0-10.0 µg/mL, which were used in the linearity study. The resultant solutions were filtered (regenerated cellulose membrane, 0.45 µm) before being injected into the HPLC system.

### Preparation of sample solutions

For the determination of drug content and evaluation of the validation parameters the suspensions were diluted with methanol and sonicated for ten minutes to extract the drug. Then, the sample was filtered through a 0.45 µm regenerated cellulose membrane and injected into the HPLC system ( $n = 3$ ).

### Method validation

The method was validated according to the guidelines set on the ICH<sup>13</sup> for the validation of analytical procedures. The parameters which were used to validate the method of analysis were specificity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and robustness.

The specificity of the chromatographic method was evaluated by comparison of chromatograms of nanocapsule suspensions without drug (blank nanocapsules) and formulations containing clotrimazole in order to confirm that none of the excipients used in the preparation of nanocapsule suspensions interfered with the quantification of the drug. In order to assess the linearity of the method five concentration levels of clotrimazole (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0 µg/mL), in three replicates each, were analyzed in the chromatographic system. The calculation of regression line was employed by the method of least squares. The accuracy of the method was determined by the recovery test, by spiking nanocapsule suspensions of known concentrations with three different concentrations of standard solution (3.0, 5.0, and 7.0 µg/mL) corresponding to clotrimazole final concentrations of 5.0, 7.0, and 9.0 µg/mL ( $n = 3$ ; lower, medium, and high concentrations). The analyses were performed in triplicate in three different days. The repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day) were carried out by assaying six different samples at the same concentration (6.0 µg/mL;  $n = 12$ ), under the same experimental conditions, during the same day and in two different days, respectively. The relative standard deviation was calculated. Range was derived from linearity, accuracy, and precision studies. Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined based on the standard deviation of the response ( $\mu$ ) and the slope ( $S$ ) obtained for the calibration curves, where LOD and LOQ were  $3.3\sigma/S$  and  $10\sigma/S$ , respectively. The robustness of the chromatographic method was studied by deliberately varying the flow and composition of mobile phase. Samples were assayed in triplicate for each variation of the method conditions.

### Evaluation of encapsulation efficiency

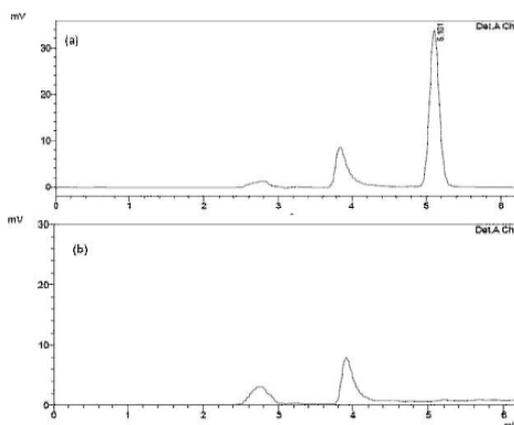
Free clotrimazole was separated from nanocapsules by ultrafiltration/centrifugation technique (Amicon® 10,000 MW, Millipore). Encapsulation efficiency (%) was determined from the difference between the total and the free

drug concentrations assayed in the nanocapsule suspension (drug content) and in the ultrafiltrate, respectively, using the HPLC method.

### RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary investigations about the detection wavelength and the composition of mobile phase were conducted to optimize the chromatographic conditions. The initial trials were carried out by using a mixture of methanol and water in three proportions (70:30, 80:20, and 90:10, v/v). Methanol was selected as organic modifier because it is much more cost-efficient than acetonitrile. The mobile phases were tested at flow rates of 0.8, 1.0, and 1.2 mL/min. Based on peak symmetry, peak width and run time, the mobile phase of methanol and water (90:10, v/v) at 1.0 mL/min of flow rate was considered satisfactory (theoretical plates = 7.793.950 and tail factor = 1.098). With the help of photodiode array the wavelength of 229 nm was selected considering the maximum absorbance and the best peak resolution. In contrast to other methods<sup>8,10</sup>, the proposed method avoids the use of buffers in the mobile phase, increasing the lifetime of the column and of the HPLC system, besides reducing the washing time due to the absence of buffer.

The retention time was 5 min (Fig. 2), being faster than that described in the United States Pharmacopoeia. This low retention time enables a quick determination of the drug, which is important for routine analysis. Consequently, the optimum chromatographic conditions described above were applied for all measurements.



**Figure 2.** UV Chromatogram ( $\lambda = 229$  nm) obtained from the analysis of sample solution (clotrimazole-loaded nanocapsules, **a**) and without the drug (blank nanocapsules, **b**), using the mobile phase methanol: water (90:10).

Regarding the validation of the analytical method, the specificity test showed that no interference from the constituents of nanocapsules in the drug peak was observed (Fig. 2). In addition, the purity of the clotrimazole peak was proven by analyzing the samples using a photodiode array (PDA). The PDA detector showed that the clotrimazole peak was free from any excipients peaks, with values of peak purity index higher than 0.9999, demonstrating that the proposed method is specific for the analyses of clotrimazole.

Considering the linearity evaluation, a linear relationship between the peak area and the concentration of clotrimazole was observed in a concentration range of 2.0-10.0 µg/mL. The average regression equation ( $n = 3$ ) was calculated by the method of least squares and found to be  $y = 42648x - 14382$  with a correlation coefficient of 0.9987. Analysis of variance (ANOVA) confirmed that the regression equation was linear ( $F_{\text{calculated}} = 2049.76 > F_{\text{critical}} = 4.96$ ;  $p < 0.5$ ).

The precision of the assay for clotrimazole nanocapsules at 6.0 µg/mL is displayed in Table 1. The experimental data showed an adequate

intermediate precision since the RSD values were lower than 2.8 %. In its turn, accuracy was evaluated by recoveries studies shown in Table 2. The obtained average recoveries for the three levels of concentration (low, medium and high) was found to be in the range 98-103 %. Thus, the proposed method was considered accurate.

The lowest concentration at which clotrimazole was detected (LOD) and quantified (LOQ) with acceptable precision and accuracy was 0.26 and 0.88 µg/mL, respectively.

Regarding the robustness, parameters such as the composition and flow rate of the mobile phase were deliberately varied in the narrow range compared to their optimal values. At first, a flow rate of 1.2 mL/min was tested, but the pressure of the system was too high (more than 160 kgf), what can cause damage to the column, to the chromatograph apparatus and to the peak profile. The variations on the flow rate showed a low change in the retention time of the sample. Satisfactory recoveries were observed when the proportion of the mobile phase was changed. The results are summarized in Table 3. In both cases, RSD values were lower than 3 %.

	Theoretical amount (µg/mL)	Experimental (µg/mL)	Recovery (%)	RSD* (%)
Day 1 (n=6)	6.00	6.10 ± 0.05	101.66	0.76
Day 2 (n=6)	6.00	6.39 ± 0.09	106.50	1.47
Mean ± SD	6.00	6.24 ± 0.17	104.07	2.78

Table 1. Precision test. \*RSD = Relative Standard Deviation.

Levels of concentration	Known sample (µg/mL)	Added (µg/mL)	Found (µg mL <sup>-1</sup> ) mean ± RSD*	Recovery (%) mean ± RSD*
Low	2.00	3.00	5.24 ± 0.19	98.27 ± 3.80
Medium	2.00	5.00	7.50 ± 0.32	102.18 ± 4.32
High	2.00	7.00	9.65 ± 0.45	103.37 ± 4.76

Table 2. Accuracy. \*RSD = Relative standard deviation.

	Clotrimazole (%)	RSD* (%)	Retention time (min)	Peak area
Recommended conditions	101.01	0.32	5.01	250123
Mobile phase				
95:05	101.82	2.51	4.42	254665
85:15	101.52	3.02	6.17	253936
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )				
0.90	100.86	0.13	5.69	252270
1.10	96.44	2.75	4.68	241222

Table 3. Robustness. \*RSD = Relative standard deviation.

SANTOS S.S., FERREIRA L.M., SCHAFFAZICK S.R. & CRUZ L.

The proposed method was applied to determine the clotrimazole content in acrylic nanocapsule suspensions. The experimental concentration of the drug in the formulation was according to the theoretical concentration (1.0 µg/mL) with a low RSD value from the triplicate analysis. Another important concern in the development of nanostructured systems is to estimate the drug encapsulation efficiency due to the possibility of drug partition into aqueous phase during the formation of nanocapsules<sup>5</sup>. For clotrimazole-loaded Eudragit RS100® nanocapsules the encapsulation efficiency was up 99 %, which can be explained by the lipophilic nature of clotrimazole.

### CONCLUSIONS

The proposed RP-HPLC method was found to be simple, fast, accurate and precise, therefore suitable for the analysis of clotrimazole-loaded Eudragit RS100® nanocapsules.

**Acknowledgments.** We thank FAPERGS and CAPES for financial support.

### REFERENCES

1. Sawyer, P.R., R. N. Brogden & R.M. Pinder (1975) *Drugs* **9**: 424-47.
2. Sobel, J.D. (2007) *Lancet* **369**: 1961-71.
3. British Pharmacopeia (2010) British Pharmacopeia Commission, Londres: Her Majesty Stationary Office; v.1,.
4. Mora-Huertas, C.E., H. Fessi & A. Elaissari (2010) *Int. J. Pharm.* **385**: 113-42.
5. Schaffazick, R.S., L.L. Freitas, A.R. Pohlmann & S.S. Guterres (2003) *Quim. Nova* **25**: 726-37.
6. Khashaba, P.Y., S.R. El-Shabouri, K.M. Emara & A.M. Mohamed (2000) *J. Pharmaceut. Biomed.* **22**: 363-76.
7. Osama, H. A. & Y.K. Pakinaz (1993) *Talanta* **40**: 1289-94.
8. Abdel-Moety, E.M., F.I. Khattab, K.M. Kelani & A.M. AbouAl-Alamein (2002) *Il Farmaco* **57**: 931-8.
9. Hajkova, R., H. Sklenarova, L. Matysova, P. Svecova & P. Solich (2007) *Talanta* **73**: 483-9.
10. Pandey, R., Z. Ahmad, S. Sharma & G.K. Khuller (2005) *Int. J. Phar.* **301**: 268-76.
11. Borhadea, V., S. Pathakb, S. Sharmab & V. Patravale (2012) *Int. J. Phar.* Article in press.
12. Gagliardi, L., D. Orsi, P. Chimenti, R. Porra & D. Tonelli (2003) *Anal. Sci.* **19**: 1195-7.
13. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Steering Committee: Geneva.
14. Fessi H., F. Puisieux, J-Ph. Devissaguet, N. Ammoury & S. Benita (1989) *Int. J. Pharm.* **55**: R1-4.

**CAPÍTULO 2:** Desenvolvimento de nanocápsulas catiônicas contendo clotrimazol

---

## CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de nanocápsulas catiônicas contendo clotrimazol

### 2.1 Apresentação

Em continuidade à validação da metodologia analítica de determinação do clotrimazol, no presente capítulo será abordado o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo o antifúngico visando futuras aplicações no tratamento de infecções fúngicas vulvovaginais. Para tanto, o Eudragit<sup>®</sup> RS100, um copolímero contendo unidades de metacrilato de alquilamônio, foi selecionado para constituir o invólucro polimérico das nanocápsulas. Esse polímero é normalmente empregado para obtenção de formas farmacêuticas de liberação sustentada devido a sua insolubilidade nos meios fisiológicos, independente do pH (ROWE *et al.*, 2009). Além disso, pelo fato de possuir grupos funcionais com amônio quaternário, o Eudragit<sup>®</sup> RS100 é catiônico, o que pode levar à obtenção de nanopartículas mucoadesivas devido a potencial interação destas com o muco, que é carregado negativamente (DILLEN *et al.*, 2008).

Além do polímero, outro componente que foi selecionado criteriosamente para a preparação das nanocápsulas de clotrimazol foi o óleo constituinte do núcleo desta estrutura vesicular. Para tanto, dois óleos foram empregados neste trabalho. Os triglicerídeos de cadeia média são de origem sintética e amplamente empregados na preparação de nanocápsulas devido, principalmente, à biocompatibilidade e elevada capacidade em solubilizar fármacos lipofílicos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Por outro lado, o emprego de óleos de origem vegetal para a preparação de nanocápsulas vem mostrando crescimento nos últimos anos (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; FRIEDRICH *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; KANG *et al.* 2009; CONTRI *et al.*, 2012). Neste contexto, a preparação de nanocápsulas à base de óleo de coco virgem pode ser considerada uma abordagem interessante, visto que este se destaca por suas atividades antioxidante e antifúngica (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; OGBOLU *et al.*, 2007; MARINA *et al.*, 2009; AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010; DEBMANDAL; MANDAL, 2011)

Frente ao exposto, o capítulo 2 desta dissertação compreende dois artigos. O primeiro versa sobre a preparação inédita de nanocápsulas poliméricas a partir do Eudragit<sup>®</sup> RS100, contendo clotrimazol, utilizando os triglicerídeos de cadeia média como núcleo oleoso, o qual será submetido para a publicação no periódico Materials Science and Engineering: C -

Materials for Biological Applications. Por sua vez, o segundo artigo trata do desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo como núcleo o óleo de coco virgem, visando aliar as potencialidades antifúngicas do referido óleo e do clotrimazol, o qual será submetido para publicação no periódico *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Ambos os sistemas preparados foram avaliados quanto às suas características físico-químicas, estabilidade em 60 dias, fotoestabilidade do clotrimazol, perfil de liberação *in vitro* por difusão em sacos de diálise e atividade antifúngica *in vitro* pela técnica de microdiluição.

**PUBLICAÇÃO 2:** Eudragit<sup>®</sup> RS100 nanocapsules intended for the vaginal delivery of clotrimazole in vulvovaginal candidiasis

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Materials Science and Engineering: C

---

## **Eudragit<sup>®</sup> RS100 nanocapsules intended for the vaginal delivery of clotrimazole in vulvovaginal candidiasis**

*Sara S. Santos<sup>a</sup>, Alessandra Lorenzoni<sup>a</sup>, Luana Mota Ferreira<sup>a</sup>, Andréa Inês Horn Adams<sup>a</sup>,  
Laura B. Denardi<sup>b</sup>, Sydney H. Alves<sup>b</sup>, Scheila R. Schaffazick<sup>a</sup>, Letícia Cruz<sup>a\*</sup>*

*<sup>a</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.*

*<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.*

\* Corresponding author

## **Abstract**

Clotrimazole is a common choice for the treatment of vulvovaginal infections, but its low solubility and some side effects pose a challenge to its application. This work evaluated the feasibility to formulate clotrimazole-loaded cationic nanocapsules using Eudragit® RS100 and medium chain triglycerides as polymer and oily core, respectively, by the method of interfacial deposition of a preformed polymer. The physicochemical characteristics of nanocapsule formulations were evaluated after preparation and after 60 days. Particle size, zeta potential, polydispersity index, pH and drug content were stable during this period. In addition, nanocapsules were able to protect clotrimazole from photodegradation under UVC radiation. By the dialysis bag diffusion technique, the nanosized formulations showed prolonged release of clotrimazole by anomalous transport and first order kinetics. A microbiological study was carried out by the microdilution method and showed that nanocapsules (mean size: 144 nm; zeta potential: + 12 mV) maintained the antifungal activity of clotrimazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains susceptible and resistant to fluconazole.

**Keywords:** nanocapsules; clotrimazole; Eudragit® RS100; *Candida*; antifungal activity; stability

## 1 Introduction

Clotrimazole is a broad-spectrum low toxic antifungal imidazole derivative that can be used topically to treat fungal infections, especially in the vaginal tract [1-3]. In this context, vulvovaginitis is a sexually transmitted disease caused by *Candida* species and is considered a recurring gynecological problem. It is estimated that 75% of women suffer from candidiasis at least once in their lives, while 40-50% experience at least two episodes [4, 5]. For the management of vulvovaginitis, clotrimazole is usually administered by the vaginal route as a cream, gel, ovules and pessaries, once daily at bedtime [6]. However, this type of treatment is associated with some drawbacks such as mucosal irritation, leakage of the formulation and low residence time at the vaginal cavity [7]. Besides, clotrimazole is a poorly water-soluble drug, which affects its local absorption [8]. As reported in the literature, bioadhesive formulations such as tablets [7], gels [8-13], and nanostructured carriers as liposomes [14-16], cyclodextrins [17] and microemulsion [18] were developed in order to increase the residence time of the dosage form and/or to enhance local bioavailability. Although there are studies showing the incorporation of clotrimazole into nanosized systems, as far as we know, there is no report in the literature on the development of polymeric nanocapsules containing this antimycotic. It should be noted that there is one study about the development of clotrimazole-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, but it did not focus on the vaginal delivery of the drug [19] and its microbiological activity. Furthermore, nanospheres prepared from polylactide-co-glycolide or alginate were able to improve clotrimazole bioavailability in mice [20].

Concerning drug delivery systems, in the last decades has increased the number of studies devoted to their development, especially polymeric nanoparticles [21]. These nanostructures have dimensions between 10 and 1000 nm and differ as to qualitative composition and organization at molecular level [22]. Nanocapsules are formed by a polymer shell surrounding a lipophilic or hydrophilic liquid core, while nanospheres are matrix systems [21]. In these systems, the drug is generally entrapped or dissolved within or adsorbed on the nanoparticles [23].

The raised interest in nanoparticles is because of their properties, as they can control drug release and transport to specific sites of action, with a consequent increase in therapeutic efficacy and a reduction of side effects. In addition, these systems are able to protect the drug against enzymatic, chemical/photochemical or immunological degradation [24-26]. Considering these advantages, the development of nanocapsule suspensions prepared from a bioadhesive polymer could be considered a promising strategy for the vaginal delivery of

clotrimazole, since such nanocarriers are able to prolong drug release, improve bioavailability, protect the mucosa from the topical irritant effects of the drug and enhance residence time in the vaginal cavity.

Thus, the aim of this work was to formulate, for the first time, clotrimazole-loaded nanocapsules prepared from Eudragit<sup>®</sup> RS100, a cationic polymer, and to characterize the formulations, as well as evaluate the stability of these systems (at room temperature and at UV radiation) and *in vitro* antifungal activity against *Candida* species.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials

Clotrimazole (99.22 %, w/w) was obtained from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Eudragit<sup>®</sup> RS100 (Röhm Pharma, Germany) was kindly donated by Almapal (São Paulo, Brazil). Span 80<sup>®</sup> (sorbitan monooleate) was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Tween 80<sup>®</sup> (polysorbate 80) was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Medium chain triglycerides mixture was obtained from Brasquim (Porto Alegre, Brazil). HPLC-grade methanol was acquired from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). All other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

### 2.2 Dissolution/Swelling experiments of polymer films

In order to verify a possible interaction between the polymer and the oil, films of Eudragit<sup>®</sup> RS100 were obtained from the solubilization of 2 g polymer in acetone and subsequent evaporation of this solvent at room temperature. Next, 100 mg films were weighed and kept submerged in the medium chain triglycerides for 60 days ( $n=3$ ). At predetermined intervals (days), the films were removed from the oil, carefully dried with absorbing paper, and weighed in an analytical balance. The percentage of weight variation was then calculated.

### 2.3 Preparation of nanoparticle suspensions

Nanocapsule suspensions were prepared by the interfacial deposition of a preformed polymer, according to the method described by Fessi [27]. Eudragit<sup>®</sup> RS100 (0.100 g) was solubilized in acetone (27 mL) in the presence of Span 80<sup>®</sup> (0.077 g), clotrimazole (0.01 or 0.02 or 0.03 g) and medium chain triglycerides (0.3 g). After 60 minutes under moderate magnetic stirring at 40°C this organic phase was added to an aqueous phase (53 mL) containing Tween 80<sup>®</sup> (0.077 g). The magnetic stirring was maintained for 10 min and then the organic solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve a final

volume of 10 mL and clotrimazole concentrations of 1.0 mg/mL (NC-1), 2.0 mg/mL (NC-2) and 3.0 mg/mL (NC-3). For comparison purposes, a nanosphere suspension was prepared by omitting the oil (NS-1) and a blank nanocapsule suspension (NC-B) was formulated by omitting the drug. The formulations were prepared in triplicate.

#### *2.4 Characterization of polymeric nanoparticle suspensions*

##### *2.4.1 Determination of pH*

The pH values of the suspensions were determined directly from the formulations using a previously calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) at room temperature.

##### *2.4.2 Particle size and zeta potential analysis*

The mean particle sizes and polydispersity indexes (PI - size distribution) were measured ( $n=3$ ) by photon correlation spectroscopy after dilution of an aliquot of nanoparticle suspension in purified water (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Zeta potential analyses ( $n=3$ ) were then performed in the same equipment after diluting the samples in a 10 mM NaCl solution (1:500).

##### *2.4.3 Determination of drug content*

Clotrimazole content was determined ( $n=3$ ) by HPLC using a previously validated method [28]. The preparation of the samples involved the dilution of an aliquot of the formulation in 10 mL methanol and its subsequent sonication for 10 min to extract the drug. Then, the samples were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  regenerated cellulose membrane and injected into the HPLC system. Chromatographic instruments and conditions were the following: LC-10A HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a Rheodyne valve sample manual injector with 20  $\mu\text{L}$  loop. Column: RP C<sub>18</sub> Phenomenex (250 mm x 4.60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; 110 Å); C<sub>18</sub> guard column; mobile phase: methanol and water (90:10 v/v); flow rate: 1 mL/min; wavelength: 229 nm; retention time: 5.1 min.

##### *2.4.4 Evaluation of encapsulation efficiency*

Nanocapsules were submitted to ultrafiltration/centrifugation using centrifugal devices (Amicon<sup>®</sup> 10.000 MW, Millipore) at 2200 xg during 10 min. Free clotrimazole was determined in the ultrafiltrated. Encapsulation efficiency (%) was calculated from the

difference between the total and the free drug concentrations using the described HPLC method [28].

### 2.5 Stability studies

The nanoparticle suspensions were stored at room temperature (25°C) and protected from light in amber glass flasks. The formulations were evaluated after 60 days of storage in terms of drug content, pH, particle size, distribution and zeta potential.

### 2.6 Photostability study

To evaluate the effect of photodegradation by UV light, a methanolic solution of clotrimazole (1.0 mg/mL) and the NC-1 formulation were placed in quartz cuvettes and the samples were exposed to UVC radiation (Phillips TUV lamp–UVC long life, 30 W) for 14 hours in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm) at a fixed distance of 20 cm from the light source. In order to discard the possibility of temperature degradation or the influence of other experimental conditions, a quartz cuvette containing the clotrimazole methanolic solution was protected from UVC radiation by covering the cuvette with aluminum paper (dark control). The remaining clotrimazole was assayed by HPLC. The experiment was conducted in triplicate.

### 2.7 In vitro drug release study

The *in vitro* release of clotrimazole from nanocapsules was performed using the dialysis bag diffusion technique. Formulations NC-1, NC-3 and the methanolic solutions of clotrimazole at 1 and 3 mg/mL (CMS-1 and CMS-3, respectively) were placed in a dialysis bag (MWCO 10.000, Spectra Por 7), and this system was immersed in 250 mL of pH 4.5 acetate buffer with 30% of ethanol to maintain the sink conditions. The medium was kept at 37°C under continuous magnetic stirring of 50 rpm. At predetermined intervals, aliquots of 1 mL dissolution medium were withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium. The percentage of drug released was determined using the HPLC conditions mentioned previously, except for the volume of injection (50 µL). The mean calculated values were obtained from 3 replicates.

### 2.8 Mathematical modeling of release profiles

The release profiles of clotrimazole from nanocapsules were analyzed by model-dependent approaches: the first order model,  $Q_t/Q_\infty=1-[e^{-kt}]$  and the Power law model,

$Q_t/Q_\infty = a.t^n$ . In these models,  $Q_t$  is the amount of the drug released at time  $t$ ,  $Q_\infty$  is the initial amount of the drug,  $k$  is the kinetic rate constant [29],  $a$  is a constant incorporating structural and geometric characteristics of the carrier, and  $n$  is the release exponent, indicative of the mechanism of drug release [30]. The experimental data were fitted to the models with software Scientist 2.0 (Micromath, USA).

### 2.9 *In vitro* antifungal activity of clotrimazole-loaded nanocapsule suspensions

Antifungal activity was studied against fluconazole-susceptible *Candida albicans* ( $n=1$ ), fluconazole-susceptible *Candida glabrata* ( $n=1$ ) and fluconazole-resistant *Candida glabrata* ( $n=1$ ). The inocula were performed after growth (48 h/35°C) on Sabouraud dextrose agar. The colonies were suspended in 0.85% sterile saline and this suspension was homogenized in a vortex mixer for 15 seconds; after that, cell density was set in a spectrophotometer and transmittance ( $\lambda=530$  nm) was adjusted to match standard 0.5 on the McFarland scale ( $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  cells per mL). In the sequence, a 1:50 dilution in water was done, followed by a 1:20 dilution in RPMI 1640 medium, resulting in a final concentration of  $1.5 \pm 1.0 \times 10^3$  cells per mL.

The microdilution technique [31] was performed in polystyrene sterile plates with flat-bottom, disposable, with 96 wells. One hundred milliliters of samples were twice more concentrated than the desired final concentrations in the series in wells 1 to 10. The tested samples were: clotrimazole methanolic solution (CMS), methanolic solution of clotrimazole and medium chain triglycerides (MCT-CMS), clotrimazole-loaded nanocapsule at 1 mg/mL (NC-1), blank nanocapsules (NC-B) and medium chain triglycerides methanolic solution (MCTMS). Rows 11 and 12 represented the negative (medium) and positive (medium + microorganisms) controls, respectively. To each well microdilution plate were added 100  $\mu$ L of the standardized inoculum. The plates were incubated at 35°C for 48 hours and then 10 mL of 0.5% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride dye was added to all wells, and the plates were re-incubated at 35°C for 20 minutes. After this period, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The wells showing fungal growth were pink.

The interaction of medium chain triglycerides (MCT) and clotrimazole (CLZ) was calculated by determining the fractional inhibitory concentration index (FICI) of each combination [31]. The fractional inhibitory concentration (FIC) of each agent was calculated by dividing the inhibitory concentration of each antifungal - when used in combination - by its MIC (Eq. 1 and 2). FIC values were then added together to define the interaction of the

combination (Eq. 3). Synergy was defined when  $FICI \leq 0.5$ , additivity when  $0.5 < FICI < 1.0$ , indifference when  $1.0 \leq FICI \leq 4.0$  and antagonism when  $FICI \geq 4.0$  [32].

$$FIC_{CLZ} = \frac{\text{MIC in combination}}{\text{MIC}_{CLZ}} \quad (\text{Equation 1})$$

$$FIC_{MCT} = \frac{\text{MIC in combination}}{\text{MIC}_{MCT}} \quad (\text{Equation 2})$$

$$FICI = FIC_{CLZ} + FIC_{MCT} \quad (\text{Equation 3})$$

### 2.10 Statistical Analysis

Formulations were prepared and analyzed in triplicate and the results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. SigmaStat Statistical Software Package, version 3.5 (Jandel Scientific, USA), was used for the analyses of variance (ANOVA) and post-hoc multiple comparisons. The release profiles were analyzed by two-way ANOVA followed by the post hoc student Bouferone test, expressed with  $\pm$  standard deviation. A p-value  $< 0.05$  was considered to be statically significant. For this analysis, software Prism version 5 was used.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Dissolution/Swelling of polymer films

As a preformulation test, an evaluation was made of the compatibility of the oil with the polymer after 60 days in reciprocal contact. The aim of this experiment was to observe the possibility of dissolution or swelling of Eudragit<sup>®</sup> RS100 by the medium chain triglycerides, since the oil must be a nonsolvent for the polymer to form a core-shell structure [33]. The initial mass of the polymer film was  $116.9 \pm 14.9$  mg. On the first day, the film weighed  $117.4 \pm 14.8$  mg, while on the last day in contact with the oil, the polymer mass was  $116.4 \pm 15.2$  mg. The statistical analysis showed that the difference was not significant ( $p < 0.05$ ), indicating that the medium chain triglycerides and Eudragit<sup>®</sup> RS100 are suitable to form nanocapsules.

### 3.2 Physicochemical characterization

After preparation, the macroscopic analysis of the nanocapsules revealed a liquid with milky and opalescent bluish reflection which is associated with the Brownian motion of colloidal structures (Tyndall effect), corroborating the results previously reported in the literature for other nanocapsule systems [21, 22, 34]. Moreover, it should be noted that none

of the formulations showed visible precipitation. Table 1 shows the results of the physicochemical characterization of the formulations developed in this study. The nanocapsules showed adequate sizes as regards average diameter: smaller than 150 nm, with polydispersity index lower than 0.17, which indicates a narrow distribution. As for the evaluation of zeta potential, the colloidal structures showed positive values, which is consistent with the cationic nature of the polymer. Eudragit® RS100 is well-known in the literature for its mucoadhesive properties [35, 36]. The positively charged nanoparticles have the potential to adhere to the mucus which is negatively charged and, hence, provide prolonged residence time of the nanocarrier on the vaginal cavity. It should also be noted that there is no study on the development of cationic colloidal systems for clotrimazole. Considering pH determination, the formulations showed values close to 5.1, which is in accordance with other nanoparticle suspensions prepared with Eudragit® RS100 [34]. Given that the pH of the vaginal tract is 4.5, the Eudragit® RS100 nanocapsules containing clotrimazole can be considered compatible with this route of administration. All formulations were very close to the theoretical value for drug content. In addition, regardless of clotrimazole concentration, encapsulation efficiency was higher than 99.9%, which is associated with the high lipophilicity of the drug that prevents its partition in the aqueous phase.

Table 1- Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions (n=3).

Sample	Actual drug		Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
	content (mg/mL)	pH			
NC-B	-	5.2±0.3	137±4	0.14±0.06	12.3±1.8
NC-1	1.01±0.01	5.1±0.2	144±12	0.17±0.11	12.1±3.3
NC-2	2.04±0.04	5.0±0.3	146±9	0.12±0.02	13.9±2.7
NC-3	3.04±0.02	5.0±0.1	143±13	0.15±0.01	13.3±1.8

### 3.3 Stability study

After 60 days of storage at room temperature and protection from the light, the colloidal suspensions kept the same appearance, without precipitation or color change. Drug content (Figure 1a) remained stable during the whole period, probably as a result of the high affinity of the clotrimazole with the nanostructure. In order to verify the role of the oily core in maintaining clotrimazole content, a formulation without medium chain triglycerides was

prepared. The results showed that the drug concentration of nanospheres decreased 25% after 60 days, evidencing that the probable confinement of the drug in the nucleus of the nanocapsules is an important factor for drug stability (data not shown). Considering the other parameters, pH (Figure 1b), polydispersity (Figure 1d) and zeta potential (Figure 1e), no significant difference was observed after 60 days.

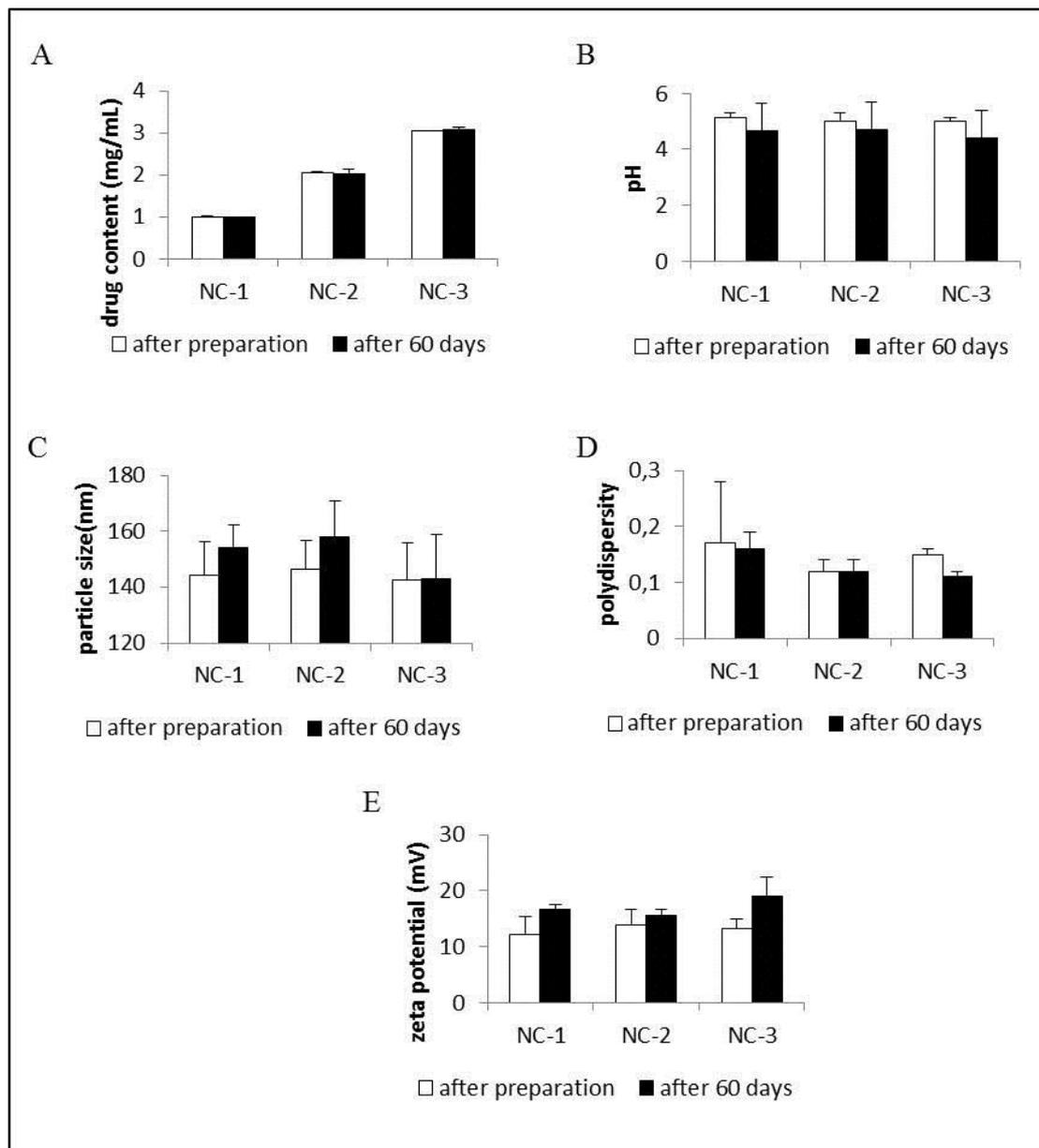


Figure 1. Drug content (A), pH (B), particle size (C), polydispersity (D) and zeta potential (E) of clotrimazole-loaded nanoparticles, after preparation and after 60 days.

### 3.4 Photostability study

Although there are no scientific articles commenting that clotrimazole is photolabile, the United States Pharmacopoeia [37] recommends photoprotection of the drug during storage. In this way, an assessment was made of the ability of the nanocapsules to prevent the clotrimazole photodegradation under UVC radiation (Figure 2). After 14 hours of exposure, the clotrimazole content of nanocapsules was around 70%, while the methanolic drug solution showed a more pronounced decrease (assay of 26%). For the dark control, clotrimazole concentration was close to 100%, which discards the influence of chamber temperature on drug degradation. Hence, the nanocapsules have the ability to delay the photodegradation of clotrimazole under UV radiation. The protection of the drug could be attributed to the crystallinity of the polymer shell that reflects or scatters UV radiation, as stated by Jimenez and co-workers [38] for other polymeric nanoparticles.

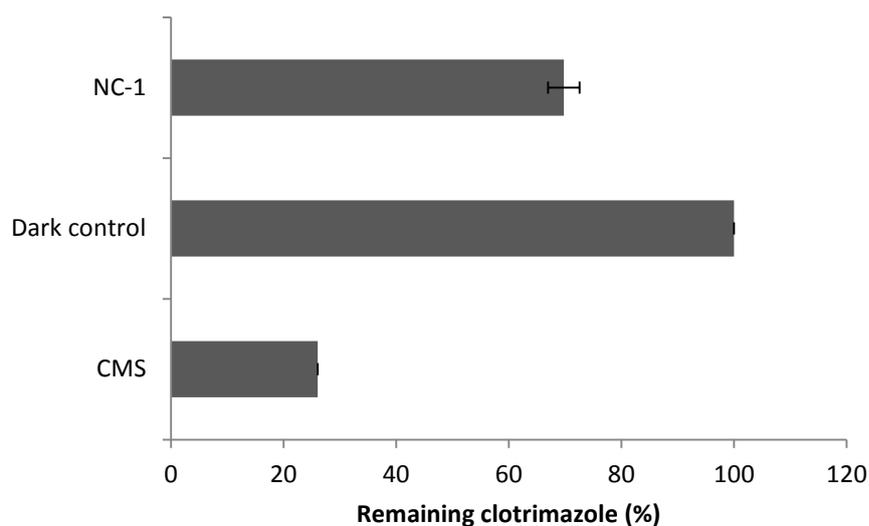


Figure 2. Clotrimazole content of nanocapsules (NC-1), methanolic solution (CMS) and methanolic solution protected from UVC radiation (dark control).

### 3.5 *In vitro* release study

Formulations NC-1 and NC-3 had a similar behavior and presented a slower release profile than the respective methanolic solutions of clotrimazole (Figure 3). After 8 hours, the release from both solutions was complete. On the other hand, formulations NC-1 and NC-3 released 66% and 58% of the drug, respectively, in 24 hours. Until 8 hours of experiment the difference between the profiles of NC-1 and NC-3 was not significant. However, the percentage of drug released from NC-3 was significantly lower ( $p < 0.05$ ) after this period,

which is associated with the greater amount of drug that must be dissolved. In this way, Eudragit® RS100 nanocapsules were able to prolong clotrimazole release in vaginal pH.

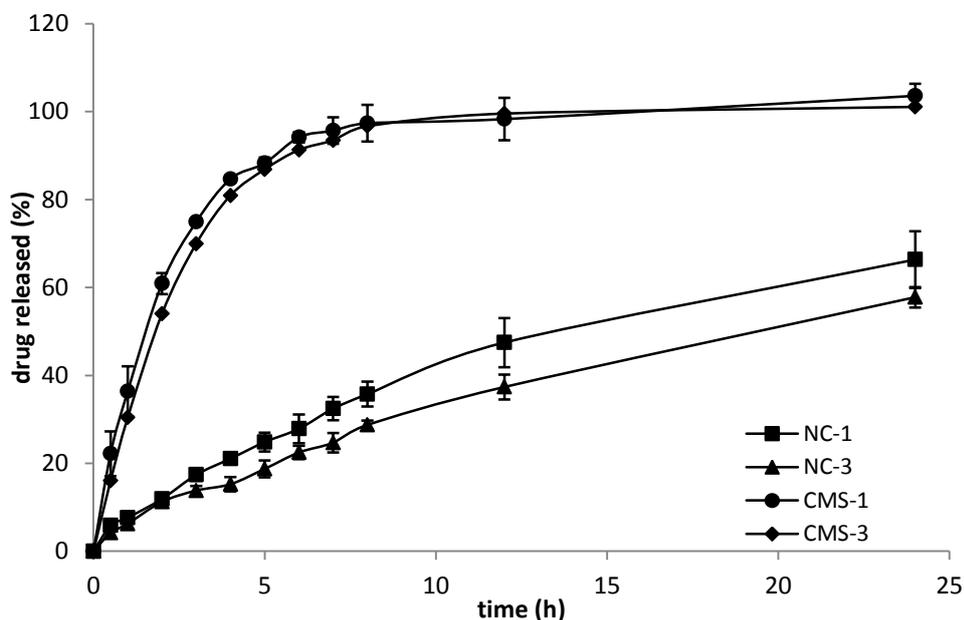


Figure 3. *In vitro* clotrimazole release profiles from methanolic solutions (CMS-1 and CMS-3) and from nanocapsules (NC-1 and NC-3).

Mathematical modeling showed that the drug release profile of all formulations followed a first order kinetics (correlation coefficient higher than 0.99) (Table 2). The first order equation is constituted by only one exponential term, which means that the drug release occurs in a single step, without a rapid initial release (*burst* effect). The absence of *burst* release indicates that all clotrimazole is encapsulated, corroborating the results of encapsulation efficiency. Comparing the rate constants, nanocapsules presented a  $k$  value approximately 10 times lower than solutions, which evidences the slower release of clotrimazole from nanocarriers. In addition, half-lives were lower than 2 hours for solutions, while nanocapsules showed values above 12 hours.

The mechanism of drug release was investigated using Power law (Korsmeyer-Peppas model). As reported in the literature, for systems presenting spherical geometry, the limits considered for the release exponent were the following: (a)  $n=0.43$  indicates Fickian diffusion; (b)  $0.43 < n < 0.85$  corresponds to anomalous transport; (c)  $n \geq 0.85$  is associated with a case II transport [39]. Therefore,  $n$  values ranged from 0.44 to 0.69 for all formulations, indicating anomalous transport. For nanocapsules, drug release depends on polymer relaxation followed by the diffusion of clotrimazole. These results are in accordance with the application of this polymer. Eudragit® RS100 (ammonium methacrylate copolymers) is a

water-insoluble copolymer synthesized from acrylic acid and methacrylic acid esters with 5% of functional quaternary ammonium groups, used to promote sustained drug release. The ammonium groups are present as salts and give rise to pH-independent permeability of this polymer, and films prepared from Eudragit® RS100 are only slightly permeable to water [40].

Table 2- Parameters calculated by first order and Power law models for clotrimazole-loaded nanocapsules and free-drug solutions.

	NC-1	NC-3	CMS-1	CMS-3
<b>First order</b>				
<i>r</i>	0.9961±0.0022	0.9965±0.0017	0.9976±0.0018	0.9985±0.0005
<i>k</i> (h <sup>-1</sup> )	0.0536±0.0072	0.0398±0.0032	0.4630±0.0166	0.3956±0.0429
<i>t</i> <sub>1/2</sub> (h)	12.9	17.4	1.5	1.8
<b>Power Law</b>				
<i>r</i>	0.9954±0.0009	0.9974±0.0019	0.9855±0.0021	0.9852±0.0007
<i>a</i>	0.1374±0.0100	0.1122±0.0077	0.4341±0.0468	0.3766±0.0084
<i>n</i>	0.6349±0.0248	0.6922±0.0208	0.4403±0.0487	0.5048±0.0165

### 3.6 Antifungal activity

An assessment was made of the antifungal activity of clotrimazole-loaded nanocapsules against *C. albicans* and *C. glabrata* strains susceptible and resistant to fluconazole, in comparison with blank nanocapsules and with a drug methanolic solution. In parallel, the tests were also performed with a methanolic solution of medium chain triglycerides and with a methanolic solution of drug and triglycerides. We hypothesized that the oil could influence antifungal activity since medium chain triglycerides are mainly constituted of fatty acids esters of glycerol with 6 to 12 carbons. Regarding the literature, lipid substances may present microbicidal activity, probably due to the disruption of membrane cells [41]. Table 3 shows the MIC values determined for each sample. Lower MIC values indicate higher antifungal activity. Free clotrimazole presented higher activity for *C. albicans*. It is important to mention that methanol did not interfere in fungal growth (MIC ≥ 1600). On the other hand, blank nanocapsules and methanolic solution of medium chain triglycerides showed no antifungal activity at all yeasts (MIC ≥ 1600). However, when medium chain triglycerides were combined with clotrimazole in methanolic solution, antifungal activity was evident. The calculated MIC values for clotrimazole and medium chain triglycerides in the

solution were 0.8 and 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. This result suggests an interaction between both substances, because medium chain triglycerides in combination with clotrimazole showed a marked reduction of MIC, especially for *C. albicans*. Comparing these results with those obtained for clotrimazole-loaded nanocapsules, the colloidal suspensions presented the same MIC values of methanolic solution of medium chain triglycerides and clotrimazole, except for clotrimazole against fluconazole-resistant *C. glabrata*.

Table 3- Minimum inhibitory concentration values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of clotrimazole-loaded nanocapsules and controls against yeasts.

Yeasts	NC-1		MCT-CMS		CMS	MCTMS	NC-B
	CLZ	MCT	CLZ	MCT			
<i>C. albicans</i>	0.8	25.0	0.8	25.0	0.4	$\geq 1600$	$\geq 1600$
<i>C. glabrata</i> FS	12.5	400.0	12.5	400.0	12.5	$\geq 1600$	$\geq 1600$
<i>C. glabrata</i> FR	25.0	800.0	12.5	400.0	12.5	$\geq 1600$	$\geq 1600$

CLZ: clotrimazole; MCT: medium chain triglycerides; CMS: clotrimazole methanolic solution; MCT-CMS: methanolic solution of clotrimazole and medium chain triglycerides; NC-1: clotrimazole-loaded nanocapsule at 1 mg/mL; NC-B: blank nanocapsule; MCTMS: medium chain triglycerides methanolic solution.

FICI values were calculated in order to investigate the nature of the combination of clotrimazole with medium chain triglycerides (Table 4). The results showed indifferent activity ( $1.0 \leq \text{FICI} \leq 4.0$ ), which means that the effect is attributed to the most active component, in this case, clotrimazole. In this way, the *in vitro* assay showed that the nanocapsules retained clotrimazole activity against the three studied yeasts. It should be noted that *C. albicans* is the most virulent of all *Candida* species. However, *C. glabrata* has been associated with vulvovaginitis [42]. Therefore, the developed nanocapsules can be considered promising formulations to treat vulvovaginal candidiasis.

Table 4- FICI values of clotrimazole-loaded nanocapsules (NC-1) and methanolic solution of clotrimazole and medium chain triglycerides (TCM-CMS).

Yeasts	NC-1	Interaction	MCT-CMS	Interaction
<i>C. albicans</i>	2.02	I	2.01	I
<i>C. glabrata</i> FS	1.25	I	1.25	I
<i>C. glabrata</i> FR	1.25	I	2.25	I

MCT-CMS: methanolic solution of clotrimazole and medium chain triglycerides; NC-1: clotrimazole-loaded nanocapsule at 1 mg/mL; I: indifference.

#### 4. Conclusion

For the first time, the present study showed the feasibility of preparing polymeric nanocapsules containing clotrimazole at 1 to 3 mg/mL, using medium chain triglycerides as oily core. The formulations combined adequate physicochemical characteristics and stability with improved photostability and prolonged drug release. In addition, nanocapsules were able to maintain clotrimazole activity against *Candida* species. Thus, those Eudragit<sup>®</sup> RS100 nanocapsules have proven to be a promising alternative for the delivery of clotrimazole in vulvovaginal candidiasis.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank FAPERGS for financial support. S.S.S. would like to thank CAPES (Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education) /Brasília/Brazil for a master fellowship.

#### References

- [1] M.A. Burgess, G.P. Bodey, Clotrimazole: *In vitro* and clinical pharmacological studies, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2 (1972) 423-426.
- [2] B. Prabagar, B. Yoo, J. Woo, J. Kim, J. Rhee, M.G. Piao, H. Choi, C.S. Yong, Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with 13-cyclodextrin, *Arch. Pharm. Res.* 30 (2007), 249-254.
- [3] F.M. Hashem, D.S. Shaker, M.K. Ghorab, M. Nasr, A. Ismail, Formulation, characterization, and clinical evaluation of microemulsion containing clotrimazole for topical delivery, *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 879-886.

- [4] F.C. Odds, Genital candidiasis, Clin. Exp. Dermatol. 7 (1982) 345-354.
- [5] J.D. Sobel, S. Faro, R.W. Force, Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations, Am. J. Obstet. Gynecol. 178 (1998) 203–211.
- [6] Gino-canesten, vaginal cream, Resp. Techn: Braulio Lordêllo - CRF-SP 9496, Bayer S.A. - São Paulo, SP. Bull of medicine.
- [7] R.B. Sudeendra, H.G. Shivakumar, Bioadhesive controlled release clotrimazole vaginal tablets, Trop. J. Pharm. Res. 9 (2010) 339-346.
- [8] J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.S. Kong, Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. J. Control. Release. 82 (2002) 39-50.
- [9] G.C. Ceschel, P. Maffei, S.L. Borgia, C. Ronchi, S. Rossi, Development of a mucoadhesive dosage form for vaginal administration, Drug Dev. Ind. Pharm. 27 (2001) 541-547.
- [10] C.E. Kast, C. Valenta, M. Leopold, A. Bernkop-Schnurch, Design and *in vitro* evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole, J. Control. Release. 81 (2002) 347–354.
- [11] M. Ning, Y. Guo, H. Pan, X. Chen, Z. Gu, Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole, Drug Dev. Ind. Pharm. 31 (2005) 375-383.
- [12] M.A. Alam, F.J. Ahmad, Z.I. Khan, R.K. Khar, M. Ali, Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections, AAPS Pharmscitech, 8 (2007) 229-236.
- [13] F.J. Ahmad M.A. Alam, Z.I. Khan, R.K. Khar, M. Ali. Development and *in vitro* evaluation of an acid buffering bioadhesive vaginal gel for mixed vaginal infections, Acta Pharm. 58 (2008) 407-419.
- [14] Z. Pavelic, N. Skalko-Basnet, I. Jalsenjak, Characterization and *in vitro* evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis, Int. J. Pharm. 301 (2005) 140–148.
- [15] M. Ning, Y. Guo, H. Pan, H.M. Yu, Z. Gu, Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole, Chem. Phar. 53 (2005) 620-624.

- [16] M. Ning, Y. Guo, H. Pan, S. Zong, Z. Gu, Preparation and characterization of EP-liposomes and Span 40-niosomes, *Pharmazie*, 61 (2006) 208-212.
- [17] E. Bilensoy, M.A. Rouf, I. Vural, M. Sen, A.A. Hıncal, Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole:  $\beta$ -cyclodextrin complex, *Pharm. Sci. Tech.* 7 (2006) article 38.
- [18] Y.G. Bachhav, V.B. Patravale, Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, *in vitro* evaluation, and stability studies, *AAPS Pharmscitech.* 10 (2009) 476-481.
- [19] E.B. Souto, S.A. Wissing, C.M. Barbosa, R.H. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.* 278 (2004) 71–77.
- [20] R. Pandey, Z. Ahmad, S. Sharma, G.K. Khuller, Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 301 (2005) 268–276.
- [21] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 113–142.
- [22] P. Couvreur, B. Gillian, E. Fattal, P. Legrand, V. Vauthier, Nanocapsule Technology: A Review, *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 99-134.
- [23] S.R. Schaffazick, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim Nova.* 25 (2003) 726-737.
- [24] M.N.V. Ravi Kumar, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3 (2000) 234-258.
- [25] M.J. Alonso, Nanomedicines for overcoming biological barriers, *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 168-172.
- [26] A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Tretinoin-loaded nanocápsulas: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 1-4.

- [27] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet (1988) European Patent 0274961 A1.
- [28] S.S. Santos, L.M. Ferreira, S.R. Schaffazick, L. Cruz, A simple RP-HPLC method for the determination of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions, *Lat. Am. J. Pharm.* 31 (2012) 482-486.
- [29] L. Cruz, L.U. Soares, T. Dalla Costa, G. Mezzalira, N. Silveira, S.S.Guterres, A.R. Pohlmann, Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers, *Int. J. Pharm.* 313 (2006) 198-205.
- [30] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35.
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-A3. 2008; Wayne, PA.
- [32] M.D. Johnson, C. Macdougall, L. Ostrosky, J.R. Perfect, J.H. Rex, Combination antifungal therapy, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48 (2004) 693–715.
- [33] S.S. Guterres, V. Weiss, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin, *Drug Deliv.* 7 (2000) 195-199.
- [34] S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, G. Mezzalira, S.S. Guterres, Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 562-569.
- [35] R. Pignatello, C. Bucolo, P. Ferrara, A. Maltese, A. Puleo, G. Puglisi, Eudragit RS100<sup>®</sup> nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 53–61.
- [36] R. Pignatello, M. Ferro, G.D. Guidi, G. Salemi, M.A. Vandelli, S. Guccione, M. Geppi, C. Forte, G. Puglisi, Preparation, characterization and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100<sup>®</sup> and RL100<sup>®</sup>, *Int. J. Pharm.* 314 (2006) 72–82.
- [37] United States Pharmacopoeia. 32 ed. Rockville, United States Pharmacopoeia Convention, 2008.

- [38] M.M. Jimenez, J. Pelletier, M.F. Bobin, M.C. Martini, Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate, *Int. J. Pharm.* 272 (2004) 45–55.
- [39] N.A. Peppas, Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta. Helv.* 60 (1985) 110–111.
- [40] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, sixth ed., Pharmaceutical Press, London, 2009.
- [41] G. Bergsson, J. Arnfinnsson, O. Steingrimsson, H. Thormar, *In Vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 3209–3212.
- [42] M.A. Kennedy, J.D. Sobel, Vulvovaginal Candidiasis caused by non-albicans *Candida* species: New insights, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12 (2010) 465-470.

**PUBLICAÇÃO 3:** Coconut oil-core polymeric nanocapsules as innovative carriers for treatment of vulvovaginal candidiasis

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Colloids and Surfaces B

---

## **Coconut oil-core polymeric nanocapsules as innovative carriers for treatment of vulvovaginal candidiasis**

Sara S. Santos<sup>a</sup>, Alessandra Lorenzoni<sup>a</sup>, Laura B. Denardi<sup>b</sup>, Sydney H. Alves<sup>b</sup>, Scheila R. Schaffazick<sup>a</sup>, Letícia Cruz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

**Abstract**

The objective of this work was to propose novel coconut oil-core nanocapsules prepared from Eudragit<sup>®</sup> RS100, a cationic polymer, and to evaluate their potential for vaginal delivery of clotrimazole in candidiasis. Nanocapsules loaded with clotrimazole at 1.0, 2.0 and 3.0 mg/mL were prepared by interfacial deposition of Eudragit<sup>®</sup> RS100. The physicochemical characterization showed average diameter lower than 200 nm, low polydispersity index, positive zeta potential (+10.94 to +14.57 mV), acid pH values (5.4 to 5.7) and encapsulation efficiencies close to 100%. During 60 days of storage at room temperature and protection from the light, the nanocapsules were reasonably stable. Photodegradation studies showed that nanoencapsulation improved clotrimazole stability against UV radiation. The *in vitro* drug release at pH 4.5 was characterized by a prolonged release without *burst* effect. The nanocapsules were more active than free clotrimazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains susceptible and resistant to fluconazole. Hence, clotrimazole-loaded coconut oil-core nanocapsules represent promising alternatives to the treatment of vulvovaginal candidiasis.

**Keywords:** nanocapsules, coconut oil, clotrimazole, Eudragit<sup>®</sup> RS100, *Candida*, antifungal activity

## 1. Introduction

Polymeric nanoparticles have been considered promising carriers of therapeutic drugs [1]. The main advantages showed by these submicron devices in the last years include site-specific targeting [2, 3], controlled release of drugs [4] and improved protection of labile molecules against enzymatic hydrolysis, photodecomposition, chemical and immunological degradation [1, 5].

In general, polymeric nanoparticles present size ranging to 100-500 nm [6] and may distinguished into two subtypes of nanostructures namely nanospheres and nanocapsules [7]. Conceptually, nanospheres possess a matrix structure, while nanocapsules present a core-shell organization in which the polymer surrounds a liquid (lipophilic or hydrophilic) nucleus [8]. In such nanocarriers, the active substances are usually entrapped or dissolved within or adsorbed on the particle surface [9]. Comparing both types of nanostructures, oily-core nanocapsules feature some important advantages such as higher drug loading capacity, better protection of drugs from degradation and reduced burst release [10]. Commonly, medium chain triglycerides, a synthetic oils, are frequently used for preparing nanocapsules because they present noteworthy qualities as biocompatibility and capacity of solubilize a wide range of drugs [4, 11]. Another important aspect to be taken into consideration in the choice of oil is the low solubility of the polymer into the chosen oil [12].

Recently, the interest in the preparation of polymeric nanocapsules with vegetable oils has increased. In this context, some studies reported the development of those nanocarriers using several vegetable oils such as sunflower [13], grape seed, almond kernel [14], Brazil nut, olive, rose hip and carrot [15].

Among the oilseeds of great economic interest, the coconut oil stands out for its high nutritional and pharmaceutical value [16]. Traditionally, coconut oil is used in the pharmaceutical industry as an emollient in bases of ointments, shampoos, soaps and liquid soaps [17]. Although there are few reports in the literature, some studies indicate that coconut oil has antifungal [18, 19, 20] and antioxidant activities [20, 21, 22].

Coconut oil is extracted from *Cocos nucifera* Linn (Palmae) and is described as a white paste with a melting point between 23-26°C [17]. On average, 75% of the fatty acids of virgin coconut oil are medium chain triglycerides and 90% of the fatty acids are saturated. Compared with other vegetable oils, coconut oil has a lower amount of unsaturated fatty acids (4%) than palm, peanut, corn, soy and flaxseed oils, which contain from 53 to 90% [23]. The major fatty acids present in coconut oil are lauric (40-50%) and myristic acids (15-20%) [17].

Considering nanostructured systems, to the best of our knowledge, there is no report on the development of polymeric nanocapsules containing this oil. Regarding the literature, solid lipid nanoparticles of coconut oil were considered potential systems for topical delivery of all-*trans*-retinoic acid [24] and lipoic acid polyethylene glycol ester [25]. In addition, the feasibility of nanoemulsions made up with coconut oil was also demonstrated [26, 27]. In spite of the antifungal activity of this vegetable oil, there is no study exploring the incorporation of an antimicrobial into coconut oil nanocarriers.

Among antimicrobial drugs, clotrimazole, a broad-spectrum antifungal imidazole derivative, is a poorly water soluble drug used topically in the treatment of vulvovaginitis caused by *Candida albicans*, but this treatment is generally associated with mucosal irritation, leakage of the formulation and low residence time at the vaginal cavity [28].

Taking all of this into account, this work was performed in order to prepare and characterize coconut oil-core nanocapsules from Eudragit<sup>®</sup> RS100, a cationic polymer, intended for the vaginal delivery of clotrimazole. The polymeric nanocapsules were evaluated for their stability at room temperature, photostability under UV light, *in vitro* drug release and *in vitro* antifungal activity against *Candida* species.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

Clotrimazole (99.22 %, w/w) was purchased from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Virgin Coconut oil was donated by TheraHerb (Niterói, Brazil). Eudragit<sup>®</sup> RS100 (Röhm Pharma, Germany) was a gift of Almapal (São Paulo, Brazil). Span 80<sup>®</sup> (sorbitan monooleate) was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Tween 80<sup>®</sup> (polysorbate 80) was supplied by Delaware (Porto Alegre, Brazil). HPLC-grade methanol was acquired from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). Other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

### **2.2. Analytical procedures**

The experiments were performed on a LC-10A HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, an UV-VIS SPD-M20A detector, a CBM-20A system controller and a Rheodyne valve sample manual injector with 20  $\mu$ L loop. Separation was achieved at room temperature using a RP C<sub>18</sub> Phenomenex column (250 mm x 4.60 mm, 5  $\mu$ m; 110 Å) coupled to a C<sub>18</sub> guard column. The isocratic mobile phase consisted of

methanol and water (90:10 v/v) at flow rate of 1 mL/min. Clotrimazole was detected at 229 nm with a retention time of about 5.1 min [29]. The method was validated according to the ICH guidelines for determination of clotrimazole in coconut oil-core nanocapsules. The method was found to be linear ( $r=0.9993$ ), specific, accurate (100,51 % to 101,88 %), precise and robust (relative standard deviation was  $< 3\%$  for all parameters) in the concentration range of 2-10  $\mu\text{g/ml}$  and in accordance to the previous work for clotrimazole in medium chain triglyceride oil-core nanocapsules [29].

### **2. 3. Dissolution/ Swelling experiments of polymer films**

Eudragit<sup>®</sup> RS100 films were prepared by dissolution of 2 g polymer in acetone followed by evaporation of the solvent at room temperature. About 100 mg of film were exactly weighed and placed in contact with enough amount of coconut oil to cover the film. In predetermined intervals during a period of 60 days, the films were removed from the contact with the oil and were carefully dried with the aid of an absorbing paper. The weight variation was determined in an analytical balance. The experiments were performed in triplicate.

### **2. 4. Preparation of nanocapsules**

Nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of Eudragit<sup>®</sup> RS100 [30]. An organic phase constituted of polymer (0.100 g), acetone (27 mL), Span 80<sup>®</sup> (0.077 g), clotrimazole (0.01 or 0.02 or 0.03 g) and coconut oil (0.300 g) was kept for 60 minutes under moderate magnetic stirring at 40 °C. After solubilization of all components, the acetone solution was poured to 53 mL of an aqueous dispersion of Tween 80<sup>®</sup> (0.077 g) and the magnetic stirring was maintained for 10 min. The organic solvent and part of the water were then eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve a final volume of 10 mL and clotrimazole concentration of 1.0, 2.0 or 3.0 mg/mL (NC-1, NC-2 and NC-3, respectively). For comparison, formulations without the drug (blank nanocapsules, NC-B) were also prepared. All samples were obtained in triplicate.

### **2. 5. Characterization of nanoparticle suspensions**

#### **2.5.1. Determination of pH**

The pH of nanoparticle suspensions was verified by directly immersing the electrode of a calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brasil) into the formulations. The measures were performed at room temperature ( $25\text{ °C} \pm 2$ ) in triplicate of batch.

### **2.5.2. Particle size analysis, polydispersity index and zeta potential**

Particle sizes and polydispersity indexes ( $n=3$ ) were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potentials were measured using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500).

### **2.5.3. Determination of drug content and encapsulation efficiency**

Total content of clotrimazole in nanocapsule suspensions ( $n=3$ ) was assayed by diluting an aliquot of the sample in 10 mL methanol and submitting it to sonication for 10 min to extract the drug. Before injection into the HPLC system, the samples were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane. For the determination of encapsulation efficiency, an aliquot of the samples was placed in a 10.000 MW centrifugal filter device (Amicon<sup>®</sup> Ultra, Millipore) and free drug was separated from the nanostructures by ultrafiltration/centrifugation technique at 2.200 xg for 10 min. The encapsulation efficiency (%) was calculated as the difference between total and free concentrations of clotrimazole, determined in the nanostructures and ultrafiltrate, respectively.

### **2.5.4. Stability studies**

All formulations were monitored after preparation during 60 days of storage by means of drug content, pH, particle size, polydispersity index and zeta potential. The nanocapsule suspensions were stored at room temperature and protected from light.

### **2.6. Photostability study**

Quartz cuvettes were filled with clotrimazole methanolic solution (CMS) and drug-loaded nanocapsules (NC-1) and exposed to UV radiation (Phillips TUV lamp - UVC long life, 30 W) in a mirrored chamber (1 m x 25 cm x 25 cm) at a fixed distance of 20 cm from each other for 14 hours. For comparison purposes, a quartz cuvette containing the drug methanolic solution was covered with aluminum paper (dark control). The protection of clotrimazole against the UV light was evaluated by quantifying the remaining drug by HPLC. The experiment was carried out in triplicate.

### **2.7. *In vitro* clotrimazole release study**

Release profiles of clotrimazole were obtained by dialysis diffusion technique at 37 °C in 250 mL acetate buffer (pH 4.5) with 30% of ethanol to keep the sink conditions. The samples, either clotrimazole methanolic solution (CMS-1 and CMS-3) or nanoencapsulated (NC-1 and NC-3), at 1 and 3 mg/mL, respectively, were placed in the dialysis bag (MWCO 10.000, Spectra Por 7) and this system was kept under continuous magnetic stirring of 50 rpm. Aliquots of 1 mL were withdrawn at predetermined times and replaced by the same volume of fresh medium. The amount of clotrimazole released was assayed by HPLC. The experiment was performed in triplicate.

## 2.8. Mathematical modeling of release profiles

First order equation ( $Q_t/Q_\infty = 1 - [e^{-kt}]$ ) and Korsmeyer-Peppas model ( $Q_t/Q_\infty = a.t^n$ ) were used to analyze clotrimazole release profiles with the aid of Scientist 2.0 software (Micromath, USA). In these equations,  $Q_t$  is the amount of drug released at time  $t$ ,  $Q_\infty$  is the initial concentration of the drug,  $k$  is the apparent release kinetic rate constant,  $a$  is a constant incorporating structural and geometric characteristic of the carrier, and  $n$  is the release exponent, indicative of the mechanism of the drug release [31, 32]. For spherical drug delivery systems,  $n = 0.43$  implies in Fickian diffusion, while anomalous transport is indicated by  $n$  values ranging from 0.43 to 0.85, and case II transport corresponds to  $n \geq 0.85$  [33].

## 2.9. *In vitro* antifungal activity

The microdilution method [34] was chosen for evaluation of antifungal activity of coconut oil-core nanocapsules containing clotrimazole against *Candida albicans* fluconazole-susceptible ( $n=1$ ), *C. glabrata* fluconazole-susceptible ( $n=1$ ) and *C. glabrata* fluconazole-resistant ( $n=1$ ). Firstly, the inoculums were prepared from a 35 °C/ 48 h growth in Sabouraud dextrose agar. In addition, 3-5 colonies were suspended in sterile saline (0.85%) and mixed in a vortex for 15 seconds. The cell density of 0.5 McFarland scale was adjusted in a spectrophotometer ( $\lambda = 530$  nm). The suspensions were diluted at 1:50 in water followed by a 1:20 dilution in RPMI 1640 medium to give a final concentration of  $1.5 \pm 1.0 \times 10^3$  CFU/mL.

Polystyrene sterile plates with flat-bottom, disposable, with 96 wells were covered with 100  $\mu$ L of each five formulations diluted in the medium (twice more concentrated than the desired final concentrations) in the wells 1 to 10. The tested samples were clotrimazole methanolic solution (CMS), methanolic solution of clotrimazole and coconut oil (CO-CMS), clotrimazole-loaded nanocapsule at 1 mg/mL (NC-1), blank nanocapsule (NC-B) and coconut

oil methanolic solution (COMS). The 11 and 12 rows were used as negative (medium only) and positive controls (medium + yeasts), respectively. To each well it was added 100  $\mu\text{L}$  of the standardized inoculum, except in the negative control. The plates were incubated at 35°C for 48 hours. Immediately before the reading 10  $\mu\text{L}$  of 0.5 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride dye was added to all wells and the plates were re-incubated at 35 °C for 20 min. The wells that showed fungal growth were pink due to the enzymatic reduction of the dye. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of sample which resulted in an inhibition of fungal growth.

## **2.10. Statistical Analysis**

Formulations were prepared and analyzed in triplicate and the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. SigmaStat Statistical Program, version 3.5 (Jandel Scientific, USA) was the software used for the analyses of variance (ANOVA) and post-hoc multiple comparisons. A p value less than 0.05 was assumed for the statistically significant differences. The release profiles were analyzed by two way ANOVA followed post hoc student Bouferone test, express with  $\pm$  SD. A p-value  $< 0.05$  was considered to be statically significant. For this analysis were used a Prism program version 5.

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Dissolution/Swelling of polymer films**

In the development of nanocapsules, a very important question to be answered is whether the oil can cause swelling of the polymer, or even its dissolution. According to the literature, for the formation of vesicular structure is of fundamental importance that the polymer used to form the wall of the nanocapsules be insoluble both in water and in oil [36, 37]. In this sense, films of Eudragit<sup>®</sup> RS100 were prepared and immersed in the coconut oil in order to observe changes in the weight of the polymer films. It should be noted that this analysis is very important for this work, since there are no reports in the literature on the preparation of nanocapsules containing such oil. The results showed that no significant difference in weight of the films was detected after 60 days of testing in relation to the starting mass ( $100.73 \pm 4.08$  mg). At first day, the film weight was  $102.26 \pm 4.62$  mg, while at last day in contact with the oil, the polymer mass was  $100.63 \pm 5.06$  mg. Thus coconut oil proved to be a suitable raw material for the preparation of nanocapsules of Eudragit<sup>®</sup> RS100.

### **3.2 Physicochemical characterization**

After preparation, coconut oil-core nanocapsules presented homogeneous and milky appearance characteristic of colloidal systems, without signs of precipitation. It is important to mention that several attempts have been made to prepare formulations without the polymer, as nanoemulsions. However, in all these experiments, the drug precipitated at the moment of solvent evaporation evidencing the importance of the polymer for drug stability. Table 1 depicts the physicochemical characteristics of coconut oil-core nanocapsules. The pH values were acid, which is consistent with other nanostructured systems prepared from Eudragit<sup>®</sup> RS100 [38]. In relation to particle sizes, the nanocapsules showed average diameters lower than 200 nm with narrow distribution (polydispersity indexes lower than 0.2). In contrast, clotrimazole-loaded nanospheres of polylactide-co-glycolide or alginate were polydisperse (polydispersity indexes close to 0.4) [39]. For zeta potential analysis, the results showed that the nanocapsules are positively charged, which is related to the quaternary ammonium groups of Eudragit<sup>®</sup> RS100. Regarding the literature, solid lipid nanoparticles of coconut oil presented negative zeta potential [25]. Our positively charged nanocapsules have the potential to bind to the negatively charged compounds on the mucus surface and, hence, increase the residence time of the drug on the vaginal cavity. Concerning drug content, the formulations presented concentrations very close to the theoretical value indicating no loss of clotrimazole during preparation. Moreover, encapsulation efficiencies were higher than 99.9%, which is attributed to the high hydrophobicity of clotrimazole that avoids its partitioning in aqueous phase. Regarding the literature, other nanosized systems containing clotrimazole exhibited lower encapsulation efficiencies. For alginate or polylactide-co-glycolide nanospheres, the values were 90% and 48%, respectively [39], while solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers prepared with glyceryl tripalmitate showed encapsulation efficiencies around 65% and 70%, respectively [40].

Table 1- Physicochemical characteristics of nanocapsule suspensions.

Sample	Drug content		Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta Potential (mV)
	(mg/mL)	pH			
NC-B	-	5.7 ± 0.2	170 ± 5	0.14 ± 0.02	13.30 ± 2.96
NC-1	1.00 ± 0.01	5.7 ± 0.1	169 ± 15	0.16 ± 0.04	14.57 ± 2.54
NC-2	2.02 ± 0.02	5.4 ± 0.1	194 ± 1	0.17 ± 0.02	10.94 ± 3.09
NC-3	3.02 ± 0.01	5.6 ± 0.1	173 ± 12	0.14 ± 0.02	14.44 ± 3.04

### 3.3 Stability study

No change of appearance was observed in any of the samples during the 60 days of storage at room temperature and protection from the light. The drug content was stable, regardless clotrimazole concentration (Figure 1a). Statistical analysis showed a significant decay in the pH values of NC-1 and NC-3 after 60 days (Figure 1b). On the other hand, a slight decrease of pH was observed for NC-2. The degradation of some components of nanocapsules could explain the changes seen in the pH values. In relation to particle sizes, the nanocapsules were reasonable steady, except for NC-2 (Figure 1c). In addition, polydispersity indexes were constant during the whole period (Figure 1d). Regarding zeta potential, only formulation NC-2 showed a significant increase in this parameter.

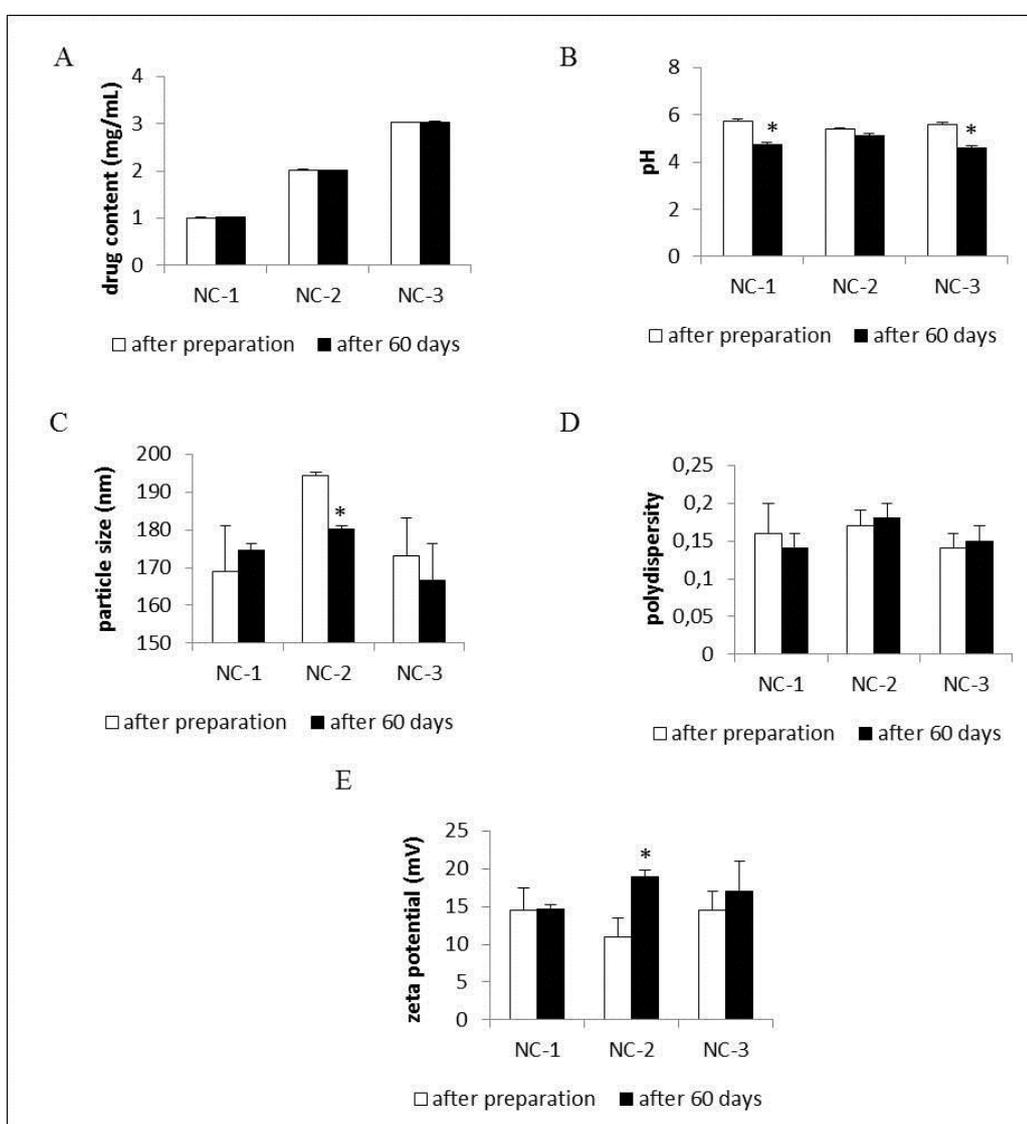


Figure 1 – Drug content (A), pH (B), particle size (C), polydispersity index (D) and zeta potential (E) of clotrimazole-loaded nanocapsules, after preparation and after 60 days.

### 3.4. Photostability study

Figure 2 displays the clotrimazole photodegradation from nanocapsules in comparison with a methanolic solution of the drug. After 14 h, clotrimazole content in the methanolic solution reduced to 26%. On the other hand, 74.16% of the initial drug concentration in the nanocapsules remained after the same period. No influence of temperature or other experimental condition was observed since clotrimazole concentration in the dark control was close to 100%. These results showed that coconut oil-core nanocapsules led to an increase of approximately 3 times in the clotrimazole photostability during 14 h of exposure to UVC radiation. The enhanced photostability of the nanoencapsulated drug could be attributed to the polymer wall which acts as a physical barrier against UV radiation. Previous works reported the ability of nanocapsules to protect drugs against light radiation [41, 42, 43]. Besides the polymer wall, the coconut oil may have protected the drug from degradation due to its antioxidants properties. The antioxidant activity of coconut oil is due to the phenolic compounds that are present in coconut composition [20, 22].

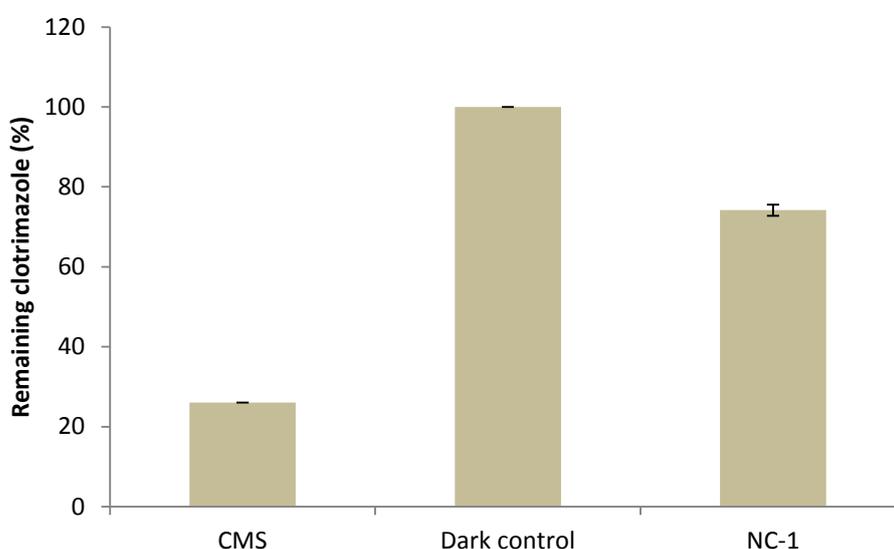


Figure 2- Clotrimazole content of nanocapsules (NC-1), methanolic solution (CMS) and methanolic solution protected from UVC radiation (dark control).

### 3.5. *In vitro* drug release

Coconut oil-core nanocapsules prepared from Eudragit<sup>®</sup> RS100 were identified to be able to control drug release in comparison with methanolic solutions (Figure 3). Regardless

clotrimazole concentration, the nanocapsules showed similar drug release profiles ( $p > 0.05$ ). In 8 hours, less than 40% of the drug was released from nanocarriers, while the respective methanolic solutions (CMS-1 and CMS-3) released almost 100% of the drug at the same time. So, these results suggest that coconut oil-core nanocapsules were able to promoting prolonged release of clotrimazole in the vaginal cavity, which could benefit antifungal therapy. A controlled release formulation can reduce the induction of fungi tolerance to the antifungal drug, besides decrease the frequency of administration. Similar nanosized systems as microemulsions have a faster clotrimazole release profile. More than 85% of the drug was released in 12 h [44].

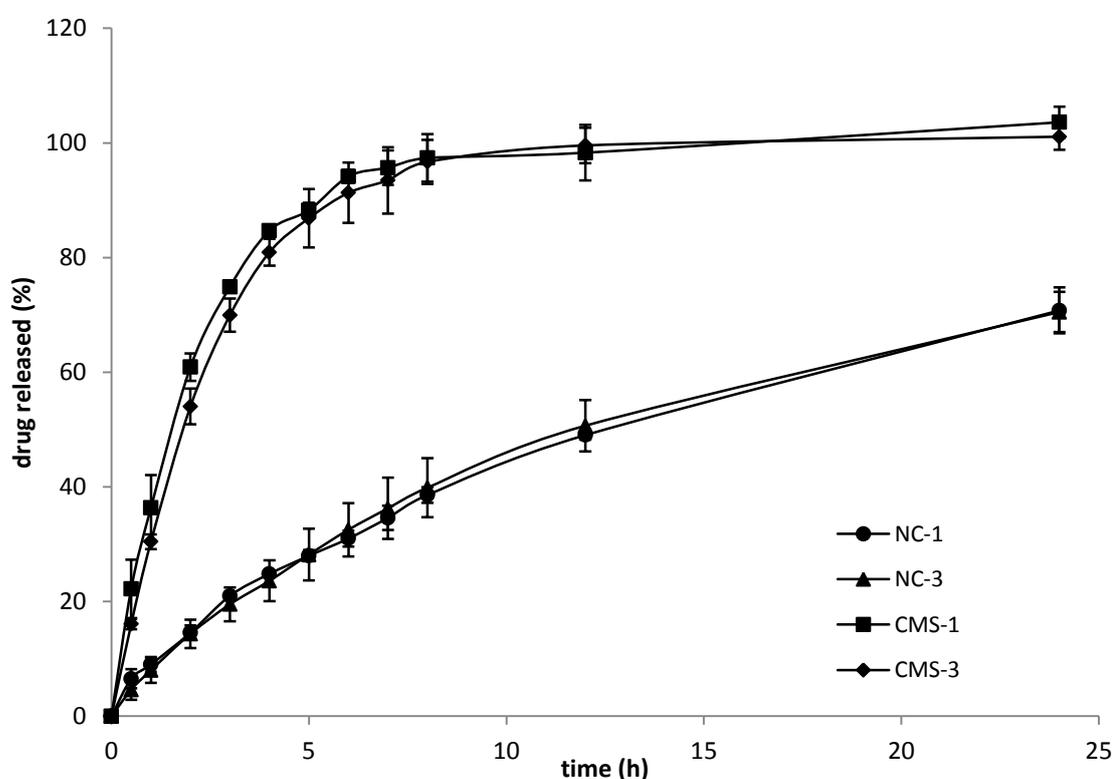


Figure 3 - *In vitro* clotrimazole release profiles from methanolic solutions (CMS-1 and CMS-3) and from nanocapsules (NC-1 and NC-3).

The data obtained from *in vitro* release experiments was modeled to first order equation with the aim to understand the mathematical behavior of release profiles. Table 2 shows that all samples presented a good fit to the first order equation ( $r > 0.99$ ). In this case, the release rate depends on the drug concentration. Moreover, no *burst* release of drug was seen, since only one rate constant is associated with the process. The absence of a rapid initial

release in the nanocapsules profiles suggests that the totality of clotrimazole is confined in the oily core of the nanostructures, confirming the results of encapsulation efficient. In addition, the half-lives associated with clotrimazole release from nanocapsules were approximately 7 times greater than the drug-free solutions.

Table 2 - Parameters calculated by first order and Korsmeyer-Peppas models for clotrimazole-loaded nanocapsules and free-drug solutions

	NC-1	NC-3	CMS-1	CMS-3
<b>First order</b>				
$r$	0.9943±0.0021	0.9961±0.0036	0.9976±0.0018	0.9985±0.0005
$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.0601±0.0022	0.0621±0.0098	0.4635±0.0166	0.3956±0.0429
$t_{1/2}$ (h)	11.5	11.2	1.5	1.8
<b>Korsmeyer-Peppas</b>				
$r$	0.9967±0.0011	0.9950±0.0028	0.9855±0.0021	0.9852±0.0007
$a$	0.1512±0.0137	0.1505±0.0363	0.4341±0.0468	0.3766±0.0084
$n$	0.6013±0.0250	0.6163±0.0669	0.4403±0.0487	0.5048±0.0165

The release mechanism was further investigated by fitting the data to Korsmeyer-Peppas model. The results showed high correlation coefficients for nanocapsules profiles; however, for drug-free solutions, the correlation coefficients were lower than 0.99. Regarding the release exponent,  $n$  values of about 0.6 were obtained for nanocapsules, which indicates that the drug release is driven by anomalous transport, in other words, the drug release is controlled by relaxation of Eudragit<sup>®</sup> RS100 chains followed by the diffusion of clotrimazole. The elucidated drug release mechanism is consistent with the polymer nature, a water-insoluble ammonium methacrylate copolymer [45].

### 3.6. *In vitro* antifungal activity

Table 3 summarizes the results of antifungal activity of tested formulations. Confirming the literature evidences [18, 19] the coconut oil presented antifungal activity against *Candida* species, being more active for *C. albicans*. Comparing the methanolic solution of coconut oil and clotrimazole (CO-CMS) with nanocapsule formulation (NC-1), it was found that the nanoencapsulation of these components decreased the MIC value for all *Candida* species. Even blank nanocapsules (NC-B) showed antimycotic activity which was comparable to the effect of the methanolic solution of this oil. The antifungal effect of

coconut oil is attributed to some acids such as lauric, caprylic and capric [18]. It is important to mention that the methanol used for the preparation of solutions did not interfere in *Candida* species growth (MIC  $\geq$  1600).

Table 3- Minimum inhibitory concentration (MIC) values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of clotrimazole-loaded nanocapsules and controls against tested yeasts

Yeasts	NC-1		CO-CMS		CMS	COMS	NC-B
	CLZ	CO	CLZ	CO			
<i>C. albicans</i>	0.25	6.25	0.8	25	0.4	12.5	12.5
<i>C. glabrata</i> FS	3.12	100	12.5	400	12.5	100	100
<i>C. glabrata</i> FR	6.25	200	12.5	400	12.5	100	100

FS: fluconazole-susceptible; FR: fluconazole-resistant; CLZ: clotrimazole; CO: coconut oil; CMS: clotrimazole methanolic solution; CO-CMS: methanolic solution of clotrimazole and coconut oil; NC-1: clotrimazole-loaded nanocapsule at 1 mg/mL; NC-B: blank nanocapsule; COMS: coconut oil methanolic solution.

The results obtained in this *in vitro* experiment showed that clotrimazole-loaded coconut oil-core nanocapsules inhibited growth of *Candida* species at concentrations lower than the drug solution and even than the methanolic solution of coconut oil and clotrimazole. Three mechanisms could explain the greater antifungal effect of nanocapsules. Firstly, clotrimazole-loaded coconut oil-core nanocapsules are positively charged which favors the adhesion of particles to the fungal negative surface and, thereby, provide the release of clotrimazole near to its site of action. Regarding the literature, nanoparticles containing ciprofloxacin made of a mixture of Eudragit<sup>®</sup> and PLGA showed stronger interaction with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* than PLGA nanoparticles due to the cationic nature of Eudragit<sup>®</sup> [46]. Secondly, due to their reduced size, nanocapsules could be internalized by fungal cells, as stated by other authors [47, 48]. Finally, the slow release of the drug could have an important role in the antifungal efficacy over the time of the experiment. In addition, a prolonged release could help the dispersion of clotrimazole in water and, hence, enhancing its cellular penetration.

#### 4. Conclusion

Eudragit<sup>®</sup> RS100 nanocapsules were successfully prepared with coconut oil and clotrimazole. The developed formulations has suitable features after preparation and 60 days of storage such as small mean diameter, low polydispersity index, positive zeta potential, acid

pH and high encapsulation efficiency, independent of clotrimazole concentration. Nanocapsules provided an increased photostability of clotrimazole, as well as a prolonged drug release. The microbiological evaluation showed that nanocapsules exhibited high antifungal activity against pathogenic *Candida* spp. For these reasons coconut oil-core nanocapsules loaded with clotrimazole are promising formulations to treat vulvovaginal candidiasis.

## 5. Acknowledgements

The authors thank FAPERGS for financial support. S.S.S. thanks CAPES/Brasília/Brazil for a master fellowship.

## 6. References

- [1] M.N.V. Ravi Kumar, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3 (2000) 234-258.
- [2] G.M. Barratt, Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol. To.*, 3 (2000) 163-171.
- [3] S. Nimesh, R. Machanda, R. Kumar, A. Saxena, P. Chaudary, V. Yadav, S. Mozundar, R. Chandra, Preparation, characterization and *in vitro* drug release studies of novel polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm*, 323 (2006) 146-152.
- [4] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm*, 385 (2010) 113–142.
- [5] M.J. Alonso, Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.*, 58 (2004) 168-172.
- [6] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 24 (1998) 1113-1128.
- [7] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudizinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, 70 (2001) 1-20.
- [8] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceut. Res.*, 26 (2009) 1025-1058.

- [9] S.R. Schaffazick, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*, 25 (2003) 726-737.
- [10] P. Couvreur, B. Gillian, E. Fattal, P. Legrand, V. Vauthier, Nanocapsule Technology: A Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 19 (2002) 99-134.
- [11] C. Preetz, A. Rube, I. Reiche, G. Hause, K. Mäder, Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine*, 4 (2008) 106-114.
- [12] I.B. Limayem, C. Charcosset, S. Sfar, H. Fessi, Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int. J. Pharm.*, 325 (2006) 124–131.
- [13] R.B. Friedrich, M.C. Fontana, R.C.R. Beck, Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Qui Nova*, 31 (2008) 1131-1136.
- [14] J.S. Almeida, L. Jezur, M.C. Fontana, K. Paese, C.B. Silva, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Oil-Based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. *Lat. Am. J. Pharm.*, 28 (2009) 165-172.
- [15] R.V. Contri, K.L.F. Ribeiro, L.A. Fiel, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. *J. Exp. Nanosci.*, (2012) 1-12.
- [16] J.W.H. Yong, L. Ge, Y.F. Ng, S.N. Tan, The chemical composition and biological properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14 (2009) 5144-5164.
- [17] British Pharmacopeia, British Pharmacopeia Commission, Londres: Her Majesty Stationary Office; v.1, 2010.
- [18] D.O. Ogbolu, A.A. Oni, O.A. Daini, A.P. Oloko, *In vitro* antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. *J. Med. Food*, 10 (2007) 384-387.
- [19] V. Agarwal, P. Lal, V. Pruthi, Effect of plant oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 43 (2010) 447–451.

- [20] M. DebMandal, S. Mandal, Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, (2011) 241-247.
- [21] K.G. Nevin, T. Rajamohan, Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chem.*, 99 (2006) 260–266.
- [22] A.M. Marina, Y.B. Man, S.A. Nazimah, I. Amin, Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 60 (2009) 114-123.
- [23] R. C. Guarte, W. Mfihlbauer, M. Kellert, Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil. *Postharvest. Biol. Tec.*, 9 (1996) 361-372.
- [24] C.M. Lee, H.J. Jeong, Ji-Won Park, Jin Kim, Ki-Young Lee, Temperature-induced release of all-trans-retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles for topical delivery, *Macromol. Res.*, 16 (2008) 682-685.
- [25] K.C. Kang, N. H. Jeong, C.I. Lee, Hyeong-Bae Pyo, Preparation and characterization of SLNs (W/O/W type) contained lipoic acid PEG ester by variation lipid. *J. Ind. Eng. Chem.*, 15 (2009) 529–536.
- [26] J.Y. Fang, Y.L. Leu, C.C. Chang, C.H. Lin, Y.H. Tsai, Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Deliv.*, 11 (2004) 97-105.
- [27] S. Piriyaarasarth, P. Sriamornsak, G. Chansiri, W. Promboot, U. Imerb, D. Sumpoung, Effect of coconut oil and surfactants on stability of nanoemulsions. *Adv. Mat. Res.*, 506 (2012) 429-432.
- [28] R.B. Sudeendra, H.G. Shivakumar, Bioadhesive controlled release clotrimazole vaginal tablets. *Trop. J. Pharm. Res.* 9 (2010) 339-346.
- [29] S.S. Santos, L.M. Ferreira, S.R. Schaffazick, L. Cruz, A simple RP-HPLC method for the determination of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions. *Lat. Am. J. Pharm.*, 31 (2012) 482-486.
- [30] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet (1988) European Patent 0274961 A1.
- [31] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, 15 (1983) 25–35.

- [32] L. Cruz, L.U. Soares, T. Dalla Costa, G. Mezzalira, N. Silveira, S.S.Guterres, A.R. Pohlmann, Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, 313 (2006) 198-205.
- [33] N.A. Peppas, Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 60 (1985) 110–111.
- [34] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-A3. 2008; Wayne, PA.
- [35] M.D. Johnson, C. Macdougall, L. Ostrosky, J.R. Perfect, J.H. Rex, Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (2004) 693–715.
- [36] P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux, controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41 (1995) 2-13.
- [37] S.S. Guterres, V. Weiss, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv.*, 7 (2000) 195-199.
- [38] S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, G. Mezzalira, S.S. Guterres, Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17 (2006) 562-569.
- [39] R. Pandey, Z. Ahmad, S. Sharma, G.K. Khuller, Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 301 (2005) 268–276.
- [40] E.B. Souto, S.A. Wissing, C.M. Barbosa, R.H. Müller, Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.*, 278 (2004) 71–77.
- [41] P. Perugini, S. Simeoni, S. Scalia, I. Genta, T. Modena, B. Conti, F. Pavanetto, Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, 246 (2002) 37-45.

- [42] A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.*, 352 (2008) 1-4.
- [43] J.S. Almeida, F. Lima, S. Da Ros, L.O.S. BUIlhões, L.M. Carvalho, R.C.R. Beck, Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Res. Let.*, 5 (2010) 1603-1610.
- [44] Y.G. Bachhav, V.B. Patravale, Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, *in vitro* evaluation, and stability studies. *AAPS Pharmscitech.*, 10 (2009) 476-481.
- [45] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, W.G. Cook, M.E. Fenton, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6rd edition, 2009.
- [46] K. Dillen, C. Bridts, V.P. Cos, J. Vandervoort, K. Augustyns, W. Stevens, A. Ludwig, Adhesion of PLGA or Eudragit<sup>®</sup>/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*, *Int. J. Pharm.*, 349 (2008) 234–240.
- [47] F. Esmaeili, M. Hosseini-Nasr, M. Rad-Malekshahi, N. Samadi, F. Atyabi, R. Dinarvand, Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-coglycolide nanoparticles. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*, 3 (2007) 161-167.
- [48] H.S. Peng, X.J. Liu, G.X. Lva, B. Suna, Q.F. Kong, D.X. Zhai, Q. Wanga, W. Zhaoa, G.Y. Wang, D.D. Wang, H.L. Li, L.H. Jin, N. Kostulas, Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. *Int. J. Pharm.*, 352 (2008) 29–35.

**CAPÍTULO 3:** Preparação de hidrogéis inéditos contendo nanocápsulas para liberação vaginal do clotrimazol

---

## **CAPÍTULO 3:** Preparação de hidrogéis inéditos contendo nanocápsulas para liberação vaginal do clotrimazol

### **3.1 Apresentação**

No capítulo anterior, foi demonstrado que as nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 contendo clotrimazol, preparadas tanto com triglicerídeos de cadeia média, como com óleo de coco, são sistemas promissores para serem empregados no tratamento da candidíase vulvovaginal. Apesar das nanocápsulas desenvolvidas apresentarem potencial mucoadesivo por serem positivamente carregadas, estas suspensões coloidais, se administradas diretamente na cavidade vaginal, podem resultar em grande perda da formulação por serem líquidas e escorrerem facilmente do local de aplicação. Assim, é desejável que as suspensões contendo os nanocarreadores sejam incorporadas em uma forma farmacêutica com maior capacidade de retenção na cavidade vaginal. Por este motivo, o capítulo 3 desta dissertação diz respeito à preparação de hidrogéis a partir de polímeros mucoadesivos (Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan) e incorporação dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos nestas bases semissólidas.

**PUBLICAÇÃO 4:** Hidrogéis inovadores à base de Pemulen<sup>®</sup>/Pullulan para aplicação vaginal: estudo preliminar da incorporação de nanocápsulas contendo clotrimazol.

---

**Hidrogéis inovadores à base de Pemulen<sup>®</sup>/Pullulan para aplicação vaginal:  
estudo preliminar da incorporação de nanocápsulas contendo clotrimazol.**

**Sara S. Santos<sup>a</sup>, Alessandra Lorenzoni<sup>a</sup>, Scheila R. Schaffazick<sup>a</sup>, Letícia Cruz<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

**Resumo**

Géis hidrofílicos contendo nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100, óleo de coco ou triglicerídeos de cadeia média e clotrimazol foram formulados com os polímeros Pemulen<sup>®</sup> e Pullulan e suas características foram avaliadas. Hidrogéis sem as nanoestruturas foram preparados para fins comparativos e apresentaram pH próximo a 7, enquanto que os géis com nanocápsulas contendo óleo de coco apresentaram pH mais baixo, mais próximo ao pH da mucosa vaginal. O teor de fármaco para todos os géis foi próximo ao teórico (1,0 mg/g). As formulações elaboradas com o mesmo tipo de óleo nas nanocápsulas apresentaram perfis de espalhabilidade semelhantes entre si. O gel contendo nanoestruturas com triglicerídeos de cadeia média apresentou maior fator de espalhabilidade semelhante ao gel controle contendo apenas água. Os hidrogéis desenvolvidos apresentam boas perspectivas de aplicação, entretanto, outras avaliações necessitam ser feitas para uma caracterização completa.

**Palavras chave:** Hidrogel; Pemulen<sup>®</sup>; Pullulan; Clotrimazol; Nanocápsulas.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as formas farmacêuticas empregadas para a administração de fármacos pela via vaginal, os géis têm sido considerados uma das mais promissoras (VERMANI; GARG, 2000; NEVES; BAHIA, 2006). Os géis são formulações constituídas por pequenas quantidades de sólidos (polímero gelificante) que quando dispersos em grandes volumes de líquido formam uma estrutura coloidal tridimensional, sendo esta responsável pela consistência semissólida e aparência transparente ou translúcida (JUSTIN-TEMU *et al.*, 2004). Como vantagens dessa forma farmacêutica, destaca-se a segurança, a versatilidade, o baixo custo em geral, a facilidade de aplicação e o sensorial agradável, sem aspecto untuoso (JUSTIN-TEMU *et al.*, 2004; NEVES; BAHIA, 2006). Além disso, estudos indicam que é a forma farmacêutica preferida pelas mulheres para administração vaginal (HARDY *et al.*, 1998; MORROW *et al.*, 2003). Por outro lado, os géis muitas vezes estão associados a um curto tempo de residência na cavidade vaginal, seja pela renovação do muco, seja pelo escape da formulação a partir do sítio de aplicação (ACARTURK, 2009). Nesse sentido, géis preparados a partir de polímeros mucoadesivos têm sido usados para aumentar o tempo de residência *in situ*, permitindo, assim, a redução do número de aplicações (NEVES; BAHIA, 2006).

Uma classe de polímeros que se destaca pela simplicidade de preparação de hidrogéis e pelo baixo potencial de irritação é a dos Pemulens. Quimicamente, estas macromoléculas são copolímeros reticulados de ácido acrílico e metacrilatos de cadeia longa (SZUCS *et al.*, 2008; SIMOVIC *et al.*, 1999). Recentemente, Szucs e colaboradores (2008) demonstraram a capacidade mucoadesiva de emulsões contendo Pemulens. Outro polímero com potencial bioadesivo pouco estudado é o Pullulan, um polissacarídeo formado por unidades de maltotriose, comumente obtido a partir da fermentação do fungo *Aureobasidium pullulans* (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). A incorporação de Pullulan em hidrogéis de Pemulen<sup>®</sup> poderia ser uma abordagem promissora para a preparação de formulações com propriedades mucoadesivas diferenciadas, as quais poderiam beneficiar o tratamento da candidíase vulvovaginal, bem como o de outras infecções do trato vaginal.

Este grupo de pesquisa tem estudado a potencialidade de suspensões de nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 para a liberação vaginal do clotrimazol no tratamento da candidíase vulvovaginal. Nanocápsulas preparadas com triglicerídeos de cadeia média ou com óleo de coco, como núcleo oleoso, têm demonstrado características físico-químicas apropriadas, boa estabilidade/fotoestabilidade, liberação prolongada do clotrimazol e atividade antifúngica

contra *Candida* spp (dados ainda não publicados). Entretanto, por se tratarem de formulações líquidas, estas não são formas adequadas a serem aplicadas na cavidade vaginal devido à elevada tendência de escape da formulação após a aplicação.

Levando em consideração as potencialidades dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos até o momento, aliado às vantagens da utilização de géis preparados a partir de substâncias mucoadesivas, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da preparação de géis de Pemulen<sup>®</sup> com Pullulan e de incorporação de suspensões de nanocápsulas de clotrimazol a estes. Cabe ressaltar que não há relatos na literatura sobre a combinação dos dois polímeros propostos para a preparação de géis.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Clotrimazol (99.22 %, w/w) foi obtido da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). Eudragit<sup>®</sup> RS100 (Röhm Pharma, Alemanha) foi gentilmente doado pela Almapal (São Paulo, Brasil). Span 80<sup>®</sup> (monoestearato de sorbitano) foi adquirido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) e Tween 80<sup>®</sup> (polissorbato 80) da Delaware (Porto Alegre, Brasil). O óleo de coco virgem foi doado pela TheraHerb (Niterói, Brasil). Triglicerídeos de cadeia média foram obtidos da Brasquim (Porto Alegre, Brasil). Pemullen TR1<sup>®</sup> e Pullulan foram gentilmente doados pela Dinaco (Rio de Janeiro, Brasil) e Corn products (São Paulo, Brasil), respectivamente. Metanol grau HPLC foi adquirido da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os outros solventes e reagentes são de grau analítico e foram utilizados como recebidos.

### **2.2 Preparação de suspensões de nanocápsulas e determinação do teor de fármaco**

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas em triplicata pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1988). Uma solução acetônica (27 mL), contendo triglicerídeos de cadeia média ou óleo de coco virgem (0,3 g), monoestearato de sorbitano (0,077 g), Eudragit<sup>®</sup> RS100 (0,100 g) e o clotrimazol (0,02 g), foi vertida através de um funil em 53 mL de uma dispersão aquosa de polissorbato 80 (0,077 g). Após 10 minutos sob agitação magnética, a suspensão foi concentrada em rotaevaporador para ajuste do volume final (10 mL) e eliminação do solvente orgânico. Com fins comparativos, formulações sem o fármaco foram preparadas.

Após a preparação, uma alíquota de 60 µL da suspensão de nanocápsulas foi diluída com metanol em balão volumétrico de 10 mL a fim de extrair o fármaco das nanoestruturas. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm para injeção no sistema cromatográfico e determinação do teor. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna de fase reversa Phenomenex (250 x 4,60 mm, tamanho de partícula 5 µm), fase móvel metanol e água (90:10) em fluxo isocrático de 1 mL/min, com volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada em 229 nm (SANTOS *et al.*, 2012).

### 2.3 Preparação dos hidrogéis

Os géis foram preparados usando gral e pistilo de vidro para obtenção de 10 g de formulação na concentração de 1,0 mg/g de fármaco. Para tanto, o Pemulen TR1<sup>®</sup> (0,05 g) foi triturado no gral e, a seguir, a água destilada (5 mL) foi incorporada lentamente. Na sequência, a trietanolamina foi adicionada para neutralizar o pH e formar o gel. Após a formação do gel, o Pullulan (0,25 g) foi acrescentado e um volume fixo (5 mL) de suspensão de nanocápsulas, ou de dispersão aquosa do fármaco em Tween 80<sup>®</sup> (2 mg/mL), ou de água pura foi adicionado vagarosamente. Ao final, 100 µL de solução de imiduréia 50% (conservante) foi acrescentado. Os hidrogéis foram preparados em triplicata.

### 2.4 Caracterização dos hidrogéis

Após a preparação, as formulações foram caracterizadas quanto ao aspecto, cor, odor, teor de clotrimazol, pH e espalhabilidade. Todos os parâmetros foram determinados em triplicata. Para o doseamento do clotrimazol nas formulações, o fármaco foi extraído do gel. Para tanto, uma porção deste foi colocada em um erlenmeyer com água ultrapura e esta permaneceu sob agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente. Após, uma alíquota da solução foi dissolvida em metanol em balão volumétrico a fim de extrair o fármaco das nanoestruturas. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm para injeção no sistema cromatográfico.

Para a determinação do pH, os géis foram diluídos a 10% em água destilada e as avaliações foram feitas em potenciômetro previamente calibrado (Model pH 21, Hanna Instruments, São Paulo, Brasil), à temperatura ambiente.

O estudo da espalhabilidade dos hidrogéis foi realizado segundo a metodologia descrita por Borghetti e Knorst (2006). A amostra foi introduzida em um orifício central de 1

cm de diâmetro de uma placa molde circular de vidro assentada em uma base quadrangular posicionada sobre uma escala milimetrada e uma fonte luminosa. A superfície foi nivelada com uma espátula, sendo este molde retirado cuidadosamente. A seguir foi colocada uma placa de vidro de massa conhecida sobre a formulação provocando o seu espalhamento sobre a base. A medida do raio espalhado (em milímetros) foi determinada em cada quadrante da base com auxílio do papel milimetrado. Na sequência, acrescentaram-se sucessivamente outras placas em intervalos de um minuto entre cada uma, sendo o raio espalhado determinado ao final de cada tempo. As placas foram adicionadas até 3 leituras iguais de raio. Ao final, calculou-se o diâmetro médio a cada minuto e a área espalhada foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4 \quad (1)$$

Onde  $E_i$  é espalhabilidade da amostra ( $\text{mm}^2$ ) para um determinado peso  $i$  (g) e  $d$  é o diâmetro médio. A área de difusão foi expressa em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado para se obter os perfis de espalhabilidade.

O fator de espalhabilidade ( $E_f$ ) também foi calculado e representa o quanto uma formulação é capaz de se expandir sobre uma superfície lisa horizontal quando um peso é adicionado nas condições descritas na metodologia acima. A seguinte equação (Equação 2) foi utilizada para o cálculo deste fator (MARCHIORI *et al.*, 2010):

$$E_f = A/P \quad (2)$$

Em que  $E_f$  ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) é o fator de espalhabilidade resultante a partir da razão entre a área máxima do círculo formado ( $A$ ), em  $\text{mm}^2$ , após a adição da sequência de pesos utilizada e o peso total ( $P$ ), em gramas.

## 2.5 Análise estatística

As formulações foram preparadas e analisadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O programa estatístico SigmaStat, versão 3.5 (Jandel Scientific, EUA) foi o software utilizado para as análises de variância (ANOVA) e post-hoc de comparações múltiplas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o preparo, todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, opalescente e reflexo azulado, resultante do movimento browniano das estruturas coloidais. Independentemente do óleo utilizado, as formulações apresentaram um teor de fármaco muito próximo ao teórico (2,0 mg/mL).

Os hidrogéis contendo as suspensões de nanocápsulas apresentaram-se como semissólidos visualmente homogêneos, com superfície brilhante e levemente opalescentes, sem odor aparente. Por sua vez, os géis com água e fármaco livre apresentaram-se mais transparentes, mas com a mesma aparência dos outros géis. Na Tabela 1 estão descritas as demais características.

Tabela 1- Valores de pH, teor (mg/g) e fator de espalhabilidade dos hidrogéis (n=3).

Formulações	pH	Teor (mg/g)	$E_f$ (mm <sup>2</sup> /g)
GAG	7,51 ± 0,25	-	3,00 ± 0,08
GFL	7,60 ± 0,25	1,02 ± 0,01	1,64 ± 0,05
GNCOCB	6,70 ± 0,08	-	1,17 ± 0,01
GNCOC	6,88 ± 0,26	0,99 ± 0,01	1,26 ± 0,07
GNCTCMB	7,87 ± 0,13	-	2,64 ± 0,22
GNCTCM	7,79 ± 0,14	1,01 ± 0,05	3,03 ± 0,10

GAG: gel base; GFL: gel com a dispersão de Tween 80 e clotrimazol (fármaco livre); GNCOCB: gel com nanocápsulas de óleo de coco sem fármaco; GNCOC: gel com nanocápsulas de óleo de coco com fármaco; GNCTCMB: gel com nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média sem fármaco; GNCTCM: gel com nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média com fármaco.

Os géis preparados somente com água ou com a dispersão de clotrimazol apresentaram valores de pH próximos de 7,5, enquanto que o pH dos géis contendo nanocápsulas preparadas com triglicerídeos de cadeia média foi ligeiramente mais alcalino. Por outro lado, os géis contendo as nanocápsulas preparadas com óleo de coco apresentaram pH estatisticamente inferior, por volta de 6,8, resultado que pode ser considerado positivo, visto que um pH mais ácido é mais compatível com o pH vaginal. Além disso, é importante mencionar que Bachhav e Patravale (2009) demonstraram que o pH de um gel comercial contendo clotrimazol (Candid-V<sup>®</sup>) também foi de 6,8. Assim, os géis preparados com nanocápsulas de óleo de coco parecem ser mais adequados no que diz respeito ao pH, sem necessidade de ajuste posterior.

Com relação ao teor de clotrimazol nos géis, todas as formulações apresentaram valores próximos ao teórico, ou seja, de 1,0 mg/g. Esta concentração foi planejada com base

na maioria dos produtos que contém clotrimazol para uso vaginal disponíveis no mercado brasileiro. Dado que o clotrimazol é uma substância muito lipofílica e de difícil incorporação em veículos hidrofílicos, pode-se dizer que o nanoencapsulamento deste fármaco possibilitou sua incorporação em um veículo hidrofílico.

Considerando a espalhabilidade, esta é definida como a expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo (BORGHETTI & KNORST, 2006). A Figura 1 mostra o perfil de espalhabilidade dos géis preparados. Pela análise dos resultados, pode-se perceber que a presença do fármaco nas nanoestruturas não influenciou a espalhabilidade, visto que os perfis das formulações contendo clotrimazol foram muito semelhantes aos dos géis contendo nanocápsulas apenas. Além disso, pela comparação dos fatores de espalhabilidade, as formulações preparadas com nanocápsulas de óleo de coco apresentaram valores significativamente inferiores aos das formulações preparadas com triglicerídeos de cadeia média, sendo que estas últimas mostraram fator de espalhabilidade comparável ao do gel preparado com água. Visto que a espalhabilidade é influenciada pela viscosidade, provavelmente as nanocápsulas contendo óleo de coco apresentam uma viscosidade maior, o que poderia ter resultado na formação de um gel com menor tendência ao espalhamento. Considerando que a espalhabilidade é um fator importante no recobrimento uniforme e na retenção da formulação na superfície vaginal (GARG *et al.*, 2002), os perfis obtidos para os géis contendo ambos os tipos de nanocápsulas indicam que estes propiciam fácil espalhamento.

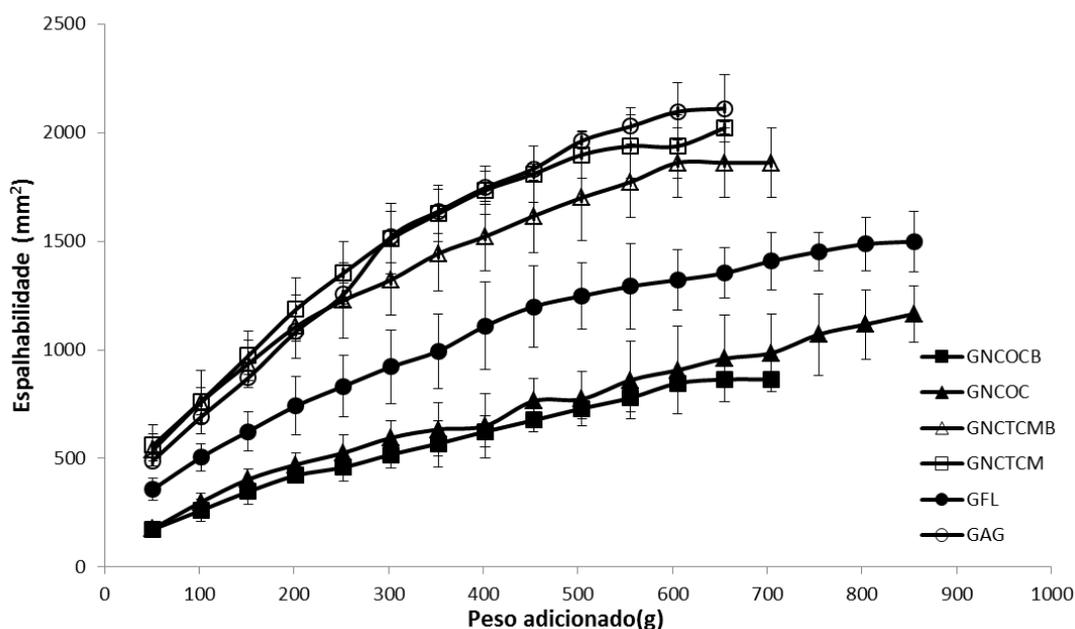


Figura 1- Representação gráfica das espalhabilidades dos hidrogéis ( $n=3$ ).

## 4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a viabilidade de preparação de novos hidrogéis a partir de Pemulen® e Pullulan e incorporação de suspensões de nanocápsulas de clotrimazol. Os géis apresentaram características adequadas, sendo considerados promissores para aplicação vaginal no tratamento de infecções fúngicas. Estudos adicionais devem ser conduzidos para uma caracterização completa das formulações semissólidas desenvolvidas.

## 5. REFERÊNCIAS

ACARTURK, F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 193-205, 2009.

BACHHAV, Y.G.; PATRAVALE, V.B. Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, *in vitro* evaluation, and stability studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 476-481, 2009.

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, n. 4, p. 531-537, 2006.

CHENG, K.C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J.M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29-44, 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. European Patent 0274961 A1, 1988.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S; SINGLA, A.K. spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, p 84-105, 2002.

HARDY, E. JIMENEZ, A.L.; PADUA, K.S.; ZANEVELD, L.J.D. Women's preferences for vaginal antimicrobial contraceptives III. **Contraception**, v. 58, p. 245-249, 1998.

JUSTIN-TEMU, M.; DAMIAN, F.; KINGET, R.; MOOTER, G.V.D. Intravaginal gels as drug delivery systems. **Journal of Women's Health**, v.13, n. 7, p. 834-844, 2004.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. Compositae. (Marcela) Porto**

Alegre, 1991. 228p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

MARCHIORI, M.L.; LUBINI, G.; NORA, G.D.; FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; OURIQUE, A.F.; BASTOS, M.O.; RIGO, L.A.; SILVA, C.B.; TEDESCO, S.B.; BECK, R.C.R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010.

MORROW, K.; ROSEN, R.; RICHTER, L.; EMANS, A.; FORBES, A.; DAY, J.; MORAR, N.; MASLANKOWSKI, L.; PROFY, A.T.; KELLY, C.; KARIM, S.S.A.; MAYER, K.H. The acceptability of an investigational vaginal microbicide, PRO 2000 gel, among women in a phase I clinical trial. **Journal of Women's Health**, v.12, n. 7, p. 655-666 , 2003.

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

SANTOS, S.S.; FERREIRA, L.M.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. A simple RP-HPLC method for the determination of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 482-6, 2012.

SIMOVIC, S.; TAMBURIC, S.; MILIC-ASKRABIC, J.; RAJIC, D. An investigation into interactions between polyacrylic polymers and a non-ionic surfactant: an emulsion preformulation study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, p. 207–217, 1999.

SZUCS, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C.M.; VAGHI, P.; SZABO-REVESZ, P.; EROS, I. Mucoadhesive behaviour of emulsions containing polymeric Emulsifier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 226–235, 2008.

VERMANI, K.; GARG, S. The scope and potential of vaginal drug delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 10, p. 359-364, 2000.



## DISCUSSÃO GERAL

Em algumas situações, a liberação de fármacos em seus respectivos receptores biológicos apresenta obstáculos que impedem que o princípio ativo, nas formulações convencionais, alcance o local específico de ação, devido a sua baixa estabilidade e o transporte limitado através do epitélio. Neste sentido, sistemas nanoestruturados têm sido considerados como alternativas para vetorização de fármacos, pois apresentam capacidade de controlar a liberação e o transporte de fármacos para locais de ação específicos, o que reduz a frequente administração para manter os níveis terapêuticos (BARRATT, 2000; NIMESH *et al.*, 2006).

Uma limitação no tratamento das candidíases vulvovaginais com clotrimazol é que as pacientes relatam casos de irritação, ardor, desconforto na aplicação das pomadas, além de extravasamento da formulação (SOBEL, 2007). Na literatura há diversos estudos para contornar estes problemas e com o objetivo de aumentar a adesão das pacientes ao tratamento (PAVELIC *et al.*, 1999; KAST *et al.*, 2002; MEMISOGLU *et al.*, 2003; SOUTO *et al.*, 2004; PRABAGAR *et al.*, 2007; SHAHIN *et al.*, 2011; BORHADE *et al.*, 2012;). Valenta (2005) salienta a necessidade do uso de polímeros mucoaderentes para formulações para a via vaginal. A via vaginal é adequada para sistemas de liberação de fármacos com carreadores bioadesivos a fim de reter os princípios ativos para o tratamento local (ACARTÜRK, 2009).

Partindo dessas considerações, o presente estudo mostrou a viabilidade de preparação de suspensões de nanocápsulas contendo clotrimazol a partir de dois tipos de núcleo oleoso, formados por triglicerídeos de cadeia média (TCM) ou óleo de coco virgem, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Apesar de ainda pouco explorado, na literatura já foi relatado o emprego de óleos vegetais no preparo de tais estruturas, porém as nanopartículas poliméricas com óleo de coco virgem são inovadoras. O polímero utilizado na composição das nanocápsulas foi o Eudragit® RS100, um polimetacrilato biocompatível, com propriedades mucoadesivas devido ao seu caráter catiônico (PIGNATELLO *et al.*, 2002; PIGNATELLO *et al.*, 2006), característica a qual vai ao encontro da proposta do trabalho, que foi de aumentar o tempo de residência do antimicrobiano na região vulvovaginal e promover uma liberação controlada.

Inicialmente, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) validada que permitisse o doseamento do fármaco incorporado nas suspensões de nanocápsulas. Os resultados demonstraram que o método de CLAE desenvolvido foi linear para a faixa de concentração estudada (2 a 10 µg/mL), preciso,

exato, robusto, específico e reprodutível. Ressalta-se que este método demonstrou o uso de um comprimento de onda até então não relatado na literatura para o clotrimazol (229 nm), um baixo limite de detecção e quantificação e a não utilização de tampões na fase móvel. A mesma validação foi feita para determinação do clotrimazol, tanto nas nanopartículas contendo TCM, quanto óleo de coco.

A tendência da utilização de matérias-primas de origem vegetal tem sido crescente. Este fato pode estar associado a diversos fatores, entre os quais, a preferência dos consumidores por produtos naturais e a tendência à redução do consumo de energia e recursos, aumentando assim a busca por novas tecnologias e matérias-primas. Na área da nanotecnologia, observa-se que os óleos vegetais estão aos poucos sendo empregados (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; FRIEDRICH *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2009; CONTRI *et al.*, 2012). O óleo de coco virgem é um óleo vegetal de atual interesse popular, porém com propriedades terapêuticas ainda pouco elucidadas pela literatura. Este óleo é empregado popularmente por seus efeitos antioxidante, emagrecedor, antifúngico e pela elevação do colesterol HDL, entre outros. Existem ainda poucos trabalhos investigando seu potencial antimicrobiano (OGBOLU *et al.*, 2007; AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010; DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

A viabilidade da preparação das nanocápsulas de óleo de coco ou de TCM e a possibilidade da combinação com o Eudragit<sup>®</sup> RS100 foi estudada a partir do teste de dissolução/inchamento do polímero. Para a formação do invólucro polimérico das nanocápsulas, é fundamental que o óleo ou a água não dissolva o polímero (GUTERRES *et al.*, 2000). Após 60 dias do polímero imerso em ambos os óleos, não houve diferença significativa no peso dos filmes poliméricos ( $p < 0,05$ ). Este resultado, tanto para o óleo de coco quanto para os TCM, assegura que estes óleos são próprios para compor o núcleo oleoso das nanocápsulas e que não há interação entre o polímero e os óleos, indicando que a parede polimérica das nanocápsulas não irá dissolver-se no núcleo oleoso ou se desestruturar durante o armazenamento.

Foi possível obter sistemas nanoestruturados contendo clotrimazol, sejam eles nanocápsulas contendo TCM ou óleo de coco como núcleo oleoso, por meio da deposição interfacial do polímero pré-formado. Após a preparação das nanopartículas, procedeu-se a avaliação das características físico-químicas dos sistemas obtidos. A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada preparando-se três lotes que foram mantidos por 60 dias ao abrigo da luz para o estudo de estabilidade.

Após a preparação, a análise macroscópica das nanocápsulas revelou que estas se apresentaram como um líquido leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (Efeito Tyndall). Além disso, é importante salientar que nenhuma das formulações apresentou precipitação visível. De uma forma geral, os sistemas apresentaram teores de clotrimazol próximos aos teóricos, distribuição de tamanho de partícula unimodal, índice de polidispersão menor que 0,17 e demonstram que, para a maioria das formulações, a ausência ou a presença do fármaco em diferentes concentrações não é significativa para esses parâmetros. A eficiência de encapsulamento foi próxima de 100% e não foi influenciada pela composição do núcleo oleoso da partícula, fato que foi atribuído à alta lipofilia do clotrimazol. Os resultados deste trabalho demonstram eficiência de encapsulamento do clotrimazol superior a outros sistemas nanoestruturados relatados na literatura. Nanoesferas de alginato e PLGA apresentaram eficiências de encapsulamento de 90% e 48%, respectivamente (PANDEY *et al.*, 2005), enquanto que NLS e CLN mostraram 65% e 70% de eficiência de encapsulamento, respectivamente (SOUTO *et al.*, 2004). Levando-se em consideração dados da literatura em que potenciais zeta de nanoemulsões contendo TCM (HATANAKA *et al.*, 2008) ou óleo de coco (PIRIYAPRASARTH *et al.*, 2012) são negativos, os valores positivos encontrados neste trabalho atestam que há uma camada polimérica contínua ao redor dos núcleos oleosos. O pH das formulações, após a preparação, apresentaram valores entre 5,0 e 5,7, esses valores estão em conformidade com outro trabalho da literatura que utilizou o mesmo polímero no preparo de nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

A estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas foi avaliada à temperatura ambiente, com proteção da luz, por 60 dias. As formulações preparadas foram estáveis macroscopicamente após este período, sem mudanças aparentes. Por meio do estudo comparativo entre as nanocápsulas e nanoesferas, verificou-se que a presença dos óleos (TCM ou óleo de coco) foi importante para evitar a diminuição no teor total de fármaco como apresentado pelas nanoesferas (25% em 60 dias). Com exceção das nanocápsulas de óleo de coco com 2 mg/mL de clotrimazol, as formulações não apresentaram diferença significativa após 60 dias em relação a distribuição de tamanho, demonstrando que a adição de fármaco na formulação não alterou este parâmetro. Entre as formulações de nanocápsulas contendo óleo de coco houve uma pequena diferença, porém estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), no pH das nanopartículas em duas das três concentrações estudadas, pois estas apresentaram valores médios no tempo inicial de 5,6 e final de 4,8. A alteração desses valores após 60 dias pode estar relacionada diretamente com a degradação de componentes presentes na formulação.

Considerando que o pH vaginal (3,5 a 4,5) não se altera durante infecções por candidíase (SOBEL; FARO; FORCE, 1998; SOBEL, 2007), estes pHs relativamente baixos são uma característica positiva, pois mostram compatibilidade com a via de administração pretendida. O potencial zeta, após o período de estabilidade, apresentou um aumento discreto no valor para todas as formulações, o que pode sugerir uma maior estabilização do sistema (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Além da caracterização físico-química das formulações, foi avaliada a estabilidade do clotrimazol nanoencapsulado frente à luz UVC. O nanoencapsulamento do clotrimazol aumentou sua estabilidade de 26,05 % (solução metanólica de clotrimazol) para 69,75 % (nanocápsula de TCM) e para 74,15 % (nanocápsula de óleo de coco) da concentração inicial em 14 horas sob radiação UVC. Além da capacidade da parede polimérica de proteger o fármaco (OURIQUE *et al.*, 2008), a maior proteção conferida pelas suspensões de nanocápsulas de óleo de coco frente a fotodegradação pode ser atribuída ao seu potencial antioxidante (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; MARINA *et al.*, 2009; DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Resultado semelhante foi descrito por Lee e colaboradores (2008) quando NLS contendo óleo de coco protegeram a tretinoína frente à radiação UV.

O estudo de liberação *in vitro* das suspensões de nanocápsulas foi conduzido a partir da técnica de difusão em sacos de diálise, no qual foi possível observar os perfis de liberação a partir das diferentes formulações. As suspensões foram capazes de diminuir a velocidade de liberação do clotrimazol em tampão acetato pH 4,5 com 30% de etanol, comparativamente à solução do fármaco puro. Após 24 horas de experimento, as soluções de fármaco livre (1 e 3 mg/mL) já haviam liberado praticamente 100% do clotrimazol, enquanto que 66% e 58% de fármaco foram liberados a partir das nanocápsulas de TCM de 1 e 3 mg/mL de fármaco, respectivamente. Para as nanocápsulas de óleo de coco, o percentual liberado em 24 horas foi de aproximadamente de 71%, independentemente do teor de fármaco. Comparando-se as formulações preparadas com ambos os óleos nas duas concentrações estudadas (1 e 3 mg/mL), as formulações de TCM apresentaram uma liberação um pouco mais lenta. As diferentes velocidades de liberação podem ser atribuídas a uma discreta diferença de solubilidade do fármaco nos dois óleos, uma vez que o clotrimazol está aproximadamente todo encapsulado, e/ou da viscosidade dos núcleos oleosos. No trabalho de Rigo (2011), nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os óleos de arroz, soja e girassol apresentaram diferentes perfis de liberação do dipropionato de clobetasol. Reproduziu-se o núcleo das nanocápsulas (óleo + tensoativo) e foi avaliada a viscosidade destas dispersões lipídicas. Foi constatado que a menor velocidade de liberação do fármaco coincidiu com o núcleo oleoso

mais viscoso. Lee e colaboradores (2008) descreveram NLS formuladas com três diferentes concentrações de óleo de coco e estudaram o perfil de liberação da tretinoína a 37°C. Os resultados mostraram que a partícula que continha a maior quantidade de óleo liberou o fármaco mais rapidamente.

Os resultados da modelagem matemática mostraram que a liberação do clotrimazol a partir das nanocápsulas segue cinética de primeira ordem, independente do óleo utilizado. É importante comentar que não foi observada uma liberação inicial abrupta do fármaco (efeito *burst*). A fase *burst* geralmente é atribuída à porção de fármaco que está mais superficialmente localizada na partícula e, portanto, mais disponível para ser liberada rapidamente (CRUZ *et al.*, 2006). Assim, a ausência de uma primeira etapa nos perfis de liberação do clotrimazol a partir das nanocápsulas corrobora o resultado obtido para a eficiência de encapsulamento, ou seja, reforça a ideia de que o fármaco esteja totalmente contido no núcleo das nanocápsulas. O tempo de meia vida do fármaco foi maior para as formulações contendo TCM do que aquelas com óleo de coco, porém ambas apresentaram tempo de meia vida mais do que 7 vezes maior do que o observado para o fármaco em solução. Quanto à modelagem utilizando a equação de Korsmeyer-Peppas, o mecanismo de liberação indicado foi transporte anômalo (não Fickiano), sendo que a liberação do fármaco pode ser explicada pelo inchamento ou relaxamento das cadeias do polímero seguido de difusão do fármaco para o meio externo. Outros estudos mostram a liberação de fármacos por transporte anômalo a partir de nanopartículas de Eudragit<sup>®</sup> RS (PIGNATELLO *et al.*, 2002; IBRAHIM; EL-LEITHY; MAKKY, 2010; CONTRI *et al.*, 2011). O Eudragit<sup>®</sup> RS100 é um polímero insolúvel em meio aquoso, independente do pH (ROWE *et al.*, 2009). No estudo de Barzegar-Jalali e colegas (2012), foi demonstrado que quanto maior a quantidade deste polímero na composição das nanopartículas, mais lenta foi a liberação do diclofenaco sódico. O controle da liberação do clotrimazol a partir das nanoestruturas pode contribuir para um efeito antimicrobiano sustentado, possibilitando a diminuição do número de doses no tratamento de candidíases vulvovaginal.

Para a avaliação microbiológica das nanopartículas optou-se pelo método da microdiluição utilizando-se três espécies de *Candidas*: *albicans*, *glabrata* sensível e *glabrata* resistente ao fluconazol. O estudo foi realizado com a colaboração do professor Sydney Alves, do Departamento de Microbiologia da UFSM. Este estudo corrobora as informações encontradas na literatura que indicam a atividade antifúngica do óleo de coco contra espécies de *Candida* (OGBOLU *et al.*, 2007; AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010). Por outro lado, o TCM não apresentou atividade antifúngica na solução metanólica ou nas nanocápsulas

brancas ( $CIM \geq 1600$ ). Entretanto, as nanocápsulas de TCM contendo clotrimazol apresentaram atividade antifúngica contra as três espécies de *Candida* comparável com uma solução do fármaco e TCM na mesma concentração. Além de apresentar atividade antifúngica, o óleo de coco não perdeu sua atividade após a incorporação na nanoestrutura e, em associação com o fármaco, apresentou maior inibição do crescimento microbiano do que as nanopartículas de TCM com clotrimazol. Isso se deve à já relatada atividade antifúngica do óleo de coco, principalmente contra *Candida albicans*, devido à presença dos ácidos graxos saturados como láurico, caprílico e cáprico e monoglicerídeos (BERGSSON *et al.*, 2001; OGBOLU *et al.*, 2007). O Eudragit<sup>®</sup> RS100, devido às suas propriedades mucoadesivas, pode ter promovido uma adesão das nanopartículas às células fúngicas, como postulado em outros trabalhos (DILLEN *et al.*, 2008; MOHAMMADI *et al.*, 2011) e, assim, pode ter promovido uma liberação mais íntima do fármaco e do óleo, resultando numa rápida internalização nas células fúngicas. Outros autores hipotetizaram que devido ao tamanho reduzido e ao fato das suspensões serem aquosa, as nanopartículas podem ser internalizadas pelas células fúngicas, promovendo uma liberação do fármaco dentro da célula (ESMAIELI *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2008). Segundo PATEL (2010), a liberação controlada do fármaco a partir das nanoestruturas pode prolongar o tempo de ação do fármaco, pois este não está totalmente disponível e livre para ser consumido.

Para entender a interação do clotrimazol com os óleos nas soluções e suspensões de nanocápsulas, calculou-se o índice de concentração fracionária mínima (FICI) destas combinações. Os resultados mostraram atividade indiferente ( $1,0 \leq FICI \leq 4,0$ ) para as nanopartículas de óleo de coco e TCM contendo o fármaco e para solução metanólica do TCM com clotrimazol. A indiferença significa que o efeito antimicrobiano é atribuído ao componente mais ativo, neste caso, o clotrimazol. A solução metanólica de óleo de coco com o fármaco apresentou antagonismo, este fato se deve aos valores de CIMs maiores apresentados comparado com os CIMs dos componentes separados em solução. Considerando estes resultados, as nanocápsulas desenvolvidas podem ser formulações promissoras para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

A etapa seguinte consistiu na incorporação das nanopartículas em géis hidrofílicos visando uma forma farmacêutica final. Devido à elevada insolubilidade em água do clotrimazol, as formulações disponíveis no mercado são de base lipofílica, como por exemplo, pomadas. Os hidrogéis foram escolhidos para incorporação das nanopartículas por ter sensorial agradável e por terem um aspecto menos untuoso. A seleção de polímeros Pemulen<sup>®</sup>

e Pullulan para a preparação dos géis teve como objetivo obter uma formulação com potencial de residir por um longo período no local de ação e, assim, tornar o tratamento mais eficaz.

O Pemulen<sup>®</sup>, um polímero conhecido por suas propriedades mucoadesivas, é um copolímero do ácido acrílico e metacrilatos de cadeias longas (acrilato/C10-C30). Forma gel em pH próximo ao da neutralidade, a exemplo do Carbopol<sup>®</sup> e seus derivados (CORREA *et al.*, 2005; SZUCS *et al.*, 2008). Uma vantagem importante deste polímero é o baixo grau de irritação, dado que está relacionado às baixas concentrações geralmente empregadas (inferiores a 1%) (NOVEON, 2003). Por essas características, o Pemulen<sup>®</sup> foi escolhido como polímero formador do gel neste trabalho. Com relação ao Pullulan, este polissacarídeo formado por unidades de maltotriose se destaca por ser atóxico e não irritante, além de ter potencial bioadesivo (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Este polímero não forma gel verdadeiro, mas forma dispersões aquosas viscosas com aparência de gel. Por estas razões, o Pullulan foi adicionado no gel de Pemulen<sup>®</sup> pensando-se em obter um hidrogel com propriedades mucoadesivas superiores. Cabe mencionar novamente que a combinação destes dois polímeros é inédita.

Com relação aos resultados, estes demonstraram a possibilidade de preparação dos géis com as suspensões de nanocápsulas com ambos os óleos. Os géis foram caracterizados através da determinação do teor, pH e espalhabilidade. Visualmente, as formulações de hidrogéis apresentaram aspecto homogêneo e coloração ligeiramente opalescente, com exceção dos hidrogéis controles (sem nanopartículas). Os teores ficaram próximos ao teórico e o pH dos géis foi de aproximadamente 7. O tipo de óleo no núcleo da nanocápsula influenciou no valor e no perfil de espalhabilidade. A espalhabilidade está intimamente relacionada com sua aplicação no local de absorção ou ação desejada, e a viscosidade está intimamente relacionada com esta característica (BORGHETTI & KNORST, 2006). As formulações contendo as nanocápsulas de óleo de coco apresentaram menores fatores de espalhabilidade, independente da presença do fármaco. Cabe ressaltar que esta parte do trabalho teve um caráter preliminar e para uma avaliação completa do hidrogéis preparados, outras caracterizações devem ser feitas.



## CONCLUSÕES

- A metodologia analítica desenvolvida para a quantificação do clotrimazol nas nanocápsulas poliméricas mostrou-se linear, precisa, exata e robusta;
- Foi possível a obtenção de suspensões de nanocápsulas contendo clotrimazol a partir do método de precipitação do polímero pré-formado na presença de triglicerídeos de cadeia média e de óleo de coco;
- As suspensões de nanocápsulas desenvolvidas apresentaram parâmetros físico-químicos adequados e foram estáveis por 60 dias, com exceção do pH que apresentou um decréscimo significativo para algumas formulações;
- As nanopartículas promoveram uma menor degradação do clotrimazol frente à radiação UVC comparado com o fármaco não-encapsulado;
- O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que as nanopartículas são capazes de controlar a liberação do fármaco e a modelagem matemática indicou cinética de primeira ordem para todas as formulações;
- Por meio da avaliação microbiológica, foi demonstrado que o óleo de coco possui atividade antimicrobiana contra espécies de *Candida*. As nanopartículas demonstraram melhor inibição de crescimento fúngico que as soluções de fármaco livre e óleos associados;
- As formulações de nanocápsulas de óleo de coco apresentaram um maior efeito antifúngico em comparação com as formulações de nanocápsulas contendo triglicerídeos de cadeia média;
- O estudo realizado indica que as suspensões de nanocápsulas contendo clotrimazol podem ser incorporadas em formulações semissólidas hidrofílicas, que apresentaram características adequadas de pH, teor e espalhabilidade.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOETY, E.M.; KHATTAB, F.I.; KELANI, K.M.; ABOUAL-ALAMEIN, A.M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. **II Farmaco**, v. 57, p. 931-938, 2002.
- ACARTURK, F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 193-205, 2009.
- ADAD, S.J.; LIMA, R.V.; SAWAN, Z.T.E. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. **São Paulo Medical Journal**, v. 119, n. 6, p. 200-205, 2001.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of plant oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 43, n. 5, p. 447-451, 2010.
- ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PEASE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.
- ALMEIDA, J.S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L.O.S.; CARVALHO, L.M.; BECK, R.C.R. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.
- ALONSO, M.J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.
- ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p. 215-220, 2007.
- ARORA, R.; CHAWLA, R.; MARWAH, R.; ARORA, P.; SHARMA, R.K.; KAUSHIK, V. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of

novel H1N1 flu (Swine flu) pandemic: thwarting potential disasters in the Bud.

**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª edição, Editora Artmed Porto Alegre, 2005.

BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BARZEGAR-JALALI, M.; ALAEI-BEIRAMI, M.; JAVADZADEH, Y.; MOHAMMADI, G.; HAMIDI, A.; ANDALIB, S.; ADIBKIA, K. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–Eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. **Powder Technology**, v. 219, p. 211–216, 2012.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3209–3212, 2001.

BORHADE, V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation, **International Journal of Pharmaceutics**. In press (2012).

BOUCHEMAL, K; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET, I.; ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(etherurethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 89-100, 2004.

BURGESS, M.A.; BODEY, G.P. Clotrimazole: *In vitro* and clinical pharmacological studies, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, p. 423-426, 1972.

CHANG, J.Y.; OH, Y-K.; KONG, H.S. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 39-50, 2002.

CONTRI, R. V.; KAISER, M.; POLETTO, F. S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2398-2406, 2011.

CONTRI, R.V.; RIBEIRO, K.L.F; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, p. 1-12, 2012.

CORREA, N.F.; JÚNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; GILLIAN, B.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, V. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, 198-205, 2006.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; MOOTER, G.V.; LUDWIG, A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit<sup>®</sup> RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.314, p. 72–82, 2006.

DILLEN, K.; BRIDTS, C.; COS, V.P.; VANDERVOORT, J.; AUGUSTYNS, K.; STEVENS, W.; LUDWIG, A. Adhesion of PLGA or Eudragit<sup>®</sup>/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 234–240, 2008.

ESMAEILI, F.; HOSSEINI-NASR, M.; RAD-MALEKSHAHI, M.; SAMADI, N.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-coglycolide nanoparticles **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 161-167, 2007.

FARMACOPÉIA BRITÂNICA, Londres: Her Majesty.s Stationary Office; v.1, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. European Patent 0274961 A1, 1988.

FLORES, F.C.; **Sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia***: desenvolvimento de formulações e atividade biológica, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as way to control de release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-10, 2009.

FONTANA, M.C.; REZER, J.F.P.; CORADINI, K.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R., Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

GABRIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. **Journal of Biomedical and Biophysics Methods**, v. 56, p.189-217, 2003.

GAGLIARDI, L.; ORSI, D.; CHIMENTI, P.; PORRA, R.; TONELLI, D. HPLC Determination of imidazole antimycotis in antidandruff cosmetic products. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1195- 1197, 2003.

GARAY-JIMENEZ, J.C.; GERGERESA, D.; YOUNG, A.; LIM, D.V.; TUROS, E.; Physical properties and biological activity of poly(butyl acrylate–styrene) nanoparticle emulsions prepared with conventional and polymerizable surfactants. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, p. 443–451, 2009.

GINO-CANESTEN, creme vaginal, Responsável Técnico: Braulio Lordêllo - CRF-SP 9496, Bayer S.A. - São Paulo, SP. Bula de remédio.

GUARTE, R.C; MFIHLBAUER, W.; KELLERT, M. Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, p. 361-372, 1996.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R.K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 6, p. 324–333, 2010.

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7. p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S.S.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas Células-tronco, Terapia gênica e Nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, Cap. 17, p. 247-264, 2007b.

HATANAKA, J.; KIMURA, Y.; LAI-FU, Z.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q10 formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 112-17, 2008.

HASHEM, F.M.; SHAKER, D.S.; GHORAB, M.K.; NASR, M.; ISMAIL, A. Formulation, characterization, and clinical evaluation of microemulsion containing

clotrimazole for topical delivery, **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, p. 879-886, 2011.

IBRAHIM, H.K.; EL-LEITHY, I.S.; MAKKY, A.A. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone bitherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 2, p. 576–585, 2010.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTI F.S.; COLOMÉ L.M.; POHLMANN J.P.U.; BERNARDI A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JOSHI, M.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 161-172, 2008.

KANG, K.C.; JEONG, N. H.; LEE, C.I.; PYO, H.B. Preparation and characterization of SLNs (W/O/W type) contained lipoic acid PEG ester by variation lipid. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 529–536, 2009.

KAST, C.E.; VALENTA, C.; LEOPOLD, M.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Design and *in vitro* evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. **Journal of Controlled Release**, v.81, p. 347–354, 2002.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KIM, D.; MARTIN, D.C. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. **Biomaterials**, v. 27, p. 3031-3037, 2006.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v, 75, 1-18, 2010.

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; COSTANTINI, D.; GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 77-82, 2003.

LEE, C.M.; JEONG, H.J.; PARK, J.W.; KIM, J.; LEE, K.Y. Temperature-induced release of all-trans-retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles for topical delivery. **Macromolecular Research**, v. 16, n. 8, p. 682-685, 2008.

MARINA, A.M.; MAN, Y.B.; NAZIMAH, S.A.; AMIN, I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v.60, n. 2, p.114-23, 2009.

MARINA, A.M.; CHE MAN, Y.B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 481- 487, 2009b.

MEMISOGLU, E. ; BOCHOT, A.; OZALP, M.; SEN, M.; DUCHENE D.; HINCAL, A.A. Direct formation of nanospheres from amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 117-125, 2003.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterization of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 111-123, 1999.

MOHAMMADI, G.; NOKHODCHI, A.; BARZEGAR-JALALI, M.; LOTFIPOUR, F.; ADIBKIA, K.; EHYAEI, N.; VALIZADEH, H. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids Surfaces: B**, v. 88, p. 39– 44, 2011.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

NAGLIKA, J.R, MOYESA, D.L., WÄCHTLERB, B., HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 963–976, 2011.

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

NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil supplement diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, v. 99, p. 260-266, 2005.

NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN, T. Influence of coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprage-Dawley rats. **European Journal of Clinic Nutrition Metabolism**, p. 1-8, 2008.

NIMESH, S.; MACHANDA, R.; KUMAR, R.; SAXENA, A.; CHAUDARY P.; YADAV, V.; MOZUNDAR, S.; CHANDRA, R. Preparation, characterization and *in vitro* drug release studies of novel polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 146-152, 2006.

NOVEON. TOX-005, Pemulen<sup>®</sup> Polymeric Emulsifiers Toxicology Studies, 2003.

NYIRJESY, P.; WEITZ, M.V.; GRODY, M.H.T.; LORBER, B. Over-the-counter and alternative medicines in the treatment of chronic vaginal symptoms. *obstetrics & gynecology*, v. 90, n. 1, p. 50-53, 1997.

ODDS, F.C. Genital candidiasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.7, p. 345-354, 1982.

OGBOLU, D.O.; ONI, A.A.; DAINI, O.A.; OLOKO, A.P. *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.

OURIQUE, A.; POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, 1-4, 2008.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268–276, 2005.

PARDEIKE, J.; HOMMOS, A.; MÜLLER, R., Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Phamrmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PATEL, N.R.; **Itraconazole loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity**, 2010. Dissertação (Mestrado em Science in Biological and Agricultural Engineering)- Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, 2010.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; JALSENJAK, I. Liposomes containing drugs for treatment of vaginal infections. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 345–351, 1999.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; JALSENJAK, I. Characterisation and *in vitro* evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 140–148, 2005.

PENG, H.S.; LIU, X.J.; LVA, G.X.; SUNA, B.; KONG, Q.F.; ZHAI, D.X.; WANGA, Q.; ZHAOA, W.; WANG, G.Y.; WANG, D.D.; LI, H.L.; JIN, L.H.; KOSTULAS, N. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 29–35, 2008.

PIRIYAPRASARTH, S.; SRIAMORNSAK, P.; CHANSIRI, G.; PROMBOOT, W.; IMERB, U.; SUMPOUNG, D. Effect of coconut oil and surfactants on stability of nanoemulsions. **Advanced Materials Research**, v. 506, p. 429-432, 2012.

PRABAGAR, B.; YOO, B.K.; WOO, J.S.; KIM, J.A.; RHEE, J.D.; PIAO, M.G.; CHOI, H.G.; YONG, C.S. Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with  $\beta$ -Cyclodextrin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 2, p. 249-254, 2007.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100<sup>®</sup> nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 53–61, 2002.

PIGNATELLO, R.; FERRO, M.; GUIDI, G.D.; SALEMI, G.; VANDELLI, M.A.; GUCCIONE, S.; GEPPI, M.; FORTE, C.; PUGLISI, G. Preparation, characterization and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100<sup>®</sup> and RL100<sup>®</sup>. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 72–82, 2006.

RAFFIN, R.P.; OBACH, E.S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RAVI KUMAR, M.N.V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

RIGO, L.A. **Desenvolvimento de formulações de interesse farmacêutico e cosmético a partir de óleos vegetais derivados de plantas cultivadas no RS**, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; COOK, W.G.; FENTON, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6<sup>o</sup> edição, 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p.71-80, 2000.

SAWYER, P.R.; BROGDEN, R.N.; PINDER, R.M. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. **Drugs**. v. 9, p. 424-447, 1975.

SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin, **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SHAHIN, M.; HADY, S.A.; HAMMAD, M.; MORTADA, N.; Novel Jojoba Oil-based emulsion gel formulations for clotrimazole delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 1, 239-247, 2011.

- SHAHIN, M.; HADY, S.A.; HAMMAD, M.; MORTADA, N, Optimized formulation for topical administration of clotrimazole using Pemulen polymeric emulsifier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 559–568, 2011 b.
- SINGH, R.S.; SAINI, G.K.; KENNEDY, J.F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 515–531, 2008.
- SOBEL, J.D.; FARO, S.; FORCE, R.W. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 203–211, 1998.
- SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SOUTO E.B.; WISSING S.A.; BARBOSA C.M.; MÜLLER R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 71–77, 2004.
- SYLLA, M.; KONAN, L.; DOANNIO, J.M.; TRAORE, S. Evaluation of the efficacy of coconut (*Cocos nucifera*), palm nut (*Eleais guineensis*) and gobi (*Carapa procera*) lotions and creams in individual protection against *Simulium damnosum* s.l. bites in Cote d'Ivoire. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 96, n. 2, p.104–109, 2003.
- SZUCS, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; CARAMELLA, C.M.; VAGHI, P.; REVESZ, P.Z.; EROS, I. Mucoadhesive behaviour of emulsions containing polymeric emulsifier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 226–235, 2008.
- THOMAS, A.M.; KAPANEN, A.I.; HARE, J.I.; RAMSAY, E.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M.B. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 212–219, 2011.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1692– 1712, 2005.

YONG J.W.H; GE L.; NG Y. F.; TAN S. N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.

ZAMIRI, R.; AZMI, B.Z.; SADROLHOSSEINI, A.R.; AHANGAR, A.H.; ZAIDAN, A.W.; MAHDI, M.A. Preparation of silver nanoparticles in virgin coconut oil using laser ablation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p71-75, 2011.