

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

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS  
MUCOADESIVOS CONTENDO NANOCÁPSULAS  
CATIÔNICAS DE CLOTRIMAZOL PARA O  
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Julia Andrighetto de Lima

**Santa Maria, RS**

**2015**

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS MUCOADESIVOS  
CONTENDO NANOCÁPSULAS CATIÔNICAS DE  
CLOTRIMAZOL PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE  
VULVOVAGINAL**

**Julia Andrighetto de Lima**

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

Orientadora: Prof. Dra. Cristiane de Bona da Silva

Co-Orientadora: Prof. Dra. Letícia Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**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 HIDROGÉIS MUCOADESIVOS  
CONTENDO NANOCÁPSULAS CATIÔNICAS DE CLOTRIMAZOL  
PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Elaborado por

**Julia Andrighetto de Lima**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Cristiane de Bona da Silva, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Letícia Cruz, Dra.**  
(Co-orientadora)

**Clarice Madalena Bueno Rolim, Dra. (UFSM)**

**Renata Platcheck Raffin, Dra. (UNIFRA)**

**Santa Maria, 16 de Março de 2015.**

*Aos meus pais e ao Tarcísio,  
pela confiança, apoio e amor  
sempre a mim dedicados.*

## AGRADECIMENTOS

“É sua estrada e somente sua; outros podem andar ao seu lado, mas ninguém pode andar por você.” (Rumi)

Àqueles que, de diferentes formas, uniram suas forças e fizeram com que esta “estrada” tomasse forma, chegando ao seu destino final de forma apreciável, o meu MUITO OBRIGADA!

Aos meus pais, por todos os anos de confiança, amor, empenho, dedicação e saudade (muita saudade), que me deram liberdade para correr atrás dos meus sonhos e nunca me deixar enfraquecer;

Ao Tarcísio, pelo companheirismo, amor, carinho; por ser meu namorado, amigo, irmão; por me dar o apoio e força para lutar todos os dias com vontade e garra; por estar ao meu lado nos momentos bons e naqueles em que acreditava não ser possível superar; e por ser fundamental para que não enlouquecesse nesses dois anos;

Ao Gê e a Simo, que mesmo longe, sempre fizeram votos para que o sucesso fizesse parte dessa caminhada;

À Gisele, Bocão, Tici e Vó Jane, por me acolherem como uma filha, se tornando também a minha família, ajudando a enganar a saudade;

Aos grupos de WhatsApp, que me deixavam mais próximo da família e dos amigos distantes;

À minha orientadora, Cris, por quem tenho enorme admiração e carinho, por ser responsável pela minha formação como farmacêutica e pesquisadora, por confiar a mim este trabalho desafiador, desenvolvido com toda liberdade e responsabilidade. Pelos ensinamentos, conselhos e atenção de sempre;

À Letícia, pela disponibilidade em co-orientar este trabalho, pelos ensinamentos, ajudas e todas as contribuições;

À Fê, por me inspirar e me incentivar a seguir na área da pesquisa; por me ajudar sempre, pela amizade, companheirismo, risadas e por sempre se preocupar comigo e com meu trabalho;

À minha IC e amiga Thami, por junto comigo, desvendar e descobrir todo o universo da pesquisa, por colocar a “mão na massa” sem medo, por nunca me deixar duvidar da minha capacidade, por estar disposta a todo o momento; por divertir e alegrar meus dias, minhas tardes, minhas noites e até os meus fins de semana;

À Mari, por sempre me ajudar, se dispor a criar ideias mirabolantes, me dar segurança quando a dúvida rondava meus pensamentos e claro, por me fazer rir sempre, mesmo quando queria chorar;

À minha IC Watussi, por fazer com que este trabalho tivesse forma e chegasse ao seu final de forma admirável;

Às colegas do Laboratório de Farmacotécnica (Rose, Ju Weber, Nadine, Luciana, Maiara, Roberta, Jéssica, Aline Silveira, Aline Schneider, Tati, Cris, Grazi) pelas conversas, pelas experiências trocadas, pelas rodas de mate, pela ajuda (principalmente com a famosa mucosa) e pela amizade;

Às vizinhas queridas, Lara, Pri, Luana e Ale, pela disposição em ajudar, emergências de HPLC, pelas conversas, conselhos, apoio, risadas e trocas de conhecimentos (e indignações);

À Gi, a Bibi e a Rô, minhas amigas de sempre e pra sempre; por serem minha melhor lembrança da infância e por insistirem sempre em um bom sushi (para nossa alegria);

Às minhas melhores, Prica, Mari, May e Esther, por mostrarem todos os dias que amizade é o sentimento mais puro, e que não há distância que separe esse carinho; por sofrer e vibrar a cada nova conquista e novo desafio que a vida nos dá;

Aos amigos que viraram irmãos, Igor, Xaxa e Tiago, por engrandecer e divertir, cada final de semana, por estarem presentes na boa e na ruim e por me mostrar que realmente amigos são a família que escolhemos;

Aos demais familiares e amigos, que sempre estiveram me apoiando e torcendo pelo meu sucesso;

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À CNPQ, órgão financiador da Bolsa de estudos.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

## RESUMO

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

### **DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS MUCOADESIVOS CONTENDO NANOCÁPSULAS CATIÔNICAS DE CLOTRIMAZOL PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

AUTORA: JULIA ANDRIGHETTO DE LIMA

ORIENTADORA: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

CO-ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de Março de 2015

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de uma formulação inovadora para o tratamento de candidíase vulvovaginal. Nanocápsulas poliméricas de Eudragit<sup>®</sup> RS 100 foram desenvolvidas anteriormente por Sara e seus colaboradores e utilizadas como sistema carreador do clotrimazol. Neste trabalho, elas foram avaliadas quanto ao seu potencial mucoadesivo pelo método da partícula de mucina. A alteração do diâmetro médio de partícula ( $142 \pm 5$  nm para  $195 \pm 9$  nm) e a inversão de carga do potencial zeta ( $+35,7 \pm 4,0$  mV para  $-5,32 \pm 0,23$  mV) comprovaram sua mucoadesão, atribuída ao caráter catiônico do polímero. As suspensões de nanocápsulas foram incorporadas em hidrogéis com propriedades prévias de mucoadesão, a fim de obter uma formulação final para aplicação vaginal. O potencial mucoadesivo conferido pelos polímeros foi demonstrado pelo método de escoamento de líquido, avaliando a quantidade de formulação aderida no gel de mucina ou mucosa vaginal de vaca. O hidrogel de Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan a 3% contendo as nanocápsulas apresentaram cerca de 55% de retenção do fármaco na camada mucosa; em contrapartida, hidrogéis contendo as nanocápsulas e sem Pullulan tiveram somente 38% do fármaco retido. Para os hidrogéis contendo o fármaco livre, foi observada uma retenção em torno de 24% da formulação. Dessa forma, foi confirmado o aumento da mucoadesão devido ao sinergismo dos polímeros utilizados. Quanto às propriedades físico-químicas, os hidrogéis associando os dois polímeros mucoadesivos, o Pemulen<sup>®</sup> TR1 e o Pullulan, apresentaram características adequadas, aspecto semelhantes a um gel-creme, com pH na faixa ácida (em torno de 5), tamanho nanométrico de partículas ( $287 \pm 22$  nm), teor de clotrimazol próximo a 1 mg/g e espalhabilidade adequada. Essas características se mantiveram estáveis no decorrer do tempo de armazenamento (60 dias). Adicionalmente, o estudo de permeação/penetração foi realizado utilizando células de difusão do tipo Franz e como barreira a mucosa vaginal de vaca. Os resultados obtidos demonstraram que as formulações semissólidas contendo as suspensões de nanocápsulas e a associação de Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan, apresentaram melhores resultados tecnológicos para um tratamento efetivo frente às infecções superficiais, como a candidíase, em relação à mesma formulação contendo o fármaco não associado, uma vez que se verificou uma maior retenção do fármaco na superfície da mucosa, além de não ser detectado no meio receptor. Desta forma, as formulações desenvolvidas se mostram promissoras para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: hidrogel; mucoadesão; permeação/penetração; nanocápsula; clotrimazol.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DEVELOPMENT OF MUCOADHESIVE HYDROGELS CONTAINING CLOTRIMAZOLE-LOADED CATIONIC NANOCAPSULES FOR TREATMENT OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS**

AUTHOR: JULIA ANDRIGHETTO DE LIMA  
ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA  
CO-ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 16<sup>th</sup>, 2015

This study aimed the development of a novel formulation for the treatment of vulvovaginal candidiasis. Polymeric nanocapsules of Eudragit<sup>®</sup> RS100 were used as a clotrimazole carrier system and evaluated for their mucoadhesive potential by mucin particle method. The change of the mean diameter particle ( $142 \pm 5$  nm to  $195 \pm 9$  nm) and the zeta potential inversion showed that the mucoadhesion is attributed to the cationic character of the polymer. Nanocapsules suspension were incorporated into hydrogels, which have prior mucoadhesion properties, in order to obtain a dosage form for vaginal application. The mucoadhesive potential conferred for polymers was demonstrated by the falling liquid film method, evaluating the quantity of formulation adhered in the mucin gel or cow vaginal mucosa. The Pemulen<sup>®</sup> TR1 hydrogels containing the nanocapsules of Eudragit<sup>®</sup> RS100 and Pullulan (at 3% concentration) showed about 55% of retention the drug in the mucosa layer; however, hydrogel containing nanocapsules without Pullulan had only 38% of the retained drug. Regarding of hydrogels containing the drug non-encapsulated, it was observed around 24% of the formulation. Thus, it was confirmed the increased of mucoadhesion due the synergism of the polymers used. In relation to physicochemical properties, formulations associating the two mucoadhesive polymers, Pemulen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan, the hydrogels showed appropriate characteristics, similar aspect to a gel-cream, pH in the acidic range (around 5), nanometric particles size ( $287 \pm 22$  nm), clotrimazole content close to 1 mg/g and appropriated spreadability. These characteristics remained stable during the storage time (60 days). Additionally, the study of permeation/penetration was evaluated using Franz diffusion cells, and such the cow vaginal mucosal as barrier. The results obtained showed that, semisolid formulations (hydrogel) containing the nanocapsules suspensions and the combination of Pemulen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan, demonstrated better technological results for effective treatment against the superficial infections such as candidiasis, in relation to the same formulation containing the drug not-associate, as there was an increased retention of the drug on the mucosal surface, in addition to not detected in the receptor medium. Thus, the formulations developed showed promise for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Keywords: hydrogel; mucoadhesion; permeation/penetration; nanocapsules; clotrimazole.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO:

FIGURA 1: Estrutura química do clotrimazol .....	15
--	----

### CAPÍTULO 1: Aplicação vaginal de fármacos: aspectos importantes para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas

FIGURA 1: Anatomia do aparelho genital feminino.....	24
FIGURA 2: Estrutura química do Pemulen <sup>®</sup> TR1.....	34
FIGURA 3: Estrutura química do Pullulan.....	34
FIGURA 4: Estrutura química do Eudragit <sup>®</sup> RS100.....	35

### CAPÍTULO 2: Pemulen/Pullulan blended-hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapules: evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation

FIGURE 1: Schematic illustration of an <i>in vivo</i> model for testing .....	58
FIGURE 2: Percentage adhered of CTZ in relation to different formulations, by Mucin Gel method: hydrogel containing CTZ-NC without Pullulan (HGP-CTZ-NC), with 1,5% Pullulan (HGPP <sub>1,5</sub> -CTZ-NC) and 3% Pullulan (HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC); and hydrogel with free drug (HGPP <sub>3</sub> -CTZ). Data are shows by mean $\pm$ SD, n=3.....	62
FIGURE 3: Comparison study between two barriers to adhesion (mucin gel and animal mucosa), showing the CTZ percentage adhered: hydrogel containing NC-CTZ, without Pullulan (HGP-CTZ-NC) hydrogel containing NC-CTZ and 3% Pullulan (HG-PP <sub>3</sub> -CTZ-NC); and hydrogel containing free drug and 3% Pullulan (HGPP <sub>3</sub> -NC). Data are shows by mean $\pm$ SD, n=3.....	63
FIGURE 4: Spreadability of hydrogels: HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC (hydrogel CTZ-NC containing) and HGPP <sub>3</sub> -CTZ (hydrogel containing free drug).....	66
FIGURE 5: <i>Ex vivo</i> study permeation/penetration study in vaginal mucosa (n = 6). Concentration CTZ was the same for all formulations (infinite dose): 0.5 g of hydrogel containing CTZ-NC (HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC) and hydrogel containing the free drug HGPP <sub>3</sub> -CTZ.....	67

**DISCUSSÃO GERAL**

FIGURA 1: Fotografia das camadas mucosas utilizadas no experimento: Mucosa vaginal de vaca (A) e gel de mucina (B) ..... 78

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2: Pemulen/Pullulan blended-hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapules: evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation**

TABLE 1: Quali-quantitative composition of hydrogels.....	57
TABLE 2: Stability studies of hydrogels containing CTZ-NC (HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC) and free drug (HGPP <sub>3</sub> -CTZ), storage at 25 ± 2°C: pH values, drug content, spreadability factor (Sf), mean particle size (MS) and polydispersity index (PDI); mean ± SD.....	65

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Objetivo Específico.....</b>	<b>18</b>
<b>FOLHA DE APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1: Aplicação vaginal de fármacos: aspectos importantes para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 2: Pemulen/Pullulan blended-hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapules: evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>85</b>



## INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal é uma desordem do trato genital que atinge mundialmente cerca de 70% das mulheres em alguma fase da vida, sendo apontada como a segunda causa mais comum de vaginites (SOBEL, 2007; SEKHAVAT; TABATABAI; TEZERJANI; 2011). Relata-se que 50% dessas infecções são causadas pelo gênero *Candida*, tendo como a espécie mais comum a *Candida albicans*, com 90% de prevalência (ROSS; LEE; ONDERDONK, 1995; SOBEL, 2005). Seu diagnóstico é verificado pelo aparecimento de prurido, ardor, irritação, corrimento vaginal branco e espesso, dispareunia e o não tratamento pode levar à formação de edema, fissura e eritema vulvar (SOBEL, 2007; VAL; FILHO, 2001). Por ser uma Doença Sexualmente Transmissível, é recorrente e de grande frequência. Porém, existe uma série de fatores que colaboram para o seu aparecimento, como a gravidez, o uso de contraceptivos orais, diabetes e, até mesmo, o uso de roupas apertadas ou de material inadequado. Existem casos assintomáticos, onde é possível isolar leveduras de *Candida* do trato genital de mulheres saudáveis em idade fértil (NYIRJESY; SOBEL, 2003; SOBEL, 2005).

Micoses mucocutâneas, como a candidíase vulvovaginal, podem ser tratadas com antifúngicos da classe dos polienos ou azóis, de forma tópica ou sistêmica. O tratamento via oral muitas vezes é mais eficiente e preferido pelos pacientes devido a sua facilidade de administração; porém, os antifúngicos de uso tópico são favorecidos pela sua baixa toxicidade e ausência de efeitos colaterais (MERKUS; TILBURG, 1990, CHANG et al., 2002; SEKHAVAT; TABATABAI; TEZERJANI; 2011). O clotrimazol é um antifúngico imidazólico, possui um caráter lipofílico conferido pela sua estrutura química (1-[(2-clorofenil)-difenilmetil]imidazol) (Figura 1), com ação antimicótica de amplo espectro e de alta eficácia. Por agir na enzima responsável pela formação do principal esterol da membrana fúngica, o qual é conhecido como ergosterol, provoca danos na estrutura funcional do fungo. É ativo contra diversos fungos, incluindo o gênero *Candida* (BURGESS; BODEY, 1972; RANG et al., 2008). Sua administração oral não é conveniente por apresentar efeitos colaterais graves e seu tempo de meia-vida de 3 a 6 horas, o que é considerado curto. Dessa forma, é encontrado em produtos farmacêuticos de administração tópica, onde é incorporado em veículos apropriados, devido o seu caráter lipofílico. (ESPOSITO et al., 2012). O tratamento com clotrimazol para vulvovaginite é geralmente realizado na forma de creme aplicado em dose única, contendo 1% do fármaco (SOBEL; FARO; FORCE, 1998; VILAS,

PEREIRO, 2008); porém, muitas mulheres reclamam de irritação, dor, ardência e a baixa retenção da formulação no local de ação (CHANG et al., 2002; NEVES; BAHIA, 2006;). Dessa forma, surge o interesse por desenvolver sistemas inovadores para administração tópica desse fármaco.

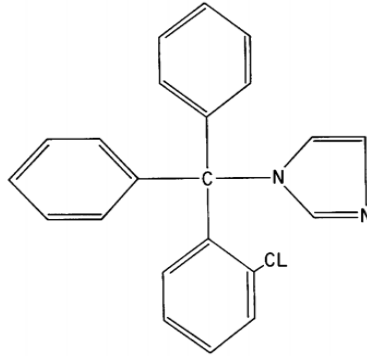


Figura 1. Estrutura química do clotrimazol

Bioadesão é a denominação dada à ligação que ocorre entre um material adesivo ou uma célula, com o substrato biológico. Quando se adere à camada mucosa é chamado de mucoadesão, podendo principalmente aumentar o tempo de permanência de um medicamento no organismo (NEVES; BAHIA, 2006; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). O desenvolvimento de formulações semissólidas contendo polímeros mucoadesivos vem crescendo devido a essas vantagens que podem ser conferidas à formulação, como por exemplo, evitar o metabolismo de primeira passagem, reduzir os efeitos secundários, reter o fármaco no local desejado e viabilizar a administração por vias alternativas à via parenteral (CHANG et al., 2002; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). O Pemulen<sup>®</sup> e o Pullulan são exemplos de polímeros mucoadesivos (CHENG et al., 2011), assim como os poliacrilatos, derivados da celulose, quitosana, alginatos. (CARVALHO et al., 2010).

A utilização da nanotecnologia em sistemas farmacêuticos vem sendo amplamente estudada, devido a uma série de vantagens conferidas às formulações. Os sistemas nanométricos têm como objetivo favorecer a liberação da substância ativa em seu local de ação. As vantagens em relação às propriedades físico-químicas de fármacos estão relacionadas com a formação de estruturas de tamanho inferior a 1 µm. As nanocápsulas são um exemplo de nanoestruturas, caracterizadas por uma parede polimérica que envolve o núcleo oleoso, o qual permite a incorporação de fármacos lipofílicos (SCHAFFAZICK et al., 2002; MISHRA PATEL; TIWARI, 2010), como o clotrimazol. A utilização de polímeros catiônicos, como o Eudragit<sup>®</sup> RS 100, para a formação da parede polimérica, é uma

alternativa para aumentar a adesão em substratos biológicos, os quais possuem carga negativa (SZUCS et al., 2008). O emprego de nanoestruturas em formulações de uso tópico proporciona uma proteção ou redução da capacidade de desenvolver reações de sensibilidade (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007), promove a liberação controlada do ativo, diminuição dos efeitos adversos causados (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009) e proteção do ativo frente a agentes externos (FLORES et al., 2011). A incorporação de nanocarreadores em formulações para uso vaginal tem sido encontrada na literatura (DAS NEVES et al., 2014)

Considerando a capacidade dos sistemas nanoestruturados em controlar a liberação dos fármacos nos sítios específicos e diminuir seus efeitos adversos, juntamente com as vantagens da utilização de uma preparação semissólida do tipo hidrogel, este trabalho visa o desenvolvimento de formulações semissólidas contendo nanocápsulas poliméricas de clotrimazol (SANTOS et al., 2013), a partir de dois polímeros bioadesivos: Pemulen<sup>®</sup> TR1 (SZUCS et al., 2008) e Pullulan (CHENG, DEMIRCI, CATCHMARK, 2011). É importante ressaltar que a utilização da associação desses dois polímeros é, até então, inédita na literatura.



## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu no desenvolvimento de hidrogéis de Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan contendo suspensão de nanocápsulas poliméricas de Eudragit<sup>®</sup> RS 100 com clotrimazol, com a finalidade de obter uma forma farmacêutica final para o tratamento de vulvovaginite.

### Objetivos Específicos

- Preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas de Eudragit<sup>®</sup> RS 100 contendo clotrimazol, tendo como núcleo oleoso triglicerídeos de cadeia média;
- Avaliar as características físico-químicas das nanocápsulas em relação ao: tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento;
- Preparar formulações semissólidas (géis hidrofílicos) a partir de polímeros mucoadesivo, Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan, contendo as nanocápsulas de clotrimazol;
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos géis no que se refere: características organolépticas, teor de fármaco, pH, tamanho médio de partículas e espalhabilidade;
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE, para quantificação do fármaco nos hidrogéis;
- Avaliar a estabilidade das formulações semissólidas, em estufa, à temperatura ambiente;
- Determinar a atividade de mucoadesão *in vitro* das suspensões de nanocápsulas e das formulações semissólidas;
- Avaliar a permeação *ex vivo* das formulações semissólidas, em mucosa vaginal animal.

- **FOLHA DE APRESENTAÇÃO**

Para melhor compreensão, esta dissertação está dividida em dois capítulos, redigida na forma de artigos, os quais serão posteriormente submetidos a periódicos científicos de escolha dos autores. O capítulo 1 consiste em uma revisão bibliográfica atualizada, fornecendo embasamento teórico para entender os importantes aspectos a serem considerados no desenvolvimento de uma formulação de uso vaginal destinada ao tratamento de infecções superficiais; o capítulo 2 apresenta uma proposta de formulação semissólida inovadora, com relevantes características mucoadesivas, para o tratamento de infecções vaginais superficiais, principalmente causadas por *Candida spp.*

**CAPÍTULO 1:**  
Aplicação vaginal de fármacos: aspectos importantes para o desenvolvimento de  
formulações mucoadesivas

---

## **Aplicação vaginal de fármacos: aspectos importantes para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas**

Julia A. de Lima<sup>1</sup>, Letícia Cruz<sup>1</sup>, Cristiane de B. da Silva<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\*Corresponding author: Cristiane de Bona da Silva

Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

Tel: +55 55 3220-8452 Fax: +55 55 3220-8248

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

## RESUMO

O objetivo desta revisão foi descrever as vantagens da via vaginal como rota de entrega de fármacos e as diversas formas farmacêuticas disponíveis para liberação nesta via, enfatizando os sistemas mucoadesivos. Diversos estudos mostram a via vaginal como sendo bastante eficaz na administração de fármacos para ação local, mas também tem mostrado efeito sistêmico, o qual é atribuído à elevada irrigação sanguínea. A mucoadesão por ser caracterizada pela forte interação entre o sistema mucoadesivo e a mucosa, é uma alternativa tecnológica interessante para aumentar a retenção de formulações vaginais, e assim, aumentar a eficácia terapêutica de fármacos para o tratamento de infecções locais. Para desenvolver formulações mucoadesivas com características adequadas para a aplicação vaginal, é importante o conhecimento de fatores fisiológicos, como pH e a presença de fluido vaginal; a composição histológica da vagina; e as características físico-química dos componentes da formulação. Ainda, a tecnologia de liberação de fármacos propõe uma nova abordagem quando esses sistemas mucoadesivos são associados a formulações nanotecnológicas, acarretando no direcionamento a sítios específicos, e melhora na biodisponibilidade e absorção de fármacos.

Palavras-chave: Mucoadesão, Formulação vaginal, Via vaginal, Nanotecnologia.

## **1. Introdução**

A via vaginal há muito tem sido utilizada como rota de liberação de fármacos, primeiramente com o objetivo de ação local, mesmo que muitas vezes a absorção sistêmica seja observada. Até 1920, acreditava-se que esta via era incapaz de absorver sistemicamente, porém com o passar dos anos isso foi sendo modificado (ALEXANDER et al., 2004; NEVES; BAHIA, 2006). O mecanismo de permeação geralmente para fármacos lipofílicos é o de difusão simples, enquanto os hidrofílicos são absorvidos por poros presentes no epitélio (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). Para bons resultados com esta via de administração, as formulações devem ser de aplicação fácil e indolor, confortáveis e seguras; porém, uma das maiores reclamações da terapia convencional é em relação à baixa retenção da formulação no local de ação. Por isso, formulações mucoadesivas são extremamente vantajosas, por aumentarem o tempo de contato e a eficácia terapêutica e, diminuírem a frequência de administração (NEVES; BAHIA, 2006; BODUPALLI et al., 2010). Nanocarreadores tem recebido grande atenção nessa área, pois podem combinar as vantagens conferidas pela mucoadesão, com as vantagens da nanotecnologia: liberação controlada e sustentada do fármaco, aumento da permeabilidade na mucosa e direcionamento em sítios específicos (ENSIGN et al, 2014). Atualmente, muitos estudos avaliam essas vantagens da via principalmente em tratamento de vaginoses, reposição hormonal e HIV (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011), contribuindo significativamente para as pesquisas na área.

## **2. Anatomia, Histologia e Fisiologia Vaginal**

O aparelho genital feminino é formado por órgãos internos, como os ovários, as tubas uterinas, o útero e a vagina (Figura 1); e também por órgãos externos (BERNARDES, 2009). A vagina é descrita como órgão de grande importância na reprodução humana; com estrutura tubular e fibromuscular que possibilita a extensão do colo do útero até o vestíbulo da vulva, chegando a cerca de 9 cm de comprimento (NEVES E BAHIA, 2006). Apresenta forma cilíndrica e achatada, com duas posições distintas e de diferentes orientações, formando um ângulo de 130° entre elas: a porção inferior é convexa e a superior é mais larga, situada em

um plano quase horizontal quando a mulher está em posição ereta (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011; SRIKRISHNA E CARDOZO, 2013). Esse fato deve ser levado em conta na distribuição do fármaco, tendo em vista que as formulações devem contrariar a força da gravidade para ficarem retidas no local.

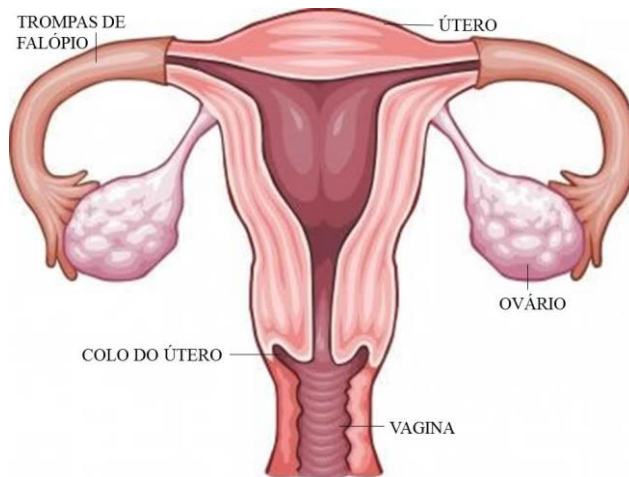


Figura 1: Anatomia do aparelho genital feminino

O suprimento nervoso do ambiente vaginal consiste em dois tipos: o periférico atinge principalmente o quarto inferior da vagina, conferindo uma alta sensibilidade a esta área. Em contrapartida, fibras autonômicas abastecem os três quartos superiores, o que torna a área pouco sensível à dor e com alta elasticidade proporcionando, maior conforto às mulheres quando fazem uso de produtos vaginais, como os supositórios, tampões, anéis vaginais, entre outros (ALEXANDER et al., 2004). Histologicamente, a vagina é constituída por quatro camadas distintas: a camada superior é formada principalmente de epitélio escamoso estratificado não queratinizado e a sua espessura varia com a idade e atividade hormonal. A camada seguinte, composta de colágeno e elastina, fornece um local altamente irrigado por vasos sanguíneos e linfáticos, e é denominada de lâmina própria ou túnica. A muscular é a terceira camada, a qual possui fibras musculares lisas circulares e longitudinais. A camada final, a túnica adventícia, constitui-se de tecido conjuntivo e de grande quantidade de vasos sanguíneos, linfáticos e nervosos (ALEXANDER et al., 2004; CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). Ainda, o tecido vaginal é ausente de células adiposas, glândulas ou folículos pilosos.

Na literatura encontramos diversos fatores que influenciam na fisiologia vaginal: idade, estado hormonal, gravidez e pH (ALEXANDER et al., 2004). Valores de pH na faixa ácida (4,5-5,5) são devido ao ácido lático produzido por *Lactobacilos* presentes na flora vaginal saudável, e a sua manutenção tem grande importância na prevenção e no controle de



infecções (NEVES E BAHIA, 2006). Diferentes fases do período menstrual, pós-menopausa, presença de sêmen e colonização bacteriana são alguns exemplos de eventos que promovem alteração no pH. Os fluidos vaginais são originários de diferentes fontes, mas principalmente por células vaginais e cervicais, porém a sua composição é afetada por alterações hormonais, estado de excitação e variação entre mulheres (ALEXANDER et al, 2004). Em geral, o fluido vaginal é constituído de uma grande quantidade de água (90 a 95%), sais orgânicos e inorgânicos, ureia, glicerol, ácidos graxos, albumina, enzimas, leucócitos e detritos epiteliais. A produção normal de fluido vaginal está em cerca de 6 mL por dia, sendo que a cada momento há entre 0,5 - 0,75 mL de fluido na vagina (OWEN E KATZ, 1999). O aumento do volume de fluido vaginal pode favorecer a absorção de fármacos hidrossolúveis, porém essa mesma condição é responsável por remover a formulação da cavidade vaginal (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

### **3. Via Vaginal para Administração de Fármacos**

A via vaginal tem se mostrado uma rota bastante eficaz e vantajosa para liberação de fármacos, pois pode apresentar efeito local e absorção sistêmica, devido a grande área superficial, elevado suprimento sanguíneo e sua posição anatômica (VALENTA, 2005; NEVES E BAHIA, 2006). Entre as principais vantagens da via vaginal podemos citar a utilização de dosagem prolongada, com baixas doses diárias, a liberação contínua de medicamentos e ausência do metabolismo de primeira passagem (SRIKRISHNA E CARDOZO, 2013). É possível então evitar a absorção a partir do trato gastrointestinal, o que muitas vezes é o fator responsável pelo aparecimento de efeitos adversos causados pelo fármaco de escolha (ALEXANDER et al.,2004; KRISNHA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012).

#### **3.1 Candidíase Vulvovaginal e seus Tratamentos**

As vulvovaginites são um tipo de doença sexualmente transmissível, caracterizadas principalmente pelo aparecimento de prurido, ardência e corrimento vaginal (SOBEL, 2007). As principais causas dessa desordem vaginal são: infecção por *Trichomonas vaginalis*,

crescimento fúngico exagerado, predominantemente por *Candida albicans* e a bacteriose vaginal. Cerca de 50% das vaginites são causadas por leveduras do gênero *Candida*, tendo como a espécie mais comum a *Candida albicans*, com 90% de prevalência, sendo esta a infecção vaginal de maior expressão (ROSS; LEE; ONDERDONK, 1995; SOBEL, 2005).

Esse tipo de infecção, conhecida como candidíase vulvovaginal (CVV), é uma desordem do trato genital que atinge em torno de 75% das mulheres pelo menos uma vez, em alguma fase da vida, sendo que existem inúmeros relatos de mulheres que apresentam a infecção recorrente. Seu diagnóstico é verificado pelo aparecimento de prurido, ardor, irritação, corrimento vaginal branco e espesso, dispareunia, e o não tratamento pode levar a formação de edema, fissura e eritema vulvar (ROSS, LEE, ORDENDONK, 1995; SOBEL, 2007; VAL; FILHO, 2011).

A *Candida* é um fungo onipresente e com frequência contamina o ambiente vaginal, podendo ser isolado do trato genital de mulheres saudáveis o que comprova a existência de uma contaminação assintomática (SOBEL, 2005). A microflora vaginal contribui para tornar o ambiente vaginal um local mais resistente à colonização de agentes patogênicos. Dessa forma, a destruição dessa barreira desencadeia o risco de infecção, o que pode ocorrer por fatores externos, como a administração de antibióticos sistêmicos que provocam a diminuição de lactobacilos presentes normalmente na microflora vaginal; o uso de contraceptivos orais a base de estrogênio, pois aumentam a avidéz do epitélio celular frente à *Candida spp*; o uso de roupas apertadas deixam o ambiente mal ventilado, aumentando a umidade e a temperatura do ambiente vaginal. A diabetes mellitus não controlada, assim como a gravidez são outros fatores que colaboram para o aparecimento das vulvovaginites (ROSS, LEE, ORDENDONK, 1995; SOBEL; FARO; FORCE, 1998; NEVES E BAHIA, 2006).

Micoses mucocutâneas, como a candidíase vulvovaginal, são tratadas por antifúngicos da classe dos polienos (nistatina) e derivados imidazólicos (clotrimazol, tioconazol, fluconazol, miconazol, entre outros), de forma tópica ou sistêmica (SOBEL, 2005). A preferência do tratamento também é levada em conta, pois se sabe que é alto o índice de abandono de terapias quando a administração do medicamento não agrada o usuário. Apesar do tratamento com antifúngicos orais terem a preferência da maioria dos pacientes, devido a sua facilidade de administração, a terapia local tem suas vantagens, principalmente por evitar o metabolismo de primeira passagem, por diminuir os efeitos adversos sistêmicos apresentados por essa classe de medicamentos e por apresentarem baixa toxicidade (MERKUS, TILBURG, 1990; CHANG et al., 2002; SEKHAVAT; TABATABAI;

TEZERJANI, 2011). Jack Sobel relatou, em estudo realizado em 2013, que quanto à eficácia clínica, não há diferença entre a terapia oral e a vaginal.

Os polienos têm seu uso limitado às infecções de pele e membranas mucosas, causadas por *Candida*. Agem seletivamente na membrana celular fúngica, interferindo na sua permeabilidade e transporte. Quando usados de forma sistêmica, podem desencadear efeitos adversos, como náusea, vômito e diarreia (RANG et al., 2008)

Os derivados imidazólicos possuem amplo espectro de ação, sendo ativos contra infecções fúngicas causadas por diversas espécies de *Candida* e no tratamento de infecções bacterianas, nas quais os micro-organismos são resistentes. Sua estrutura química é composta de um anel aromático com ligação C-N (anel imidazólicos livre), responsável pelas características físico-químicas conferidas por essa classe de fármacos (RANG et al., 2008). Apresentam semelhança entre o mecanismo e espectro de ação, tendo eficácia clínica frente aos fungos causadores de infecções superficiais de pele e também de mucosas. No caso de infecções vaginais, o clotrimazol vem sendo amplamente estudado (ROSS, LEE, ORDENDONK, 1995; SOBEL, 2007; ESPOSITO et al., 2012). É ativo contra diversos fungos, incluindo o gênero *Candida* (BURGESS; BODEY, 1972; RANG et al., 2008). Sua administração oral não é conveniente por apresentar efeitos adversos graves, como distúrbios gastrointestinais e lesão hepática. Na terapia local se mostra bastante eficaz e sem maiores efeitos adversos, sendo encontrado em produtos farmacêuticos de administração tópica (ESPOSITO et al., 2012). O tratamento com clotrimazol para vulvovaginite é geralmente realizado na forma de supositório vaginal ou creme aplicado em dose única, contendo 1 ou 2% de fármaco (VILAS, PEREIRO, 2008; SOBEL, 2013); porém, muitas mulheres reclamam de irritação, dor, ardência e a baixa retenção da formulação no local de ação (CHANG et al. 2002; NEVES; BAHIA, 2006), o que se torna um motivo muitas vezes de abandono do tratamento.

### 3.2 Formas Farmacêuticas de Aplicação Vaginal

Existem diversos tipos de formas farmacêuticas de aplicação vaginal, entre elas os comprimidos, supositórios, anéis vaginais, cremes e géis. A distribuição do medicamento no local de aplicação depende da forma e natureza do sistema de liberação, bem como do tipo de terapia pretendida, se tópica ou sistêmica. No caso da ação local, é importante promover uma distribuição uniforme da formulação por toda a cavidade vaginal e geralmente são destinadas

ao tratamento de infecções fúngicas locais, antimicrobiana e espermicida (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013).

### *Comprimidos e supositórios*

Um grande número de sistemas de liberação vaginal está disponível na forma de comprimidos ou supositórios vaginais. Os comprimidos são preparados por granulação úmida ou compressão direta (KRISNHA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012). Essas formas farmacêuticas são desenvolvidas para se dissolverem na cavidade vaginal e liberarem a substância ativa ao longo do tempo (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

### *Anel vaginal*

Os anéis vaginais são dispositivos circulares designados a liberar o fármaco de forma controlada, após serem inseridos na vagina. É considerada uma forma alternativa de liberação de fármacos para desenvolver ação sistêmica (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013). Medem aproximadamente 5,5 cm de diâmetro, onde o fármaco fica homogeneamente disperso no polímero do anel. Quando está na superfície do anel, tende a ser liberado mais rapidamente em comparação com a cavidade mais interna (KRISNHA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012). Apresenta vantagens como o controle da administração pelo usuário, a não interferência nas relações sexuais e a liberação contínua do princípio ativo (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

### *Crems e Géis*

São formas farmacêuticas semissólidas utilizadas na via vaginal para a liberação tópica de anticoncepcionais e principalmente no tratamento de infecções vaginais (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). Apresentam propriedades de consistência, adesão na superfície por um período de tempo razoável, antes da remoção pela lavagem ou fluido natural da mulher, o que é característica desse tipo de formulação. Tem boa aceitabilidade, facilidade de aplicação e baixo custo, porém muitos pacientes reclamam de desconforto principalmente pelo vazamento da formulação do local de aplicação. Podem ainda, apresentar baixa uniformidade de dose, mas se mostram tão eficazes quanto a administração via oral de fármacos para o tratamento de vaginoses (NEVES; BAHIA, 2006; SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013). Os géis são matrizes poliméricas tridimensionais, com elevado grau de reticulação e conduzem alta biodisponibilidade, segurança e versatilidade. Nos últimos anos

vem sendo muito estudado o desenvolvimento de hidrogéis para liberação de fármacos. São materiais obtidos da copolimerização de monômeros ou polímeros hidrofílicos, que quando em contato com a água, têm a capacidade de retê-la em sua estrutura sem se dissolverem. Dessa forma, os hidrogéis podem ser utilizados em formas farmacêuticas que proporcionam a liberação da substância após a expansão de suas cadeias, ou ainda, através de estímulos fisiológicos (VILANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010; KRISNHA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012).

#### *Sistemas bioadesivos*

A maioria dos sistemas convencionais de administração de fármacos pela via vaginal apresenta como principal problema a baixa retenção no epitélio vaginal, acarretando na rápida remoção da formulação do local de aplicação, o que causa uma baixa adesão do paciente ao tratamento proposto. Por conseguinte, os sistemas bioadesivos de liberação vaginal se tornam uma alternativa interessante para contornar esses desafios (NEVES E BAHIA, 2006; CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

#### **4. Composição e funções do muco**

A camada mucosa é uma superfície úmida, normalmente pela presença do muco, que reveste as paredes de várias cavidades do corpo, entre elas a vagina, e apresenta permeabilidade relativa e rápida absorção do fármaco (BODUPALLI et al., 2010; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). A área da mucosa responsável por capacitar a interação adesiva é o muco. É uma secreção altamente viscosa e de aspecto translúcido, produzido por células caliciformes especializadas, o qual forma uma fina camada que fica aderida de forma superficial no epitélio da mucosa. Essa camada de muco tem sua composição variável, dependendo da sua localização anatômica e do estado fisiopatológico do indivíduo (ANDREWS; LAVERTY; JOENS, 2009; SHARMA et al., 2012). Os principais componentes do muco, independente da sua origem são: glicoproteínas, lipídios, sais inorgânicos e proteínas livres (CARVALHO et al, 2010). Em geral, contém 0,5-5% de lipídios e glicoproteínas, 0,5-1% de sais minerais e proteínas livres e 95% de água, o que o torna uma secreção altamente hidratada (KHANVILKA; DONOVAN; FANAGAN, 2001;

SHARMA et al, 2012). A glicoproteína majoritária e de maior importância é a mucina, a qual confere a estrutura de gel ao muco (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). A mucina é encontrada na forma solúvel, a qual forma um gel viscoso devido ao grande peso molecular e à capacidade de formar pontes dissulfeto; e a mucina ligada à membrana, a qual possui um parte hidrofóbica. Ambas contribuem para a formação da camada mucosa (KHANVILKAR; DONOVAN; FANAGAN, 2001).

O muco apresenta diversas funções, entre elas proteger e lubrificar o epitélio, evitando o contato de agentes externos e micro-organismos; atua como barreira de absorção de fármacos ou outras substâncias, o que muitas vezes influencia a biodisponibilidade dos ativos; e sua capacidade de promover adesão, devido seu alto poder de coesão se ligando firmemente ao epitélio (SHARMA et al., 2012). No decorrer do tempo, o muco vai sendo removido, o que acaba por promover a retirada da formulação da camada do muco, diminuindo o tempo de residência do fármaco no local de aplicação. Além disso, algumas doenças podem alterar a composição e as características fisiológicas do muco (CARVALHO, CHORILLI E GREMIÃO, 2014).

No que diz respeito à permeação do fármaco através da mucosa vaginal, o principal mecanismo envolvido é a difusão passiva. Dessa forma, o transporte de grande parte dos fármacos lipofílicos ocorre através da via intracelular, enquanto fármacos hidrofílicos são preferencialmente transportados por junções paracelulares ou poros aquosos presentes na vagina. Ainda, àqueles que desejam uma ação sistêmica, têm parte de sua permeabilidade vaginal influenciada pela presença do estrogênio. Quanto à absorção dos fármacos, duas etapas são importantes para que ocorra adequadamente: a dissolução no lúmen vaginal e a penetração através da membrana, sendo que qualquer alteração fisiológica ou, ainda, características particulares da formulação, podem modificar esses mecanismos (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

## **5. Mucoadesão**

Nos últimos anos, alguns aspectos farmacêuticos que se relacionam com a bioadesão têm sido amplamente evidenciados, no sentido de conferir uma alternativa para problemas de fármacos que possuem um curto tempo de residência no local de ação, devido a sua

formulação não aderir adequadamente. Existem diferentes tipos de bioadesão em relação aos sistemas biológicos: quando ocorre entre duas células normais, entre uma célula normal e uma substância estranha, entre uma célula patológica e uma célula normal e, por último, entre um material adesivo e um substrato biológico. Quando esse substrato é a membrana mucosa, a interação se dá diretamente com ela, sendo então denominado de mucoadesão (CARVALHO et al. 2010).

### 5.1 Teorias de Mucoadesão

A ocorrência da mucoadesão se dá geralmente em duas fases diferentes. Primeiramente, ocorre o contato entre a parte mucoadesiva e a membrana mucosa, promovendo o espalhamento e o inchaço da formulação, o que desencadeia o contato mais íntimo. Posterior a isso, aparece a fase de consolidação, onde a presença de umidade é a responsável por permitir que o material mucoadesivo presente na formulação se libere, ocorrendo penetração do polímero na camada mucosa ou interpenetração das cadeias poliméricas (BODUPALLI et al., 2010; SHARMA et al., 2012). Diversas teorias são apresentadas para tentar explicar como ocorre o mecanismo de mucoadesão em diferentes situações.

#### *Teoria da Difusão*

A Teoria da Difusão é descrita pela interpenetração do polímero com as cadeias de mucina presentes na camada mucosa, formando uma ligação adesiva semipermanente. Entende-se que a força de adesão é potencializada em relação ao aumento dessa interpenetração presente, a qual depende do coeficiente de difusão, flexibilidade e natureza polimérica, mobilidade e tempo de contato entre as duas substâncias. Para que ocorra a difusão, é importante também que o sistema mucoadesivo e a mucosa tenham semelhança estrutural (BODUPALLI et al., 2010; SURESH et al., 2013)

#### *Teoria da Adsorção*

De acordo com esta teoria, o vínculo de adesão entre o substrato mucoadesivo e a mucosa ocorre por interações químicas, tais como, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, ligações hidrofóbicas, forças eletrostáticas e outras relacionadas. Essas interações têm

sido muito importantes no processo de mucoadesão, apesar de serem ligações fracas individualmente. Quando estão em grande número resultam em uma adesão semipermanente (FIGUERAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; CARVALHO et al., 2010).

#### *Teoria Eletrônica*

O fundamento da teoria eletrônica parte do pressuposto que o material de adesão e o substrato biológico, no caso a mucosa, possuem cargas eletrônicas diferentes. Quando os dois entram em contato, ocorre uma transferência de elétrons formando uma dupla camada elétrica na interface entre o muco e a substância, e a adesão acontece dentro dessa camada. O sistema apresenta esse potencial somente quando em contato, pois quando ocorre a separação entre os componentes, não apresenta mais a capacidade de adesão (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; SURESH et al., 2013).

#### *Teoria da Molhabilidade*

A teoria da molhabilidade se aplica principalmente a sistemas mucoadesivos líquidos ou de baixa viscosidade, pois avalia a capacidade do material adesivo em se espalhar na mucosa, desencadeando um contato íntimo entre eles. Quanto menor o ângulo de contato, maior a afinidade entre as duas substâncias e maior a capacidade de adesão (FIGUERAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; CARVALHO et al., 2010)

#### *Teoria da Fratura*

Analisa a força necessária para separar as duas superfícies quando estão em contato, depois de conferida a adesão; porém, sua principal limitação é o fato de levar em conta somente a força de adesão e não os mecanismos que envolvem o contato, como o enrolamento e a interpenetração das cadeias poliméricas (FIGUEIRA; CARVALHO; VEIGA, 2007; SHARMA et al., 2012).

É pouco provável que o mecanismo de mucoadesão ocorra igualmente em todas as situações e, conseqüentemente, que seja descrito somente por uma única teoria. Todas são importantes para entender o processo de mucoadesão e descobrir quais as variáveis são relevantes, como as propriedades internas da formulação e o meio no qual será aplicada (CARVALHO et al., 2010).



## 5.2 Polímeros Mucoadesivos

O polímero é formado pela ligação de inúmeras moléculas menores, chamadas de monômeros. Pode ser de origem sintética ou natural, podendo aderir a substratos biológicos, como a mucosa (SURESH et al., 2013). Como foi visto anteriormente, vários fatores podem alterar essa adesão, por isso ele deve ser cuidadosamente escolhido durante o desenvolvimento da formulação (SHARMA et al., 2012). Diversos polímeros têm o seu caráter mucoadesivo já conhecido, como os derivados do ácido poliacrílico, derivados de celulose, quitosana, alginatos, entre outros. Porém, existem algumas características que antecipam esse caráter e demonstram que, para um polímero ser considerado mucoadesivo deve: ter natureza predominantemente aniônica, com vários grupos carboxílicos, possibilitando a formação de pontes de hidrogênio; em contrapartida polímeros catiônico interagem com a mucosa pela sua diferença de carga elétrica; peso molecular elevado, disponibilizando mais sítios de ligação; flexibilidade da cadeia promovendo a interpenetração na rede polimérica do muco e favorecendo sua difusão; caráter hidrofílico formando fortes ligações, devido a grande quantidade de água presente no muco; deve aderir rapidamente ao tecido e possuir certa especificidade com o local de aplicação; possibilitar uma fácil incorporação da substância ativa e não causar impedimento da sua liberação; não deve ser tóxico e nem irritante, biocompatível e preferencialmente biodegradável (FIGUEIRAS, CARVALHO; VEIGA, 2007; CARVALHO et al., 2010; SURESH et al., 2013).

Os polímeros são divididos em classes de acordo com a sua origem. Entre os sintéticos podemos destacar os poliacrilatos, como o carbopol, a policarbofila e o ácido poliacrílico, e os derivados da celulose, como hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose e metilhidroxietilcelulose. Nos polímeros naturais encontramos a quitosana, as gomas (guar, xantana, pectina) e os alginatos. Ainda, outro modo de classificação leva em consideração a forma com que o polímero adere à mucina: o aumento da viscosidade do meio quando em contato com a água, proporcionando a adesão; interações eletrostáticas, como pontes de hidrogênio; e ainda polímeros que se ligam a sítios específicos de receptores da superfície (VALENTA, 2005; FIGUEIRA, CARVALHO, VEIGA, 2007).

Entre todas essas características citadas e a diversidade de polímeros mucoadesivos encontrados, detalharemos apenas três nesse trabalho, que em associação, trazem uma nova

proposta de formulação mucoadesiva para aplicação vaginal: o Pemulen<sup>®</sup> TR1, o Pululan e o Eudragit<sup>®</sup> RS100.

O Pemulen<sup>®</sup> TR1 (Acrylates/C10-30 alkyl acrylate cross-polymer) é um polímero aniônico, de alto peso molecular, constituído por um bloco de copolímero de ácido poliacrílico, o qual possui uma região lipofílica e outra hidrofílica (TEGELI et al., 2011). É de fácil preparação e baixo potencial irritante, que pode ser justificado pelo fato de ser uma macromolécula e, assim, não penetrar nos tecidos biológicos, e sua utilização em baixas concentrações. Apresenta potencial mucoadesivo, conferido pela interpenetração da cadeia polimérica no muco (SZUCS et al., 2008) (Figura 2).

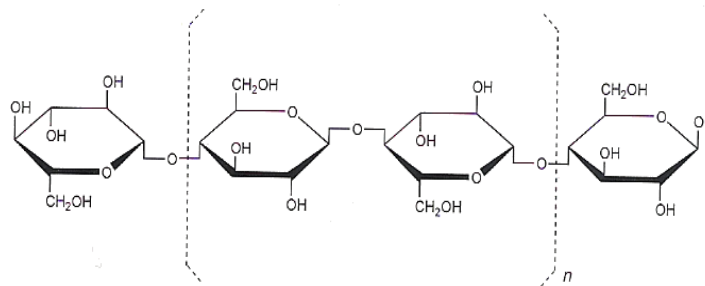


Figura 2: Estrutura química do Pemulen<sup>®</sup> TR1

O Pullulan é um polissacarídeo obtido através da fermentação do fungo *Aureobasidium pullulans*. Apresenta caráter aniônico devido a grande concentração de grupos carboxílicos presentes na sua estrutura, apresenta elevado peso molecular e alta solubilidade em água (Figura 3). Dessa forma, tem se mostrado um polímero com alta capacidade de bioadesão (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011). Ainda, apresenta capacidade de formar fibras e filmes biodegradáveis na superfície de contato (DIONÍSIO et al., 2013)

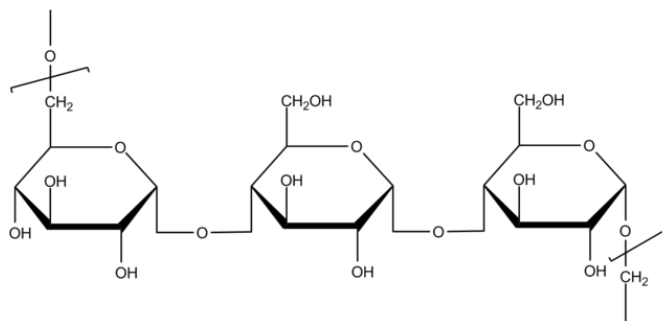


Figura 3: Estrutura química do Pullulan

O Eudragit<sup>®</sup> RS 100 é um polímero de caráter catiônico e dessa forma, possui capacidade mucoadesiva por interagir com superfícies biológicas carregadas negativamente (Figura 4). Assim, consegue promover o aumento do tempo de residência de partículas quando interagem com a mucina (DILLEN et al., 2006; NIKAM et al., 2011). Estudos mostram a sua utilização em nanopartículas poliméricas com a finalidade de aumentar a mucoadesão das formulações (SANTOS et al., 2013; FRANK et al., 2014)

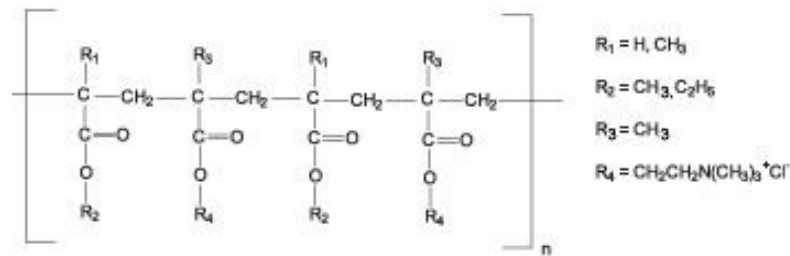


Figura 4: Estrutura química do Eudragit<sup>®</sup> RS100

### 5.3 Métodos para avaliação da mucoadesão (WORTZ et al., 2013; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014)

Diversos estudos para avaliar a mucoadesão vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, embora a tecnologia dos polímeros tenham evoluído, a maioria dos métodos foram adaptados de outros que já existiam. Nesta revisão, alguns dos diferentes métodos serão descritos.

#### *Força de destacamento*

Esse método é frequentemente utilizado para a caracterização de polímeros mucoadesivos, o qual utiliza um analisador de textura para medir a força necessária para romper a ligação de adesão, formada pela mucosa modelo e o material mucoadesivo (WORTZ et al., 2013). Essa mucosa modelo pode ser um disco de mucina ou uma mucosa animal, a qual é fixada no aparato e colocada em contato com a amostra por um tempo pré-determinado. A medida de força é calculada quando, a uma velocidade constante, o contato se rompe (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

### *Medida Reológica*

Esse método foi proposto inicialmente em 1990, por Hassan e Gallo, sendo um método totalmente *in vitro*, diferente do citado anteriormente que pode utilizar material *ex vivo*. Nesse estudo, a avaliação da capacidade mucoadesiva do polímero é realizada pela mistura deste com partícula de mucina para avaliação reológica e então, analisadas suas medidas reológicas. A mucoadesão é confirmada quando a resposta reológica dessa mistura é maior do que quando o polímero e a mucina estão isolados, pois a energia da interação entre mucina-polímero pode se transformar em energia mecânica, fazendo com que os rearranjos de macromoléculas variem a viscosidade (CARVALHO et al., 2010). Geralmente as medidas são realizadas em reômetro oscilatório, sendo uma técnica não destrutiva, avaliando a viscosidade e o comportamento elástico (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

### *Método da Partícula de mucina*

É avaliada a mucoadesão de polímeros quando entram em contato com a partícula de mucina em suspensão. A aderência entre ambos é verificada pela alteração dos valores do potencial zeta, devido a mudança da carga superficial antes e depois do contato (TAKEUCHI et., al 2005).

### *Microscopia de Força Atômica (MFA)*

Avalia a rugosidade da superfície do polímero e se esta é alterada quando em contato com o substrato biológico. Considera-se dessa forma, as propriedades de superfície e a força necessária para remover a formulação mucoadesiva ou o polímero a partir da mucosa. Para caracterizar as superfícies a MFA apresenta imagens tridimensionais (WORTZ et a., 2013).

### *Método de escoamento de líquido*

Esse método foi primeiramente descrito por Rango Rao e Buri, em 1989, e sofreu algumas adaptações ao longo dos anos (DE ASCENTIIS et al., 1995; NIELSEN, SCHUBERT; HANSEN, 1998). Nesse estudo, a mucosa de escolha é posicionada em um tubo cilíndrico cortado ao meio, e disposto inclinado. Uma bomba de fluxo controlada bombeia uma solução isotônica pela mucosa disposta no suporte e o volume final do fluxo é coletado. Quando se avalia a mucoadesão de sistemas particulados, a quantidade que permanece na mucosa é verificada com o auxílio de um contador (*coulter*); e em casos de sistemas semissólidos é quantificada a solução coletada, ou seja, aquela que não ficou aderida

à mucosa e então quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

#### *Saco intestinal invertido de ratos*

É um método *ex vivo*, amplamente utilizado para avaliar o transporte intestinal de fármacos, porém, estudos já demonstram o seu uso para avaliar a mucoadesão. Uma porção do tecido intestinal do animal é retirada e invertida, e uma das extremidades é saturada com solução salina. Cada porção é colocada em tubos de ensaio individuais contendo a substância mucoadesiva a ser avaliada em concentração conhecida. Estes permanecem em agitação por um determinado tempo e são incubados. Após a remoção das porções, o percentual de adesão é calculado pela diferença da massa residual da substância em relação a sua massa final (CARVALHO et al., 2010).’

#### *Testes in vivo*

A gamacintilografia é utilizada para avaliar a mucoadesão *in vivo*, permitindo o acompanhamento de todo o percurso da formulação pelo organismo humano, verificando o local de maior adesão (CARVALHO, CHORILLI E GREMIÃO, 2014).

Existem uma variedade de opções de testes *in vitro* e *ex vivo* para determinar a mucoadesão de uma substância, e geralmente são escolhidos para um tipo específico de resposta. Não há um levantamento que relacione os métodos utilizados com os diversos tipos de formas farmacêuticas existentes. Dessa forma, os trabalhos descritos na literatura científica reportam muitas adaptações dos parâmetros para a realidade de cada ensaio, dificultando a padronização das metodologias. Ainda, como as condições experimentais são diferentes, torna-se mais importante a combinação de mais de um método para uma avaliação conclusiva (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

## **6. Formulações mucoadesivas de aplicação vaginal**

A vagina é considerada uma via alternativa de liberação de fármacos e tem se mostrado bastante útil e vantajosa. Os géis são utilizados como transportadores de fármacos e

o avanço tecnológico de adjuvantes empregados para o desenvolvimento desse tipo de forma farmacêutica, atrai grande interesse dos pesquisadores. Como já mencionado anteriormente, a maior reclamação sobre a utilização desta via de administração é no sentido da não permanência da formulação por tempo suficiente no local de aplicação, acarretando na perda da eficácia do agente terapêutico (NEVES; BAHIA, 2006). Por isso, as formulações mucoadesivas para aplicação vaginal são tão importantes para contornar a principal dificuldade desta via.

Em 2001, foi desenvolvido um sistema inovador de aplicação vaginal contendo o Carbopol<sup>®</sup> 974P como agente mucoadesivo, promovendo o aumento do tempo de residência no local de aplicação pela formação de ligações dissulfeto entre o polímero e a camada do muco (VALENTA et al., 2001). Kast e colaboradores (2002) realizaram um estudo a fim de propor um novo sistema de liberação vaginal contendo clotrimazol. Com auxílio da quitosana, como copolímero catiônico e sistema carreador do fármaco, desenvolveram comprimidos com essa finalidade. Foi possível perceber que a combinação do clotrimazol com a quitosana, proporcionou melhores propriedades bioadesivas ao composto bem como, o controle da liberação do princípio ativo. Ainda, em 2002, Chang e colaboradores desenvolveram géis mucoadesivos de poloxamer e polycarbofila contendo o clotrimazol, para alcançar um tratamento mais eficaz contra candidíase vulvovaginal. A eficácia antifúngica aumentada e prolongada, conseguida pelos géis desenvolvidos, pode ser atribuída à mucoadesividade dos veículos utilizados na forma farmacêutica, provocando, dessa forma, um maior tempo de residência da formulação no sítio da infecção e promovendo a liberação sustentada do fármaco (CHANG et al., 2002). Szucs e seus colaboradores (2008) desenvolveram emulsões contendo os Pemulens<sup>®</sup>, TR1 e TR2, como emulsificante e agente bioadesivo, em diferentes concentrações, e verificaram a capacidade mucoadesiva por medidas reológicas, análise de textura e microscopia confocal. Por suas propriedades mucoadesivas conhecidas, o Pemulen<sup>®</sup> TR1 também foi utilizado para a obtenção de uma formulação vaginal com possíveis propriedades mucoadesivas, para o tratamento de vaginites, contendo o extrato de própolis vermelha como agente terapêutico (NUNES et al., 2012). Seguindo o mesmo objetivo de melhorar a terapia vaginal local com o aumento da retenção da formulação, Perioli e colaboradores (2008) prepararam alguns géis utilizando hidroxietilcelulose isoladamente ou misturada com a quitosana, contendo o metronidazol como princípio ativo do tratamento de vaginose bacteriana. Foi observado que a presença do polímero promoveu um maior contato da formulação com a mucosa vaginal, em comparação com as encontradas no mercado, porém

a associação com a quitosana não aumentou a força de adesão. Foi possível considerar um tratamento com menor frequência de administração, sem alterar consideravelmente o ambiente vaginal. Ainda, utilizando como polímero mucoadesivo a hidroxietilcelulose, mas concomitantemente com o Pluronic<sup>®</sup> F127 e F68, Aka-Any-Grah e colaboradores (2010) propuseram um gel vaginal mucoadesivo que mantivessem as suas propriedades após diluição com fluido vaginal.

A utilização de polímeros de origem natural também foi estudada por Pliszczak e colaboradores (2012), os quais avaliaram a mucoadesão de um gel vaginal contendo um polissacarídeo, a pectina, como promotor de adesão. Medidas reológicas mostraram a capacidade mucoadesiva da formulação, traduzidas pela interação da pectina com a mucina, correlacionando com métodos *in vitro* e *ex vivo*. Em 2014, ŞENYİĞİT e colaboradores avaliaram o uso de quitosanas de diferentes pesos molecular (de baixo, médio e alto) em gel vaginal contendo nitrato de econazol e nitrato de miconazol, para o tratamento de candidíase vaginal; bem como as diferenças percebidas na mucoadesão. Foi observado que a quitosana de médio peso molecular pode ser utilizada com grande eficácia, tendo um maior potencial mucoadesivo, com boa retenção vaginal, em relação às outras quitosanas testadas.

## **7. Nanotecnologia associada à mucoadesão**

A nanotecnologia é um campo da ciência o qual abrange diversas áreas tecnológicas, como engenharia, química e a área biológica. É caracterizada pela formação de estruturas que apresentam um tamanho inferior a 1µm. Novos avanços tecnológicos vêm sendo exaustivamente estudados, por trazer benefícios às suas áreas de aplicação (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Tratando-se da área farmacêutica, os sistemas nanoestruturados agem como vetores de fármacos que são neles incorporados, promovendo o controle da liberação em sítios específicos, o aumento da concentração terapêutica das substâncias e a diminuição de seus efeitos adversos, bem como a proteção da substância ativa frente à degradação (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; FLORES et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SAVIAN et al., 2014).

Existe uma infinidade de nanocarreadores de fármacos, mas podemos destacar alguns que possuem maior importância na área farmacêutica, como os lipossomas, as nanoemulsões,

as nanopartículas lipídicas e as nanopartículas poliméricas. As nanopartículas poliméricas envolvem tanto as nanocápsulas como as nanoesferas, diferenciando-se pela sua composição e estrutura. As nanocápsulas são estruturas vesiculares que possuem uma parede polimérica envolvendo o núcleo oleoso da estrutura, onde o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido na parede. Em contrapartida, as nanoesferas se caracterizam pela ausência do núcleo oleoso, formando então uma matriz polimérica, na qual o fármaco fica adsorvido ou retido (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRE; ALVES; POHLMANN et al., 2007; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; POHLMANN et al., 2013). Atualmente, devido a modificações no núcleo oleoso das nanocápsulas, nanocarreadores contendo uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano) foram denominadas de nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009; WEBER, 2014). A escolha do polímero deve ser realizada de acordo com a via de administração, a capacidade de encapsulamento, o pH, bem como se é biodegradável e biocompatível (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Entre os polímeros sintéticos mais utilizados, podemos destacar os derivados do lactídeo (PLA), lactídeo-co-glicóico (PLGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), e poli(acrilato) e poli(metacrilato) (Eudragits). Encontramos uma grande aplicação de polímeros de origem natural como a quitosana, alginatos e gelatinas. Ainda, co-polímeros como poli(lático)-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) e poli(lático-co-glicóico)-poli(etileno glicol) (PLGA-PEG) (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; DAS NEVES et al., 2014).

O desenvolvimento de formulações nanotecnológicas de uso tópico contendo fármacos recebe uma atenção especial devido às suas vantagens quando comparados à terapia convencional. É possível obter uma liberação controlada, proporcionando ao local de aplicação maior tempo de contato com a substância ativa e dessa forma, o aumento da eficácia terapêutica; melhorar a permeação cutânea possibilitando a penetração da substância em camadas mais profundas da pele (ALVES et al., 2007; MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2011). No caso de formulação tópica de uso vaginal, parâmetros como a presença do muco devem ser considerados. Além do epitélio vaginal, o muco serve como uma barreira protegendo o ambiente contra infecções, porém, pode interferir notavelmente na penetração, distribuição, absorção e, principalmente, no tempo de permanência da formulação. Dessa forma, as nanopartículas têm sido estudadas para a aplicação vaginal, promovendo uma liberação sustentada do fármaco, direcionamento ao sítio específico e aumento da eficácia terapêutica ou profilática (DAS NEVES, et al., 2014; ENSIGN; CONE; HANES, 2014).



Esposito e colaboradores (2012) propuseram uma formulação semissólida com poloxâmer como promotor da mucoadesão e contendo o clotrimazol em carreadores lipídicos nanoestruturados, desenvolvida para o tratamento de infecções fúngicas. Foi possível observar que essas nanoestruturas apresentaram sua atividade antifúngica aumentada contra *Candida albicans*, quando comparadas com o fármaco não associado e uma alternativa de tratamento mais adequada para aplicação direta na mucosa vaginal. O mesmo grupo de pesquisa subsequentemente realizou uma análise mais profunda das formulações desenvolvidas a fim de descrever os aspectos reológicos, o comportamento mucoadesivo, o efeito da diluição em fluido vaginal e a permeação através da mucosa vaginal animal, confirmando a proposta de uma formulação inovadora para administração de clotrimazol em infecções fúngicas vaginais, causadas por *Candida albicans* (RAVANI et al., 2013). Mirza e colaboradores (2013) propuseram o desenvolvimento de um gel mucoadesivo com Carbopol<sup>®</sup> 934 e Pluronic<sup>®</sup> F127 para aplicação vaginal, contendo nanoemulsão de itraconazol e o óleo de melaleuca, para tratamento de vaginoses. Obtiveram-se resultados satisfatórios, inclusive quanto à permeação do fármaco que foi favorecida pelo principal componente do óleo de melaleuca, o terpinen-4-ol. Nanocarreadores do tipo lipossomas foram estudados por Berginc e colaboradores (2014), onde lipossomas contendo a curcumina foram associados a polímeros naturais e sintéticos, a quitosana e o Carbopol<sup>®</sup> 974N. A presença dos polímeros mucoadesivos aumentou consideravelmente a permeabilidade na mucosa e a capacidade mucoadesiva, em relação ao controle, se tornando um sistema em potencial para a liberação da curcumina na via vaginal. Joraholmen e colaboradores (2014) também desenvolveram lipossomas revestidos com quitosana tendo como princípio ativo o clotrimazol. Foi observada uma liberação controlada e uma maior retenção do fármaco no tecido vaginal, evitando a penetração que nesse caso não era desejada.

Nanopartículas poliméricas podem conferir interessantes propriedades mucoadesivas quando utilizado para compor sua parede polimérica, um polímero com características catiônicas. Pensando nisso, Frank e colaboradores (2014) avaliaram o aumento do tempo de retenção e penetração de formulações semissólidas de quitosana, contendo nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 (caráter catiônico) e Eudragit<sup>®</sup> S100 (caráter aniônico). As formulações demonstraram características adequadas para a aplicação vaginal, com uma maior adesão conferida pela propriedade viscosa da mucosa vaginal com as propriedades elásticas do gel. Em relação à penetração, as formulações nanoencapsuladas com o polímero catiônico,

penetraram mais na mucosa devido à interação eletrostática com a mucina, carregada negativamente, promovendo a ação do fármaco de forma sistêmica.

## 8. Conclusão

As vantagens de formulações vaginais com propriedades mucoadesivas ainda têm sido extensivamente investigadas. A administração local dessas formulações é extremamente vantajosa, principalmente por sugerirem uma aplicação mais confortável para as pacientes, com a eficácia terapêutica aumentada. A descoberta de materiais mucoadesivos inovadores e a padronização das metodologias para confirmação do potencial mucoadesivo das formulações se faz necessária para alavancar ainda mais a via vaginal como uma rota eficaz de tratamento de infecções fúngicas.

## Referências bibliográficas

ALEXANDER, N.J.; BAKER, E.; KAPTEIN, M.; KARCK, U.; MILER, L.; ZAMPAGLIONE. Why consider vaginal drug administration? **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 1, p. 1-12, 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, p. 215–220, 2007.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T.P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

AKA-ANY-GRAH, A.; BOUCHEMAL, K.; KOFFI, A.; AGNELY, F.; ZHANG, M.; DJABOUROV, M.; PONCHEL, G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 296-303, 2010.

BERNARDES, A. Anatomia cirúrgica do aparelho genital feminino. **Manual de ginecologia**, v.1, c.1, 2009.

BERGINC, K.; ŠKALKO-BASNET, N.; BASNET, P.; KRISTL, A. Development and Evaluation of an In Vitro Vaginal Model for Assessment of Drug's Biopharmaceutical Properties: Curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v.13, n.4, 2012.

BODDUPALLI, B.M.; MOHAMMED, Z.N.K.; NATH, R.A., BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 381-387, 2010.

BURGESS, M.A.; BODEY, G.P. Clotrimazole: *In vitro* and clinical pharmacological studies. Antimicrobial. **Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 6, p. 423-426, 1972.

CARVALHO, C.F.; BRUSCHI, L.M.; EVANGELISTA, C.R.; GREMIÃO, D.P.M. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n.1, 2010.

CARVALHO, C.F.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, D.P.M. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

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.

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

CHOUDHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A Review on Novelty and Potentiality of Vaginal Drug Delivery. **International Journal of PharmTech Research**. v. 3, n. 2, p.1033-1044, 2011.

DAS NEVES, J.; NUNES, R.; MACHADO, A.; SARMENTO. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *in press*.

DE ASCENTIIS, A.; GRAZIA, J.L.; BOWMAN, C.N.; COLOMBO, P.; PEPPAS, N.A. Mucoadhesion of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) is improved when linear poly(ethylene oxide) chains are added to the polymer network. **Journal of Controlled Release**, v. 33, p. 197-201, 1995.

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

DIONÍSIO, M.; CORDEIRO, C.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; SEIJO, B.; DA COSTA, A.M.R.; GRENHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 102-113, 2013.

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

ESPOSITO, E.; RAVANI, L.; CONTADO, C.; CONSTENARO, A.; DRECHSLER, M.; ROSSI, D.; MENEGATTI, E.; GRANDINI, A.; CORTESI, R. Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 411-418, 2012.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEIGA, F. Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism na mucoadesive polymers. **Biopharmaceuticals Sciences**, v. 2, n. 4, p.216-233, 2007.

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

FRANK, L.A.; SANDRI, G.; D'AUTILIA, F.; CONTRI, R.; BONFERONI, M.C.; CAMELLA, C.; FRANK, A.G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3151-3161, 2014.

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.

HASSAN, E.E.; GALLO, J.M.; A Simple Rheological Method for the *in Vitro* Assessment of Mucin-polymer Bioadhesive Bond Strength. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 5, 1990.

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

JANA, U.; MOHANTY, A.K.; MANNA, P.K.; MOHANTA, G.P. Preparation and characterization of nebivolol nanoparticles using Eudragit® RS100. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 269-275, 2014.

JØRAHOLMEN, M.W.; VANI, Z.; THO, I.; ŠKALKO-BASNET, N. Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 94-101, 2014.

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.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M.D.; FLANAGAN, D.R. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 173-193, 2001.

KRISHNA, S.V.; ASHOK, V.; CHATTERJEE, A. A review on vaginal drug delivery systems. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences**, v. 1, n. 2, 2012.

MARCHIORI, M.L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; 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 dexametasone-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.

MERKUS, M.W.M.J.; TILBURG, M.D. Treatment of vaginal candidiasis: Orally or vaginally. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, n. 3, 1990.

MIRZA, M.A.; AHMAD, S.; MALLICK, Md.N.; MANZOOR, N.; TALEGAONKAR, S.; IQBAL, Z. Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: An in vitro, in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 275-282, 2013.

MISHRA, B.; PATEL, B.B; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9–24, 2010.

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

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6,p.231-239,1998

NIKAM, V.K.; KOTADE, K.B.; GAWARE, V.M.; DOLAS, R.T. Eudragit a versatile polymer : A review. **Pharmacologyonline**, v.1, p.152-164, 2011.

NUNES, L.C.C.; LIMA, M.A.R.; SOUSA, K.M.H.; PRADO, A.I.O.; SOARES-SOBRINHO, J.L.S; ROLIM-NETO, P.J. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 2, p.179-185, 2012.

OWEN, D.H.; KATZ, D.F.; A vaginal fluid stimulant. **Contraception**, v.59, p.91-95, 1999.

PERIOLI, L.; VANEZIA, L.; PAGANO, C.; RICCI, M.; ROSSI, C. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 141-145, 2008

POHLMANN, A.R.; FONSECA, F.N.; PAESE, K.; DETONI.; CORADINI.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. PCL microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

PLISZCZAK, D.; BORDES, C.; BOURGEOIS, S.; MAROTE, P.; Zahouani, H.; TUPIN, S.; MATTEI, C.P.; LANTÉRI, P. Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 168-174, 2012.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAVANI, L.; ESPOSITO, E.; BORIESC, C.; MOAL, L.V.; LOISEAUC, M.P.; DJABOUROVD, M.; CORTESI, R.; BOUCHEMAL, K. Clotrimazole-loaded nanostructured

lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 695-702, 2013.

RANGO RAO, R.V.; BURI, P. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 52, p. 265-270.

ROSS, A. R.; LEE, T.M.; ONDERDONK, B. A. Effect of *Candida albicans* Infection and Clotrimazole Treatment on Vaginal Microflora In Vitro. **Obstetrics and Gynecology**, v. 86, n. 6, p. 925-930, 1995.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, M.S.; PANDA, M.S. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A.I.H.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v.n33, p. 1389-1394, 2013.

SAVIAN, A.L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R.F.; MOTTA, M.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; ADAMS, A.I.H.; ANDRADE, D.F.; BECK, R.C.R.; SILVA, C.B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 69-76, 2015.

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

SENYIGIT, Z.A.; KARAVANA, S.Y.; ERAÇ, B.; GÜRSEL, O.; LIMONCU, M.H.; BALOGLU, E. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. **Acta Pharmaceutica**, v.64, p. 139-156, 2014.

SEKHAVAT, L.; TABATABAI, A.; TEZERJANI, F. Z. Oral fluconazole 150mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, p. 195-199, 2011.

SHARMA, D.; SINGH, M.; KUMAR, D.; SINGH, G. Novel paradigms in mucoadhesive drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 3, n. 8, p. 2455-2471, 2012

SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: a review. **International Urogynecological Journal**, v. 24, p. 537-543, 2013.

SURESH, P.; MANASA, K.; SATISH BABU, S.; BRAHMAIAH, B.; Sd.KHALILULLAH, SREEKANTH NAMA. Bioadhesive drug delivery system - A review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 1, p. 30-37, 2013.

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. Genital candidiasis. **Vaginal Infection**, v. 33, p. 62-65, 2005

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

SOBEL, J.D. Factors involved in patient choice of oral or vaginal treatment for vulvovaginal candidiasis. **Patient Preference and Adherence**, v. 8, p. 31-34, 2013.

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.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1583-1594, 2005.

TEGELI, V.S.; THORAT, Y.S.; SHIVSHARAN, U.S.; GAJELI, G.B.; KUMBHAR, S.T.; CHOUGULE, G.K. Pemulen as a versatile emulsifier. **International Journal of Drug Formulation & Research**, v. 2, n. 1, 2011.

VAL, I. C.; FILHO, G. A. Editorial: Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. **Jornal Brasileiro Doença Sexualmente Transmissível**, v. 13, n.4, p.3-5, 2011.

VALENTA, C.; KAST, C.E.; HAIRICH, I.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. **Journal of Controlled release**, v. 77, p. 323-332, 2001.



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

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, 2009.

VILLANOVA, J.C.O.; OREFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VILAS, D. G.; PEREIRO JR, M. Candidiasis mucocutâneas. **Piel**, v. 23, n. 8, p. 460-470, 2008

WEBER, J. Emprego do óleo de *Borago officinalis L.* no desenvolvimento de formulações semissólidas e nanocápsulas poliméricas destinada ao tratamento tópico de doenças inflamatórias da pele. **Dissertação Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

WORTZ, C.; PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; KLEINEBUDDE, P. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 843-853, 2013.

**CAPÍTULO 2:**  
Pemulen/Pullulan blended-hydrogels containing clotrimazole-loaded cationic  
nanocapules: evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation

---

**Pemulen/Pullulan blended-hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapules: evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation**

Julia A. de Lima<sup>1</sup>, Thamiris C. Paines<sup>1</sup>, Watussi B. Weber<sup>2</sup>, Mariana H. Motta<sup>1</sup>, Letícia Cruz<sup>1</sup>,  
Cristiane de B. da Silva<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\*Corresponding author: Cristiane de Bona da Silva

Departamento de Farmácia Industrial, Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

Tel: +55 55 3220-8452 Fax: +55 55 3220-8248

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

## ABSTRACT

In this work, hydrogels containing clotrimazole-loaded nanocapsules were developed using an association of two mucoadhesive polymers: Pemulen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan. For comparison, a hydrogel containing non-encapsulated drug was also evaluated. Different formulations were prepared and evaluated in relation to their mucoadhesive potential by falling liquid film method and permeation/penetration capacity through cow vaginal mucosa in Franz Cell. The results showed that the presence of Pullulan was important to increase the adhesive strength, independent of the layer used (mucin gel or animal mucosa). Furthermore, macroscopic characteristics, pH and spreadability of hydrogels were evaluated. The formulations showed homogeneous appearance and pH compatible with vaginal application (around 5.0). Similar spreadability profiles were showed for hydrogels containing clotrimazole-loaded nanocapsules and the free drug. Results of permeation/penetration study showed that the hydrogel containing clotrimazole-loaded nanocapsules was retained at vaginal mucosa surface, which is ideal for the treatment of superficial vaginal infections. This way, the Pemulen/Pullulan blended hydrogel is a promising alternative for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Key words: Pullulan, Hydrogels, Mucoadhesion, Clotrimazole, Nanocapsules

## 1 INTRODUCCION

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an inflammatory disease, in most instances caused by *Candida albicans*, affecting around 75% of child-bearing age women. Clinical features are mainly characterized by severe pruritus, vaginal discharge, vulvar erythema and dyspareunia (CASSONE, 2014). Treatment for VVC can be orally or topically, often with polyenes and azoles antifungals, such as clotrimazole (CTZ) (SOBEL, 2013). CTZ has a broad spectrum of action and it is highly effective by inhibiting ergosterol, the main component of the fungal membrane, causing damage to functional fungal structure (BURGESS AND BODEY., 1972, HASHEM et al, 2011).

In previous work, Santos and co-workers (2013) developed clotrimazole-loaded Eudragit<sup>®</sup> RS 100 nanocapsules suspension. The new formulation for the treatment of CVV, presented drug controlled release and *in vitro* antifungal activity against *Candida albicans*. The choice of Eudragit<sup>®</sup> RS100, a cationic polymer, was made due to its surface charge properties, which is able to interact with negatively charged biological surfaces. Thus, it allows an increase in the residence time of the nanoparticles when they interact with mucin (DILLEN et al., 2006; NIKAM et al, 2011). Despite the great potential presented by the nanocapsule suspensions, when it comes to the vaginal administration, this liquid dosage form hinders the proper administration of the drug, since it could easily leak from the application site. Therefore, it would be relevant the development of a semisolid formulation as final dosage form for clotrimazole-loaded nanocapsules.

There are several dosage forms for clotrimazole vaginal application: rings, tablets, suppositories, ointments, creams and gels; thus choosing the most appropriate treatment, whether local or systemic, will depend on the severity of the disease (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011). For this propose, gels are usually employed and exhibit desirable properties on vaginal application, such as ease of administration, low toxicity and non-irritating to mucosa membrane. However, despite being semisolid vaginal formulations, gels have also been associated with low retention time on vaginal epithelium, unpleasant sensation leak and low dose uniformity (KRISHNA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012). Thus, a gel with mucoadhesive properties could overcome these problems.

Mucoadhesion involves an interaction of biological surface (mucosa) with bioadhesive material (ANDREWS, LAVERTY AND JONES, 2009). Such dosage forms provide an

intimate contact of the formulation in the application surface, improving the bioavailability of the drug (SURESH et al., 2013).

To be considered mucoadhesive, the polymer should attend some important characteristics such as: high molecular weight; chain flexibility to control the interpenetration between polymer and mucosa; favoring diffusion; hydrophilicity, enabling strong adhesion with the mucus, which contains large amounts of water; must quick adherence to the tissue; and be specific to the surface (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; SURESH et al., 2013). The predominantly mucus's anionic nature, with several carboxylic groups, facilitates the formation of van der Waals and hydrogen bonds, thus mucoadhesion is a resulting physicochemical process. On the other hand, cationic polymers are also considered mucoadhesive due to the interaction with the mucus by their electric charge differences (CARVALHO et al., 2010). In this context, studies regarding mucoadhesive formulations for vaginal application are well described in literature using different polymers: chitosan (KAST et al., 2002; JORAHOLMEN et al., 2014); copolymer of polyoxyethylene and polyoxypropylene (Poloxamer<sup>®</sup> 407) (CHANG et al., 2002; MIRZA et al., 2013); cross-linked polyacrylate polymer (Carbopol<sup>®</sup> 934) (BALOGLU et al., 2003; DAS NEVES et al., 2008); hydroxypropylmethyl cellulose (AKA-ANY-GRAH et al., 2010); pectin (PLISZCZAK et al., 2012).

Regarding the benefits that mucoadhesive vaginal formulations could offer, the aim of this study was to propose an innovative semisolid formulation containing the association of two mucoadhesive polymers, Pemulen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan. Such polymers are little used, even though they show significant mucoadhesive properties, and their synergism may suggest increasing the mucoadhesive potential of formulation. Pemulen<sup>®</sup> TR1 is a polymer of anionic character, composed of acrylic block copolymers with high molecular weight (TEGELI et al., 2011). Their mucoadhesive property is due to the interpenetration in mucus chains (SCUZS et al., 2007). In its turn, Pullulan is a polysaccharide obtained by the fermentation fungus *Aureobasidium pullulans*. It has a high molecular weight and high water solubility. Moreover, it presents several functional properties such as the ability to form fibers and biodegradable films (DIONISIO et al., 2013; PRAJAPATI, JANI AND KHANDA, 2013).

In addition, nanotechnology formulations confer an interesting mucoadhesive aspect, due to a larger surface contact, increasing the interface to adhere to mucosa layer, remaining for a longer period, in contrast to larger structures (SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014). The nanocarriers systems of drugs (<1 $\mu$ m), were already widely studied, and confer

other advantages to formulations such as improving pharmacokinetics and biodistribution of therapeutic agents, vectorization for specific sites (SCHAFFAZICK et al. 2003; MISHRA PATEL; TIWARI, 2010), promoting controlled release and protection of the drugs against UV light (FONTANA et al, 2011;. SANTOS et al, 2013; SAVIAN et al., 2015) or volatilization (FLORES et al, 2011).

Thus, the aim of this work was to develop a semisolid formulation for the treatment of VVC, using the advances of the nanotechnology in association with mucoadhesive polymers: Pemulen<sup>®</sup> TR1 as a gel forming polymer and Pullulan to enhance mucoadhesion force. The hydrogels were characterized in relation to their physicochemical properties, mucoadhesive potential and permeation/penetration study using cow's vaginal mucosa as barrier. It is noteworthy that the association of these polymers is unprecedented in the literature.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Material**

Clotrimazole (100.39%, w/w) was obtained from Deg (São Paulo, Brazil). Eudragit<sup>®</sup> RS100 (Röhm Pharma, Germany) was donated by Almapal (São Paulo, Brazil). Sorbitan monooleate (Span<sup>®</sup> 80) and mucin porcine Type II were acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil); medium chain triglycerides, polissorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80), parabens (methylparaben and propylparaben), and triethanolamine were bought by Delaware (Porto Alegre, Brazil); Pemullen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan were kindly given by Dinaco (Rio de Janeiro, Brazil) and Corn products (São Paulo, Brazil), respectively. Imidazolidinyl urea was obtained from Fagron (São Paulo, Brazil). Chemical products and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade, and were used such as received.

### **2.2 Preparation and characterization of nanocapsule suspensions**

Clotrimazole-loaded nanocapsules (CTZ-NC) were prepared (n=3) according to described by Santos and co-workers (2013). After complete solubilization of the components, the organic phase [CTZ (0.02 g), Eudragit<sup>®</sup> RS100 (0,100 g), Span<sup>®</sup> 80 (0.077 g), medium chain triglycerides (0.3 g) and acetone (27 mL)] was added into aqueous solution (53 mL) of Tween<sup>®</sup> 80 (0.077 g), under the magnetic stirring for 10 minutes. The solvent was eliminated by evaporation under reduced pressure and the suspensions were adjusted at a final volume of 10 mL (2 mg/mL).

The physicochemical properties of the formulations were evaluated in relation to pH, mean particle size, polydispersity index, zeta potential, drug content and encapsulation efficiency.

pH measures were determined using a previously calibrated potentiometer (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil) at room temperature, directly in the samples. The mean particle size and polydispersity index (PDI) was performed ( $n = 3$ ) by photon correlation spectroscopy (Zetasizer<sup>®</sup> Nanoseries, Malvern Instruments, UK), in which an aliquot of formulation was diluted in ultrapure water (1:500). The nanocapsules were also analyzed in relation to zeta potential by electrophoretic mobility in the same equipment described for size measurement. For this, the samples were diluted in 10 mM NaCl solution (1:500), previously filtered in 0.45  $\mu\text{m}$  membrane.

The CTZ content was determined by HPLC, according to the following chromatographic conditions: Shimadzu LC-20A HPLC system (Shimadzu, Japan), equipped with LC-20AT pump, and PDA detector SPD-M20, CBM-20A as controller. The column used was a Phenomenex C18 (150 mm x 4.60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) and a C18 guard column (4.0 x 2.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) and a solution of methanol:water (80:20, v/v) as mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  and wavelength 229 nm. For the analysis, an aliquot of nanocapsules (CTZ-NC) were diluted in 10 mL of methanol and submitted to 10 minutes of sonication to extract the drug. Then, the samples were filtered in 0.45  $\mu\text{m}$  regenerated cellulose membrane and analyzed by HPLC. The analytical methodology was validated as specificity, linearity, precision and accuracy (BRASIL, 2003).

To evaluate the encapsulation efficiency, an aliquot of nanocapsules (400  $\mu\text{L}$ ) was exposed to ultrafiltration/centrifugation using centrifugal devices (Amicon<sup>®</sup> Ultra 10.000 MW, Millipore, Bedford, EUA) at 2200 $\times$ G during 10 min. The percentage of the drug associated to nanoparticles was determined by the difference between the total and the free drug amounts, by the HPLC, using the same methodology described above.

### **2.3 Evaluation of the mucoadhesion**

The mucoadhesive property of the nanocapsules was evaluated based on mucin-particle method described by Takeuchi and co-workers (2005). Mucin porcine Type II was suspended in ultrapure water 0.1% (w/v). Nanocapsules suspension was diluted into mucin solution (1:500) and after, the mean particle size and the zeta potential were determined in Zetasizer<sup>®</sup>.



## 2.4 Preparation of hydrogels

To obtain the semisolid formulations, Pemulen<sup>®</sup> TR1 was initially triturated in a beaker with imidazolidinyl urea and then, dispersed in water. The dispersion was neutralized with triethanolamine. After, the nanocapsules suspension (CTZ-NC), the Pullulan and the parabens solution were added. A hydrogel containing the CTZ non-associated was also prepared by solubilizing the drug in ethanol, and then incorporated into hydrogel base. Formulations with different amounts of Pullulan (1.5% and 3.0%) and without the polymer were also prepared. The quali-quantitative composition of the hydrogels is shown in Table 1. The hydrogels were named: HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC and HGPP<sub>1.5</sub>-CTZ-NC (hydrogels containing CTZ-loaded nanocapsules, and Pullulan at 3 and 1.5%); HGPP<sub>3</sub>-CTZ (hydrogel containing CTZ unloaded nanocapsules, and Pullulan at 3%), and HGP-NC-CTZ (hydrogels containing CTZ-loaded nanocapsules, without Pullulan).

**Table 1.** Quali-quantitative composition of hydrogels (25 g):

Components	HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC	HGPP <sub>1.5</sub> -CTZ-NC	HGP-NC-CTZ	HGPP <sub>3</sub> -CTZ
Pemulen <sup>®</sup> TR1	0.175 g	0.175 g	0.175 g	0.175 g
Imidazolidinyl urea	0.15 g	0.15 g	0.15 g	0.15 g
Triethanolamine	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.05 g
Pullulan	0.75 g	0.375 g	-	0.75 g
NC-CTZ	12.5 mL	12.5 mL	12.5 mL	-
Ethanol	-	-	-	12.5 mL
CTZ	-	-	-	0.025g
Ultrapure water	qs 25g	qs 25g	qs 25g	qs 25g
Paraben Solution	825 µL	825 µL	825 µL	825 µL

\*q.s., quantity sufficient

Parabens solution: 3% and 6% of metilparaben and propilparaben, in propyleneglycol, respectively.

All hydrogels were prepared in triplicate, packaged in plastic container and stored at room temperature ( $25 \pm 2$  °C), in oven.

## 2.5 Evaluation of mucoadhesive properties of hydrogels

### 2.5.1 Mucin Gel

To obtain the mucin layer, a mucin agar gel was prepared by dispersion of agar in water (1.5%, w/v) and when the temperature reached 40°C, it was added 1% Mucin Porcine Type II. After that, 3 mL of the mucin agar gel was placed into a mold (9x2 cm) until solid.

### 2.5.2 Animal Vaginal Mucosa

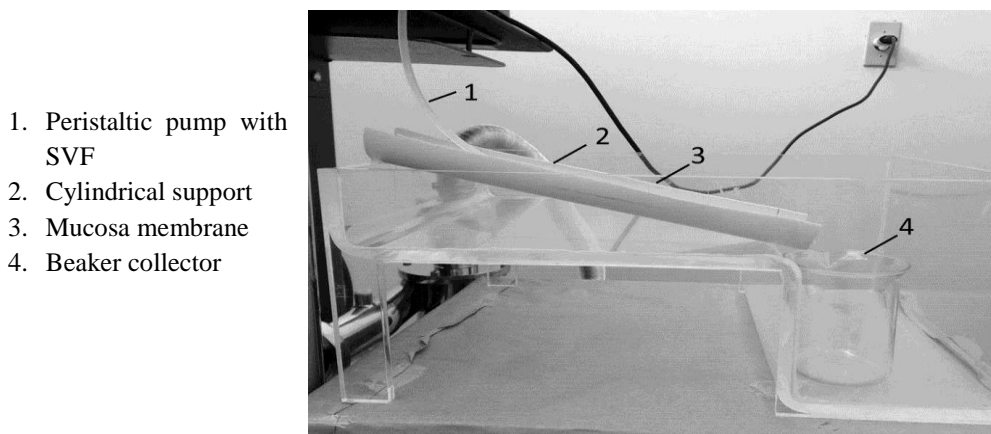
For the test, cow vaginal mucosa was used, obtained from a local slaughterhouse (Frigorífico Pampeano, Santa Maria/RS, Brazil). The mucosa was carefully separated from adjacent tissues and cut into appropriate size for the experiment (9x2 cm). The fragments were maintained frozen at -18 °C until the test (NEVES et al., 2008).

### 2.5.3 Preparation of Simulated Vaginal Fluid (SVF)

SVF was prepared as previously described (OWEN AND KATZ, 1999). For this, Sodium chloride (3.51 g), potassium hydroxide (1.4 g), calcium hydroxide (0.22 g), bovine serum albumin (0.018 g), lactic acid (2.0 g), acetic acid (1.0 g), glycerol (0.16 g), urea (0.4 g) and glucose (5.0 g) were added to 900 mL of distilled water in a beaker and stirred until complete dissolution. The final pH was adjusted to 4.8, compatible with the vaginal route (4.5 a 5.5) (NEVES, BAHIA, 2006) and the volume was completed to 1 L.

### 2.5.4 Falling liquid film method

The methodology was described by Nielsen and co-workers (1998) with some modifications (Figure 1). The mucosa (gel mucin or cow vaginal mucosa) was placed in a cylindrical tube longitudinally cut (30 cm) and disposed in an acrylic box. The formulation to be tested (1.0 g) was spread evenly over the mucosa layer, and then the SVF (37 °C) was pumped with a peristaltic pump at a flow of 0.21 L/h for 10 minutes through the mucosa into the tube. The effluent (semisolid effluent not adhered) was collected in a beaker receptor and CTZ was quantified by HPLC. The method was validated according to specificity, linearity and precision parameters (BRASIL, 2003).



**Figure 1:** Schematic illustration of an *in vitro* model for testing mucoadhesion

## 2.6 Physicochemical characterization and stability of the hydrogels

Selected formulations were analyzed for their physicochemical characteristics on the macroscopic analysis (odor, aspect and color), pH and particle size after aqueous dispersion, drug content and spreadability. The analyses were made after preparation of semisolid formulations (first 24 hours) and during a period of 60 days. The samples were stored in oven, at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). All formulations were analyzed in triplicate.

The pH values were determined after dispersion of hydrogels in distilled water (10%, w/v), using calibrated potentiometer (Seven Easy, Mettler Toledo, São Paulo, Brazil). For the mean particle size, the hydrogel were dispersed in ultrapure water 1:500 (w/v), filtered in quantitative filter (28  $\mu\text{m}$ ) and analyzed by photon correlation spectroscopy (Zetasizer<sup>®</sup>, Malvern Instruments, UK).

The content of CTZ in hydrogels was determined by HPLC, according the experimental conditions described in section 2.2. An aliquot (0.4 g) of each hydrogel was transferred to a volumetric flask (20 mL) containing methanol and the extraction of the drug occurred for 1 h at magnetic stirring. After that, the samples were centrifuged for 10 minutes and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) before HPLC analysis.

The spreadability of the semisolid formulation was determined according to the parallel plate method, described by Borghetti and Knorst (2006), with modifications (RIGO et al., 2012). The sample was placed in a plate hole-mold (1.0 cm) and then, the mold plate was carefully removed. After, glass plates of known weight were placed over the sample, in intervals of 1 min and the images were captured using the desktop scanner. The ImajeJ software (Version 1.48, National Institutes of Health, USA) was used to analyze data and the results were expressed in terms of spreading area obtained from scanned images. The spreadability factor (Sf) was calculated (n=3) and showed the expansion capacity of a formulation on a flat surface, when a particular amount is added on it, according to the equation 1:

$$(1) \quad \text{Sf} = A / W,$$

Where: Sf ( $\text{mm}^2/\text{g}$ ) = spreading factor; A = maximum spread area, and W = total weight added.

The spreading area was plotted against the plate weights in order to obtain the spreading profiles. Analyses were made at room temperature, in triplicate.

## 2.7 *Ex vivo* cow vaginal mucosa permeation/penetration studies

The study of permeation/penetration of CTZ from the hydrogels was performed using vertical Franz diffusion cells at  $37 \pm 0.5$  °C ( $n = 6$ ) and cow vaginal mucosa as barrier. The mucosa was properly prepared as mentioned in section 2.5.2. The diffusion area was  $1.77 \text{ cm}^2$  and 7.0 mL of receptor chamber was used. The receptor medium consisting of SVF pH 4.8 containing 1% of sodium lauryl sulfate and was continuously stirred. An amount of 0.5 g of each formulation, (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC and HGPP<sub>3</sub>-CTZ) (infinite dose) was applied into the mucosa surface. After 8 h, an aliquot of the medium was collected from the receptor compartment in order to evaluate if the drug had permeated through the membrane. The vaginal mucosa was removed and the excess of formulation was withdrawn with cotton. The mucosa was cut into pieces, put in contact with 5 mL of acetonitrile, vortexing during 2 min plus 15 minutes in ultrasonic bath for total extraction of the drug. The samples were filtered through a  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  regenerated cellulose membrane and injected ( $40 \text{ }\mu\text{L}$ ) in HPLC system (as described at section 2.3.3).

## 2.8 Statistical Analyses

All formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test, at a significance level of 5%.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Clotrimazole-loaded nanocapsule suspensions

In this work, clotrimazole-loaded nanocapsules (CTZ-NC) with mucoadhesive polymer Eudragit<sup>®</sup> RS100 were used for the development of hydrogels. Thus, the nanostructures ( $n = 3$ ) were prepared and characterized as described by Santos and co-workers (2013). CTZ-NC showed satisfactory characteristics, with nanometric mean size ( $137 \pm 5 \text{ nm}$ ); low polydispersity index, indicating the homogeneity of the system ( $0.012 \pm 0.02$ ); positive zeta potential ( $+15.7 \pm 1.6 \text{ mV}$ ) in accordance to the characteristic of the cationic polymer; slightly acidic pH ( $5.09 \pm 0.13$ ), drug content close to the theoretical value ( $2.00 \pm 0.020 \text{ mg/mL}$ ) and encapsulation efficiency of 99.93%.

Eudragit<sup>®</sup> RS100 is a cationic polymer able to interact with negatively charged surfaces, showing mucoadhesive characteristic (ADIBIKIA et al, 2011; MUZAFFAR et al, 2010). The surface property of mucoadhesive polymer can be modified by the adhesion,

causing the change of the zeta potential (Takeuchi, 2005). This is perceived when the CTZ-NC contacts with mucin particle (0.1%, w/v), and an electrostatic interaction occurs, resulting in an increase of the mean size and zeta potential inversion. The initial diameter of nanocapsules increased significantly ( $p < 0.05$ ) after the interaction with the mucin dispersion due to aggregation of the polymer/mucin particles ( $142 \pm 5$  nm to  $195 \pm 9$  nm).

In relation to zeta potential, the value initial was  $+35.7 \pm 4.0$  mV. For the test, nanocapsules suspension (CTZ-NC) was diluted in water (1:500), the same condition used for mucin solution. After the contact with mucin, the zeta potential changed to  $-5.32 \pm 0.23$  mV, demonstrating the possible involvement of the particle by mucin. According Takeuchi and co-workers (2005), mucin-particle method is well indicated to prove mucoadhesive properties of a particle, according to electrical theory. The hypothesis is that, the positively charged particle and the negatively charged mucin when in contact, promote a transfer of electrons, creating an electrical double layer at the particles/mucin interface. Thus, the mucoadhesion occurs due the attraction forces of electrical double layer. In 2010, Sriamornsak and co-workers, showed zeta potential alteration of mucin when contact with different concentrations of pectin, becoming more negatively charged particle.

## **3.2 Hydrogels**

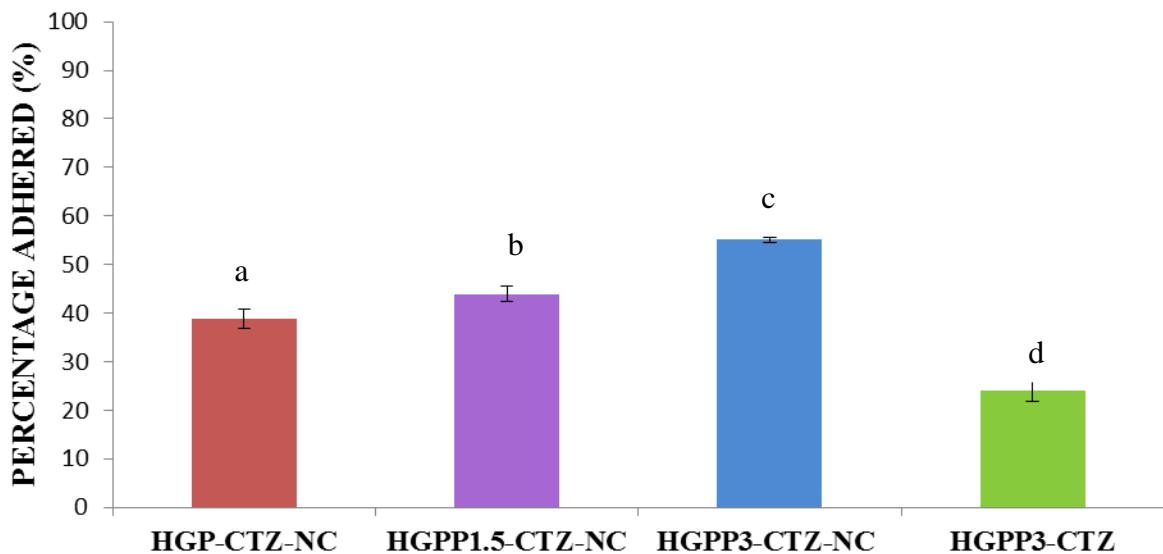
### *3.2.1 Evaluation of mucoadhesive properties*

Several animals' species have been used as a source of vaginal mucosa for assay mucoadhesion (Neves et al., 2008). Cow vaginal mucosa has been widely used in experiments due to its similar characteristics with human vaginal mucosa (BERGINC et al., 2012).

The mucoadhesion properties of hydrogels were investigated with the methodology described by Nielsen and co-workers (1998), with some modifications. We evaluate mucoadhesion of the hydrogels containing CTZ-NC with different concentrations of Pullulan (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC and HGPP<sub>1.5</sub>-CTZ-NC), a hydrogel without the polymer (HGP-CTZ-NC) and hydrogel containing CTZ unloaded nanocapsules (HGPP<sub>3</sub>-CTZ) using two different types of adhesion surface (mucin gel and cow vaginal mucosa). The mucin gel was chosen as a preliminary test, and then the selected formulations had their mucoadhesion proven in cow vaginal mucosa.

For quantification of CTZ, the analytical method was validated, and showed linearity at 0.1 to 10  $\mu\text{g/mL}$ , ( $r = 0.9996$  and  $y = 76082x - 4292.8$ ). Analysis of variance confirmed that had linear regression ( $F_{\text{calculated}}=37.57 > F_{\text{critical}}=4.96$ ;  $p \leq 0.05$ ). The medium used (SVF) did not demonstrate interference in the CTZ chromatographic peak, showing the specificity of the method.

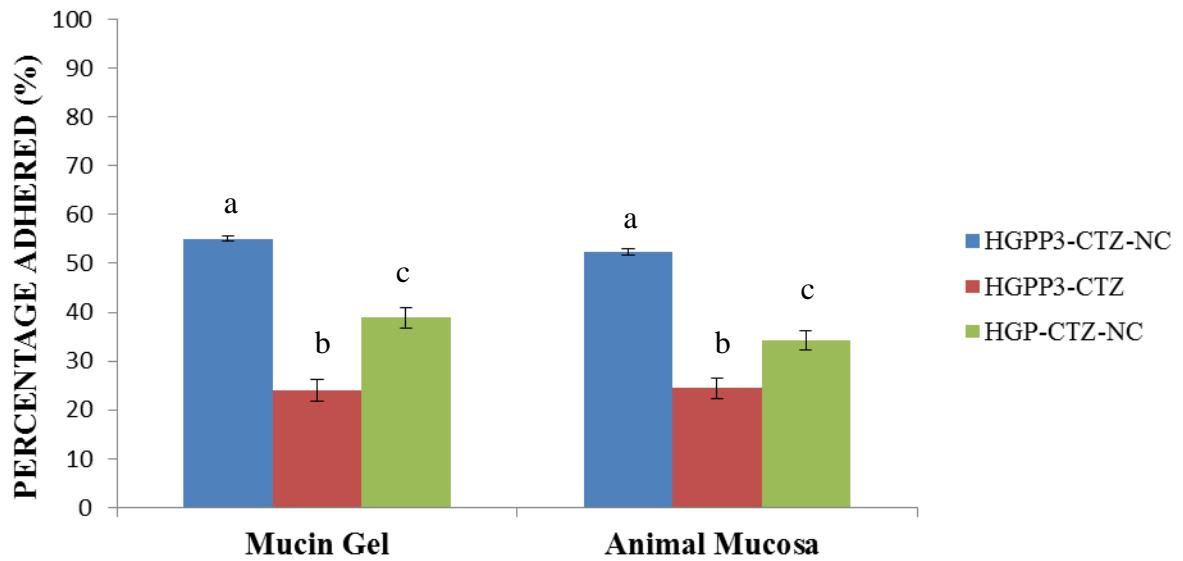
The results obtained in terms of percentage of CTZ adhered is shown in the Figure 2.



**Figure 2:** Percentage adhered of CTZ in relation to different formulations, by Mucin Gel method: hydrogel containing CTZ-NC without Pullulan (HGP-CTZ-NC), with 1.5% Pullulan (HGPP<sub>1.5</sub>-CTZ-NC) and 3% Pullulan (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC); and hydrogel with free drug (HGPP<sub>3</sub>-CTZ). Data are shows by mean  $\pm$  SD,  $n=3$ .

According to the results, mucoadhesion effects are due to the presence of Pullulan, when it was present in higher concentrations, as in HG-NC-CTZ-3%, 55.09% of CTZ was retained, in comparison with the minor concentration of Pullulan (43.94% of CTZ was retained) ( $p \leq 0.05$ ). Since, it is possible to evidence that the mucoadhesion property of CTZ-NC in particular the presence of Eudragit<sup>®</sup> RS100 polymer, as even the HGP-CTZ-NC, which showed greater mucoadhesion (38.83%) compared with HGP<sub>3</sub>-CTZ, which was able to retain only 24.05% of CTZ applied ( $p \leq 0.05$ ).

Thereby, 3% Pullulan was the selected concentration to continue the experiments with animal mucosa. Figure 3 shows a comparative study between the two barriers of adhesion.



**Figure 3:** Comparison study between two surfaces to adhesion (mucin gel and animal mucosa), showing the CTZ percentage adhered: hydrogel containing NC-CTZ, without Pullulan (HGP-CTZ-NC) hydrogel containing NC-CTZ and 3% Pullulan (HG-PP<sub>3</sub>-CTZ-NC); and hydrogel containing free drug and 3% Pullulan (HGPP<sub>3</sub>-NC). Data are shows by mean  $\pm$  SD, n=3.

Considering the results, there was no significant difference between the types of mucosa ( $p > 0.05$ ), which corroborated with the study conducted by Nielsen and co-workers (1998). The choice of methodology to be used to verify the mucoadhesion formulations will depend on the ease of obtainment of the mucosa, is natural (real tissue stemmed) or artificial (eg stemmed the mucin gel).

Nielsen and co-workers (1998) reported that the recovery of at least 70% of the formulation applied into the mucosa is an indicative of mucoadhesion. Frequently patients in treatment with vaginal formulations, complain of low retention at the application site and reduction of therapeutic efficacy (NEVES; BAHIA, 2006), for the reason that the high volume of vaginal fluid removes lipophilic drugs of vaginal cavity. Thus, adhesion of 55% of the formulation applied is relevant; in order the amount of SVF used (33.36 mL) was extremely higher than the amount that normally occurs in the human organism, 6 mL for day (OWEN; KATZ, 1999). Thus, the methodology described may be used as an indication of mucoadhesion of semisolid formulations. The anionic characters conferred on final formulation allows justify that the mucoadhesive molecules form hydrogen bonds and van der Walls, creating a strong interaction between the polymer chains.

### 3.3 Physicochemical characteristics and stability of hydrogels

Pemulen<sup>®</sup> TR1 is an emulsifier derivative of polyacrylic acid with a high molecular weight. Due to its chemical structure, it can rapidly swell in water, providing greater contact with the adhesive surface of mucin and promoting their interaction (TEGELI et al, 2011.). For these characteristics, Pemulen<sup>®</sup> TR1 was chosen for the development of hydrogels. The formulation of choice, HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC was evaluated in relation to its physicochemical characteristics and stability. Hydrogel containing CTZ non- associated (HGPP<sub>3</sub>-CTZ) was used for comparison.

When CTZ-NC was incorporated into Pemulen<sup>®</sup> TR1 hydrogels, the semisolid formulations (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) showed satisfactory organoleptic characteristics: homogeneous and bright aspect; white color, like a gel-cream, and characteristic odor. In its turn, HGPP<sub>3</sub>-CTZ differed by transparent color. All formulations showed a pH of around 5.00 (Table 2), and no significant differences between the hydrogels were observed ( $p > 0.05$ ). It is important to consider that formulations presented pH compatible with vaginal application between 4.5-5.5. Variations in vaginal pH can result in poor drug absorption (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013) and alteration in normal microflora (SOBEL; FARO; FORCE, 1998). Furthermore, the determination of pH is important for stability studies, since changes in their initial values may indicate instability of the formulation.

For quantification of CTZ in hydrogels, the analytical method was validated showing specificity, without interference of the adjuvants in the formulation and purity of peak = 1.00; linearity in the concentration from 10 to 30  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 76082x - 4292.8$ ;  $r = 0.9996$ ) and precision (RSD = 0.38%). CTZ content in all hydrogels, after preparation, was close to the theoretical value (1.00 and 0.99 mg/g) showing that the drug concentration was not changed by preparation and extraction.

Analysis of HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC showed the presence of nanometric particle (287 nm) and an acceptable polydispersity index (0.32), despite of significant increase comparing the nanocapsules suspension (137 nm and PDI = 0.012). This increase of mean particle size values and PDI, might be due to the presence of components that will become a barrier to a good dispersion of formulation, facilitating the aggregation of the nanoparticles (SANNA et al., 2010).

Hydrogels containing CTZ-loaded nanocapsules presented satisfactory physicochemical characteristics and were evaluated for their stability during storage ( $25 \pm 2$  °C), for 30 and 60 days (Table 2). For comparison, the hydrogel containing free drug was also kept under the same conditions.



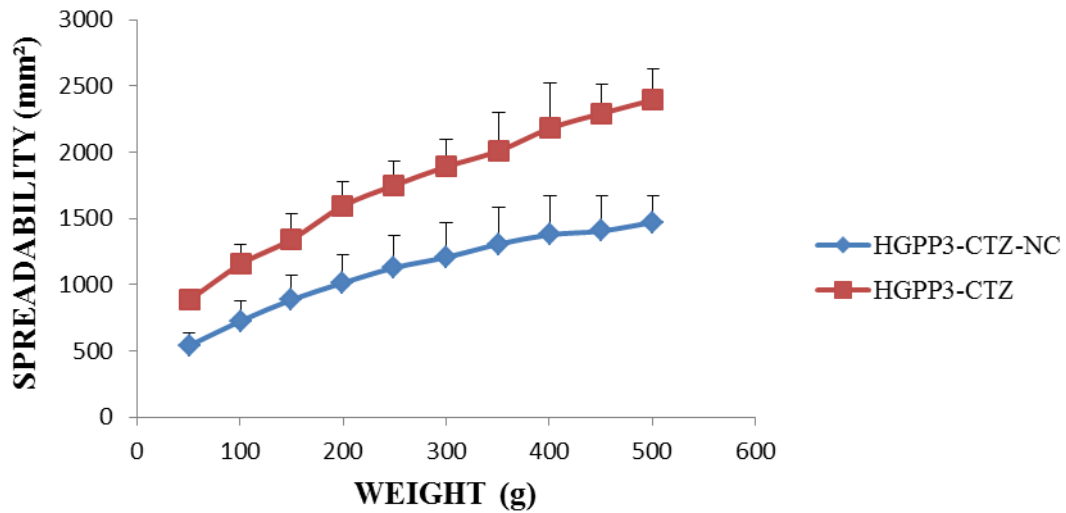
Table 2: Stability studies of hydrogels containing CTZ-NC (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) and free drug (HGPP<sub>3</sub>-CTZ), storage at 25 ± 2°C: pH values, drug content, spreadability factor (Sf), mean particle size (MS) and polydispersity index (PDI); mean ± SD

Time (days)	pH	Drug Content (mg/g)	Sf (mm <sup>2</sup> /g)	Mean Size (nm)	PDI
HGPP <sub>3</sub> -CTZ-NC					
0	5.02±0.01 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.001 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.4 <sup>a</sup>	287 ± 23 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>a</sup>
30	5.09±0,08 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.95± 0.33 <sup>b</sup>	291 ± 43 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>
60	5.11±0.02 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.72± 0.44 <sup>b</sup>	297 ± 60 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>a</sup>
HGPP <sub>3</sub> -CTZ					
0	5.03±0.01 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.78± 0.74 <sup>a</sup>		
30	5.11±0,07 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01	4.45±0.09 <sup>a</sup>	ND	ND
60	5.01±0.02 <sup>b</sup>	ND	4.36±0.54 <sup>a</sup>	ND	ND

\* Means, in column, with the same letter are not significantly different (ANOVA, Tukey test, p≤0.05); ND: not determinate

CTZ content in hydrogels containing nanocapsules (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) did not differ from theoretical value of 1.00 mg/g (p> 0.05) during the 60 days of storage, proving the drug protection by the polymeric wall (SANTOS et al., 2013). In its turn, the hydrogel containing CTZ non-encapsulated (HGPP<sub>3</sub>-CTZ) showed alteration in chromatographic peak, and after 60 days it was not possible to quantify the drug (Table 2).

The flow characteristics of semisolid formulations are complex because they depend on some factors, such as composition and raw materials, application site and packaging material, and methods of preparation. The spreadability of semisolid formulations occurs by the expansion of the formulation on a surface by adding an external force, after a specified period of time, by parallel-plates method (BORGHETTI; KNORTS, 2006; FLORES et al., 2014); related to the area of application, the sensory characteristics and clinical efficacy. The spreading profiles of hydrogels are shown in figure 4, and there is no difference in the spreadability profile with incorporation of nanostructures (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) compared to the free drug (HGPP<sub>3</sub>-CTZ). However, the incorporation of CTZ-NC decreases significantly the spreadability of the hydrogel. To better verify the differences, the spreadability factors (SF) were calculated. Hydrogels prepared with CTZ-NC (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) showed values of 2.94 mm<sup>2</sup>/g, lower than HGPP<sub>3</sub>-CTZ, which had values of 4.78 mm<sup>2</sup>/g. Whereas, for a mucoadhesive formulation, the lower spreadability factor would be a positive, because this way is able to remain at the application site evermore.

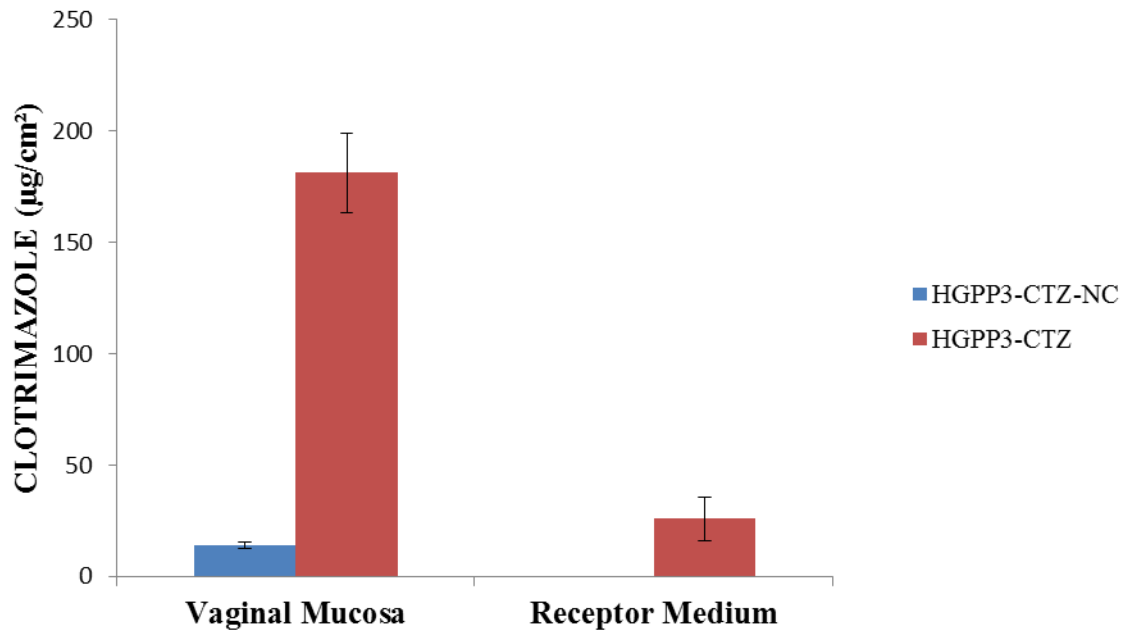


**Figure 4:** Spreadability of hydrogels: HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC (hydrogel CTZ-NC containing) and HGPP<sub>3</sub>-CTZ (hydrogel containing free drug).

Regarding to pH, both formulations (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC and HGPP<sub>3</sub>-CTZ) maintained their initial values during 60 days of storage ( $p > 0.05$ ) close to 5.1 (Table 2), being appropriate for vaginal application. The particle size and polydispersity index of the HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC remained at the nanoscale during 60 days.

### 3.4 *Ex vivo* cow vaginal mucosa permeation/penetration study

When considering local application, it is important that the drug avoids systemic absorption; therefore, no drug is found into receptor medium (RAVANI et al., 2013). Thus, the less CTZ pass through the vaginal mucosal, more effective the treatment for vulvovaginal candidiasis. In this study, the permeation/penetration through mucosa layer was evaluated by Franz diffusion cell using a cow vaginal mucosa as barrier replacing the human mucosa, considering their anatomical, physiological and functional similarities (BERGINC et al., 2012). The results (Figure 5) showed that after 8 hours of diffusion, CTZ was not found in the receptor relative to the hydrogel containing nanocapsule (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC); however, when hydrogels HGPP<sub>3</sub>-CTZ was applied, 25.76  $\mu\text{g/mL}$  of CTZ was quantified in receptor. In another aspect, after evaluate the CTZ content in the vaginal mucosa it was possible verify that HGPP<sub>3</sub>-CTZ penetrated considerable manner (181.14  $\mu\text{g/cm}^2$  of CTZ), while the HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC had a significantly lower penetration, (only 14.00  $\mu\text{g/cm}^2$  of CTZ) through mucosa ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 5:** *Ex vivo* study permeation/penetration study in vaginal mucosa (n = 6). Concentration CTZ was the same for all formulations (infinite dose): 0.5 g of hydrogel containing CTZ-NC (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) and hydrogel containing the free drug HGPP<sub>3</sub>-CTZ.

According to the results, the hydrogels containing clotrimazole-loaded nanocapsules retained most of the drug into vaginal mucosa, demonstrating that the polymers limited their direct contact with the mucosa. These results are in agreement with those found in mucoadhesion studies, where HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC was more adhered into mucosa, in relation to HGPP<sub>3</sub>-CTZ. Similar results were demonstrated by Ravani and coworkers (2013) where formulations containing CTZ-loaded into nanostructured lipid carriers, detect an amount of drug ten-fold lower when incorporated in a mucoadhesive hydrogel of poloxamer. Still, Joraholmen e coworkers (2014) showed that CTZ-coated liposomes were able to retain the drug into vaginal tissue, avoiding undesirable penetration; in contrast, the free drug significantly penetrated into the tissue (40%).

#### 4 CONCLUSION

This work demonstrated the feasibility to develop a semisolid formulation for the vulvovaginal candidiasis (VVC) treatment with mucoadhesive properties containing the novel combination of two polymers Pemulen<sup>®</sup> TR1 and Pullulan. The hydrogels containing

clotrimazole-loaded nanocapsules (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) showed satisfactory physicochemical characteristics compatible with vaginal application and were stable for 60 days; besides proving its mucoadhesive potential by falling liquid film method. It was also possible to observe the similarity of two mucosa membranes to evaluate the mucoadhesion, a mucin gel and animal vaginal mucosa. Nanocapsules suspension containing clotrimazole (CTZ-NC) also showed important mucoadhesive capacity, assigned the cationic character of the Eudragit<sup>®</sup> RS100, which was further evidenced when incorporated into hydrogel. *Ex vivo* study permeation/penetration showed the ability of the hydrogel containing the nanocapsules (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC) in reduce the penetration through the vaginal mucosa, compared to hydrogel containing non- associated drug (HGPP<sub>3</sub>-CTZ), indicating a significant feature formulation in topical therapy VVC.

## REFERENCES

ADIBKIA, K.; JAVADZADEH, Y.; DASTMALCHI, S.; MOHAMMADI, G.; NIRI, K.F MAHMOOD ALAEI-BEIRAMI. Naproxen–eudragit® RS100 nanoparticles: Preparation and physicochemical characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.83 p.155-159, 2011.

ANDREWS, G.P; LAVERTY, T.P; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

AKA-ANY-GRAH, A.; BOUCHEMAL, K.; KOFFI, A.; AGNELY, F.; ZHANG, M.; DJABOUROV, M.; PONCHEL, G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,v.76, p.296-303, 2010.

BALOGLU, E.; OZYAZICI, M.; HIZARCIOGLU, S.Y.; KARAVANA, H.A. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. **II Farmaco**, v.58, p.391-396, 2003.

BERGINC, K.; ŠKALKO-BASNET, N.; BASNET, P.; KRISTL, A. Development and Evaluation of an In Vitro Vaginal Model for Assessment of Drug's Biopharmaceutical Properties: Curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v.13, n.4, 2012.

BODDUPALLI, B.M.; MOHAMMED, Z.N.K.; NATH, R.A., BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.1, n. 4, p.381-387, 2010.

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo fitosolares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.4, p.531-537, 2006.

BURGESS, M.A.; BODEY, G.P. Clotrimazole: *In vitro* and clinical pharmacological studies. Antimicrobial. **Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 6, p. 423-426, 1972.

CARVALHO, C.F.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, D.P.M. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v.24, n.2, p.203-213, 2014

CARVALHO, C.F; BRUSCHI, L.M; EVANGELISTA, C.R; GREMIÃO, D.P.M. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n.1, 2010.

CASSONE, R. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 2014.

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.

CHOU DHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A Review on Novelty and Potentiality of Vaginal Drug Delivery. **International Journal of PharmTech Research**. v.3, n.2, p.1033-1044, 2011.

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

DAS NEVES, J.; AMARAL, M.H.; BAHIA, M.F. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, p.622–632, 2008.

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

DIONÍSIO, M.; CORDEIRO, C.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; SEIJO, B.; DA COSTA, A.M.R.; GRENHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, p.102-113, 2013.

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

FIGUEIRAS, A; CARVALHO, R; VEIGA, F. Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism na mucoadesive polymers. **Biopharmaceutics Sciences**, v.2, n.4, p.216-233, 2007.

FLORES, F. C; RIBEIRO, R. F; OURIQUE, A.F; POHLMANN, A.R; BECK, R.C.R; GUTERRES, S.S; ROLIM, C.M.B; SILVA, C.B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

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

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. **AAPS PharmSciTech**. v.12, p.879-886, 2011.

JØRAHOLMEN, M.W.; VANI, Z.; THO, I.; ŠKALKO-BASNET, N. Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.472, p.94–101, 2014.

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.

KRISHNA, S.V.; ASHOK, V.; CHATTERJEE, A. A review on vaginal drug delivery systems. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences**. v.1, n.2, 2012.

MISHRA, B.; PATEL, B.B; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p. 9–24, 2010.

MIRZA, M.A., AHMAD, S.; MALLICK, Md.N., MANZOOR, N.; TALEGAONKAR,S.; IQBAL, Z. Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: An in vitro, in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.103, p.275– 282, 2013.

MUZAFFAR, F.; MURTHY, N.V.; PAUL, P.; SEMWAL, R.; SHIVANAND, P. Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Microspheres of Amoxicillin Trihydrate by using Eudragit RS 100. **International Journal of ChemTech Research**, v.2, n.1, p. 466-470, 2010.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN,J. Bioadhesive drug delivery systems I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6,p.231-239,1998.

NIKAM, V.K.; KOTADE, K.B.; GAWARE, V.M.; DOLAS, R.T. Eudragit a versatile polymer : A review. **Pharmacologyonline**, v.1, p.152-164, 2011.

OWEN, D.H.; KATZ, D.F.; A vaginal fluid stimulant. **Contraception**, v.59, p.91-95, 1999.

PLISZCZAK, D.; BORDES, C.; BOURGEOIS, S.; MAROTE, P.; Zahouani, H.; TUPIN, S.; MATTEI, C.P.; LANTÉRI, P. Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.92, p.168-174,2012.

PRAJAPATI, V.D.; JANI, G.K.; KHANDA, S.M. PULLULAN: An exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, v.95, p.540-549, 2013.

RAVANI, L.; ESPOSITO, E.; BORIES, C.; MOAL, V.L.; LOISEAU, P.M.; DJABOUROVD, M.; CORTESI, R.; BOUCHEMAL, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.454, p.695-702, 2013.

RIGO, L.A; WEBER, J; SILVA, C.B; BECK, R.C.R. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulation using scanned imaged. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.31, n.10, p.1389-1391, 2012.

SANNA, V.; CARIA G.; MARIANI, A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. **Powder Technology**, v.201, p.32-36, 2010.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A.I.H.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v.33, p.1389-1394, 2013.

SAVIAN, A.L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R.F.; MOTTA, M.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; ADAMS, A.I.H.; ANDRADE, D.F.; BECK, R.C.R.; SILVA, C.B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**,v.46, p.69-76, 2015.



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

SOBEL, J.D. Factors involved in patient choice of oral or vaginal treatment for vulvovaginal candidiasis. **Patient Preference and Adherence**, v.8, p.31-34, 2013.

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.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v.39, p.2030-2075, 2014.

SRIAMORNSAK, P.; NATHAYA WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.54-59, 2010

SRIKRISHNA, S.; CARDOZO, L. The vagina as a route for drug delivery: a review. **International Urogynecological Journal**, v.24, p.537-543, 2013.

SURESH, P.; MANASA, K.; SATISH BABU, S.; BRAHMAIAH, B.; Sd.KHALILULLAH, SREEKANTH NAMA. Bioadhesive drug delivery system - A review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**. v.3, n.1, p.30-37, 2013.

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

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1583-1594, 2005.

TEGELI, V.S.; THORAT, Y.S.; SHIVSHARAN, U.S.; GAJELI, G.B.; KUMBHAR, S.T.; CHOUGULE, G.K. Pemulen as a versatile emulsifier. **International Journal of Drug Formulation & Research**, v.2, n.1, 2011.



## DISCUSSÃO GERAL

Os antifúngicos da classe dos imidazólicos são fármacos de amplo espectro e de grande eficácia no tratamento da candidíase vulvovaginal, agindo na inibição da enzima que forma o ergosterol, o principal componente da membrana fúngica (RANG et al., 2008). O clotrimazol é um antifúngico pertencente a esta classe de fármaco e é uma das substâncias de escolha para o tratamento de infecções vaginais causadas por *Candida spp.* (SOBEL, 2007; KHAN, BAQAI, 2010). Sua utilização se dá topicamente, pois se administrado de forma sistêmica pode desencadear alguns efeitos adversos, como distúrbios gastrintestinais e lesão hepática (RANG et al., 2008). A nanotecnologia é uma alternativa para contornar os efeitos adversos do clotrimazol, devido ao seu tamanho reduzido ( $<1\mu\text{m}$ ) e a capacidade de se distribuir em locais específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Diversos estudos mostraram as vantagens conferidas da incorporação desse fármaco em diferentes nanosistemas, como o controle da liberação e a manutenção da atividade antifúngica (SOUTO et al., 2004; BORHADE et al., 2012; DAS; NG; TAN, 2012; ESPOSITO et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Considerando a associação vantajosa de nanosistemas em formulações semissólidas, neste trabalho propôs-se o desenvolvimento de uma formulação semissólida inovadora para o tratamento local de candidíase vulvovaginal. O clotrimazol é utilizado geralmente em géis vaginais, na concentração de 1% (SOBEL, 2007), porém, é uma terapia pouco aceita por causar incômodo às pacientes, irritação, coceira e, principalmente, por extravasar facilmente do local de aplicação (NEVES; BAHIA, 2006; KRISHNA; ASHOK; CHATTERJEE, 2012). Dessa forma, formulações contendo agentes mucoadesivos se tornam interessantes para contornar essa dificuldade. Na literatura, já existem estudos mostrando o desenvolvimento de formulações semissólidas mucoadesivas para aplicação vaginal (CHANG et al., 2002; SZUCS et al., 2007; AKA-ANY-GRAH et al., 2010; PLISZCZAK et al., 2012; RAVANI et al., 2013; JORAHOLMEN et al., 2014). Para o desenvolvimento de formulações efetivas, é necessária a utilização de polímeros com características mucoadesivas pré-existentes e compatíveis com a via vaginal (VALENTA, 2005; SURESH et al., 2013). Esta via é adequada para aplicação de formulações com veículos mucoadesivos, conferindo uma maior retenção do ativo no local de ação com aumento da eficácia terapêutica, adequada para infecções superficiais (CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011).

Tendo em vista a variedade de polímeros mucoadesivos existentes, o enfoque inicial do trabalho foi avaliar o potencial mucoadesivo de suspensões de nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 contendo clotrimazol. A escolha do polímero, feita por Santos e colaboradores (2013), foi proposital, tendo em vista sua capacidade de promover liberação controlada e seu caráter catiônico, o qual facilita a interação com partículas de mucina, carregadas negativamente (NIKAM et al., 2011). Na literatura, encontramos diversos estudos que propõem a utilização de nanopartículas de Eudragit<sup>®</sup> RS100, alcançando um controle da liberação e aumentando o tempo de residência do fármaco no local de aplicação (DILLEN et al., 2006; ADIBKIA et al., 2011; JANA et al., 2014.); e também, sua aplicação especificamente no desenvolvimento de formulações mucoadesivas para aplicação vaginal (FRANK et al., 2014).

Mesmo que a suspensão de nanocápsula não seja proposta como uma formulação final, é interessante que como produto intermediário já apresente potencial mucoadesivo, o que pode vir por a potencializar o efeito final. Diversos testes mucoadesivos para polímeros foram desenvolvidos, sendo que, o método da partícula de mucina em suspensão é bastante simples (TAKEUCHI et al., 2005). Baseado nessa metodologia avaliou-se a capacidade mucoadesiva das suspensões pela alteração de tamanho de partícula e potencial zeta promovida quando entram em contato com uma suspensão aquosa de mucina. A propriedade de superfície das nanopartículas foi alterada pela adesão das partículas de mucina, promovendo a alteração do potencial zeta inicial de  $+35,7 \pm 4,0$  mV para  $-5,32 \pm 0,23$  mV. O aumento do tamanho de partícula ocorreu pela agregação das partículas de mucina nas nanocápsulas, devido à grande força de atração eletrostática presente na interface. Essa agregação também justifica a diminuição, em módulo, do potencial zeta, tendendo a valores próximos a zero mV (TAKEUCHI et al., 2005; SRIAMONSAK et al.; 2010).

Após a confirmação do potencial mucoadesivo das suspensões de nanocápsulas, estas foram incorporadas em formulações semissólidas do tipo hidrogel. O hidrogel (gel hidrofílico) é uma forma farmacêutica bem aceita pelo usuário, por não apresentar aspecto oleoso, ser de fácil remoção e sensorial agradável. Os polímeros utilizados para a formação e composição da forma farmacêutica final, também foram criteriosamente escolhidos, obtendo uma formulação capaz de potencializar a força de adesão já promovida pelas nanocápsulas, e aumentar seu tempo de residência na cavidade vaginal. Isso justifica a escolha do Pemulen<sup>®</sup> TR1 e do Pullulan.

A composição do Pemulen<sup>®</sup>, conhecido pelo seu potencial mucoadesivo (SZUCS et al., 2007), consiste em um bloco de copolímero de ácido acrílico e metacrilato de cadeia

longa, o qual possui uma porção hidrofílica e outra lipofílica (VALENTA, AUNER, 2004). Apresenta rápida liberação e baixo grau de irritação, pois é utilizado em baixas concentrações (menor que 1%) (SZUCS et al., 2007; TEGELI et al., 2011; NUNES et al, 2012). Dessa forma, julgou ser um polímero formador de gel adequado para o desenvolvimento das formulações. O Pullulan foi escolhido com o intuito de potencializar ainda mais a mucoadesão da formulação final. É um polissacarídeo produzido pela fermentação do *Aureobasidium pullulans*, e sua capacidade mucoadesiva é conferida pela formação de fibras e películas biodegradáveis e impermeáveis (LEATHERS, 2003; CHENG, DEMIRCI, CATCHMARK, 2011). A literatura reporta a sua utilização como agente mucoadesivo (DIONISIO et al., 2013; PRAJAPATI; JANI; KHANDA, 2013). Face ao exposto, os hidrogéis de Pemulen<sup>®</sup> foram desenvolvidos e avaliados quanto à mucoadesão. Formulações com diferentes concentrações de Pullulan foram testadas, a fim de confirmar a potencialização da força de adesão; bem como formulações com ou sem a presença das nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100.

A falta de padronização de metodologias para avaliar a mucoadesão, fez com que um novo método fosse proposto, baseado no descrito por Nielsen e colaboradores (1998). O método do escoamento de líquidos se baseia na aplicação da formulação em uma camada mucosa, disposta em tubo cilíndrico cortado longitudinalmente e disposto de forma inclinada em uma base. Sobre a formulação, é escoada uma solução (fluido vaginal simulado), sob um fluxo contínuo, provocando a remoção forçada da formulação do local de aplicação. A formulação não aderida, é coletada em um béquer e, após o processo de extração, é quantificada por CLAE. O percentual de mucoadesão é calculado pela diferença do teor de fármaco contido na formulação aplicada com o teor de fármaco quantificado no fluido receptor. Para essa análise foi necessária a validação da metodologia analítica, a qual se mostrou linear na faixa de 0,1 – 10 µg/mL, com coeficiente de correlação (r) de 0,9996; com regressão linear satisfatória ( $F_{\text{calculado}}=37,57 > F_{\text{tabelado}}=4,96$ ;  $p \leq 0,05$ ). A especificidade do método foi comprovada pela pureza do pico e pela não interferência do meio (fluido vaginal simulado) no pico do fármaco. Com a metodologia validada, foram desenvolvidos diferentes hidrogéis de Pemulen<sup>®</sup>: hidrogel contendo nanocápsula sem Pullulan (HGP-CTZ-NC); com 1,5% de Pullulan (HGPP<sub>1,5</sub>-CTZ-NC); com 3% de Pullulan (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC); e hidrogel contendo o fármaco não associado à nanocápsula (HGPP<sub>3</sub>-CTZ). Primeiramente, foi perceptível o aumento gradual do percentual de fármaco aderido promovido pelas formulações com as nanocápsulas, que continham maior concentração de Pullulan ( $p > 0,05$ ),

mostrando que a presença do Pullulan foi capaz de potencializar a mucoadesão final. O HGP-CTZ-NC apresentou aproximadamente cerca de 38% de clotrimazol retido na mucosa, enquanto que o HGPP<sub>1.5</sub>-CTZ-NC e HGPP<sub>3</sub>-CTZ, apresentaram, respectivamente, 43.94% e 55.09% de retenção ( $p>0,05$ ). Por conseguinte, a força de adesão promovida pelas nanocápsulas de Eudragit<sup>®</sup> RS100 foi mais uma vez confirmada, tendo em vista que os HGPP<sub>3</sub>-CTZ (fármaco não associado), com a maior concentração de Pullulan testada (3%), apresentou um percentual significativamente menor ( $p>0,05$ ) em relação à mesma formulação nanoencapsulada (HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC). Esse primeiro experimento foi realizado de forma preliminar, a fim de escolher a melhor formulação em relação ao potencial de mucoadesão. Nesse caso, como camada mucosa, desenvolvemos um gel de mucina (Figura 1), onde foi feita a dispersão da mucina (1%) em um gel de ágar, ainda quando estava na sua forma líquida (40°C).

De modo a obter um resultado de maior impacto científico, optamos por utilizar como camada uma mucosa animal para confirmar a mucoadesão das formulações. A literatura reporta a utilização da mucosa animal vaginal de vários animais: suíno (PERIOLI et al., 2008; FRANK et al., 2014), ovino (JORAHOLMEN et al, 2014), bovino (VALENTA et al., 2001; BALOGLU et al., 2003; BERGINC et al 2014). No nosso estudo, optamos pela mucosa de vaca, a qual foi obtida de frigorífico local e retirada de animais recém-sacrificados. A mucosa foi limpa com auxílio de um bisturi, retirado o excesso de gordura, cortada nos moldes adequados para o experimento e armazenadas em freezer (-18°C) (Figura 1).

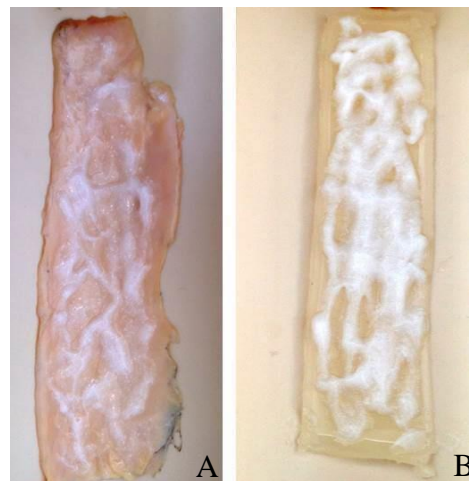


Figura 1: Fotografia das camadas mucosas utilizadas no experimento: Mucosa vaginal de vaca (A) e gel de mucina (B)

A mucoadesão realizada na mucosa animal corroborou com os resultados obtidos anteriormente com o gel de mucina, no qual o HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC mostrou um percentual de adesão próximos a 55%. Esses resultados, evidenciam ainda mais a capacidade mucoadesiva sinérgica quando associou-se os 3 polímeros: Eudragit<sup>®</sup> RS100, Pemulen<sup>®</sup> TR1 e Pullulan. Vale ressaltar que a quantidade de fluido vaginal simulado (33,36 mL) foi utilizada de forma a forçar a retirada da formulação da camada mucosa. O que ocorre no ambiente vaginal é diferente, pois a presença do muco e fluidos vaginais é de 0,5 a 0,75 mL em cada momento, o que já é suficiente para interferir na adesão da formulação. Dessa forma, é possível presumir que o HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC, quando aplicado na cavidade vaginal, promoverá uma adesão ainda maior devido a menor quantidade de fluido vaginal presente em relação ao experimento.

O segundo enfoque do trabalho foi a caracterização dos hidrogéis escolhidos pelo ensaio de mucoadesão. Os hidrogéis HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC foram avaliados quanto ao seu aspecto macroscópico, pH, teor de fármaco, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), espalhabilidade e estabilidade. HGPP<sub>3</sub>-CTZ também foram avaliados, com fins comparativos. Todos os hidrogéis apresentaram características organolépticas satisfatórias, aspecto brilhante e homogêneo. Os HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC apresentaram coloração branca, pela presença das nanocápsulas, diferente dos HGPP<sub>3</sub>-CTZ, que se mostraram incolores. O ambiente vaginal apresenta valores de pH ácidos, devido a produção de ácido lático causada pelos *Lactobacilos* normalmente presentes na flora (CHOUDHURY et al., 2011). Assim, o pH das formulações foi ajustado de forma a apresentar valores compatíveis com a aplicação vaginal, por isso, a adição de trietanolamina foi realizada de forma cuidadosa (pesada diretamente no béquer). Os valores ficaram na faixa de 5,00; sendo levemente ácidos e não provocando alteração na microflora vaginal normal (NEVES; BAHIA, 2006). No que diz respeito ao teor de fármaco, todas as formulações apresentaram valores próximos ao teórico (0,99 a 1,00 mg/g). Para essa quantificação, o método analítico foi validado e se mostrou linear na faixa de 10-30µg/mL ( $r=0,9996$ ), específico e preciso (DPR=0,38%). Os hidrogéis contendo as nanocápsulas apresentaram tamanho nanométrico (287 nm), mostrando a manutenção das nanopartículas após a incorporação na formulação final, e PDI de 0,32, acima do aceitável (0,25); mas por se tratar de formulação semissólida ainda é adequado. Quanto à espalhabilidade, ambas as formulações apresentaram comportamento semelhante e diferenças significativas não foram observadas ( $p<0,05$ ), demonstrando que a adição das nanocápsulas não modificou o perfil, como relatado em outros trabalhos científicos (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al. 2011; FLORES et al., 2014). Contudo, os valores do fator de espalhabilidade foram

significativamente diferentes entre os hidrogéis ( $p > 0,05$ ): 2,94 e 4,78 mm<sup>2</sup>/g, para HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC e HGPP<sub>3</sub>-CTZ, respectivamente. Esse valor pode estar relacionado com a característica de mucoadesão dos HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC, pois a sua grande força de adesão tende a conceder uma maior resistência ao espalhar, quando determinada força é aplicada.

Após a caracterização, as formulações semissólidas, foram armazenadas em estufa com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 60 dias. Seu aspecto macroscópico se manteve estável, não sendo observadas alterações de cor e odor. Os valores de pH também se mantiveram na faixa ácida e diferenças significativas não foram verificadas entre as análises ( $p < 0,05$ ). Para HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC, o teor de CTZ não diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do valor teórico de 1,00 mg/g, durante o tempo de armazenamento. Entretanto, um aumento significativo no teor de CTZ foi observado para os HGPP<sub>3</sub>-CTZ após 30 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ). (cerca de 1,5%) apresentavam em sua composição uma alta concentração de etanol (50%), necessária para solubilização do fármaco. Outro fator que demonstra a conservação das nanopartículas foi a manutenção do tamanho de partículas e PDI, que não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A espalhabilidade do HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC mostrou aumento significativo no tempo inicial ( $p > 0,05$ ), chegando a valores próximo a 4,00. Após esse período, de manteve estável. Isso, porém, não é considerado indicativo de instabilidade da formulação, tendo em vista a manutenção de todos os outros parâmetros. É possível então afirmar, que as formulações semissólidas desenvolvidas são estáveis por no mínimo 60 dias, à temperatura ambiente.

Para avaliar a permeação/penetração *ex vivo* em mucosa vaginal de vaca das formulação, a aquisição e utilização da mucosa se deu da mesma forma como descrito no ensaio de mucoadesão. Como o desenvolvimento da formulação semissólida mucoadesiva propunha um tratamento para as infecções superficiais, como a candidíase vulvovaginal, é de extrema importância que além do alto grau de aderência na mucosa, a formulação tenha somente ação local. Isso evita que ocorra a passagem através da mucosa, caindo na corrente sanguínea e alcançando a ação sistêmica, ou seja, a força de adesão deve ser tão significativa que o contato com a mucosa seja restrito ao local de aplicação (SOBEL, 2007; CHOUDHURY; DAS; KAR, 2011; RAVANI et al.; 2013;). Dessa forma, com a utilização de células de difusão de Franz, foi avaliada a capacidade das formulações em permear ou penetrar através da mucosa. O meio receptor utilizado foi o fluido vaginal simulado com a adição de 1% de lauril sulfato de sódio, tornando o meio mais lipofílico, e garantindo a condição *sink*. Foi observado que os HGPP<sub>3</sub>-CTZ-NC conseguiram manter a sua ação restrita



a superfície da mucosa, não sendo observada a presença de nenhum resíduo de fármaco no compartimento receptor. Em contrapartida, os HGPP<sub>3</sub>-CTZ apresentaram 25,76 µg/mL de fármaco no compartimento receptor, mostrando que ocorre a sua penetração através da mucosa, o que nessa situação, é indesejada.

Por fim, o conjunto de resultados apresentados nesse trabalho demonstra a viabilidade de desenvolvimento de formulações semissólidas mucoadesivas, para o tratamento de infecções fúngicas vaginais. Além disso, as vantagens conferidas a essas formulações quando associadas à nanopartículas poliméricas. Como perspectiva para continuidade do trabalho, é interessante traçar um perfil *in vivo* do comportamento dessas formulações, bem como a sua eficácia terapêutica frente à *Candida albicans*.



## CONCLUSÕES

- As suspensões de nanocápsulas apresentadas nesse trabalho apresentaram características físico-químicas adequadas;
- A presença do Eudragit<sup>®</sup> RS100 como componente da parede polimérica, conferiu um potencial mucoadesivo as nanocápsulas devido ao caráter catiônico;
- O desenvolvimento de hidrogéis mucoadesivos de Pemulen<sup>®</sup> TR1 contendo as nanocápsulas poliméricas apresentaram características físico-químicas aceitáveis para aplicação vaginal e estabilidade de 60 dias quando armazenadas em temperatura ambiente;
- A metodologia utilizada para determinação da mucoadesão foi reprodutível em diferentes camadas mucosa, gel de mucina e mucosa animal;
- A presença do Pullulan potencializou a força de mucoadesão das formulações, em relação as formulação sem este polímero;
- O caráter catiônico das nanocápsulas foi importante para proporcionar uma maior mucoadesão à formulação semissólida final;
- Os hidrogéis contendo as nanocápsulas apresentaram melhor retenção na superfície da mucosa vaginal de vaca, sendo adequados para tratamento de infecções fúngicas superficiais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADIBKIA, K.; JAVADZADEH, Y.; DASTMALCHI, S.; MOHAMMADI, G.; NIRI, K.F MAHMOOD ALAEI-BEIRAMI. Naproxen–eudragit® RS100 nanoparticles: Preparation and physicochemical characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.83 p.155-159, 2011.

ANDREWS, G.P; LAVERTY, T.P; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

AKA-ANY-GRAH, A.; BOUCHEMAL, K.; KOFFI, A.; AGNELY, F.; ZHANG, M.; DJABOUROV, M.; PONCHEL, G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,v.76, p.296-303, 2010.

BALOGLU, E.; OZYAZICI, M.; HIZARCIOGLU, S.Y.; KARAVANA, H.A. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. **II Farmaco**, v.58, p.391-396, 2003.

BERGINC, K.; ŠKALKO-BASNET, N.; BASNET, P.; KRISTL, A. Development and Evaluation of an In Vitro Vaginal Model for Assessment of Drug's Biopharmaceutical Properties: Curcumin. **AAPS PharmSciTech**, v.13, n.4, 2012.

BURGESS, M.A.; BODEY, G.P. Clotrimazole: *In vitro* and clinical pharmacological studies. Antimicrobial. **Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 6, p. 423-426, 1972.

CARVALHO, C.F.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, D.P.M. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v.24, n.2, p.203-213, 2014

CARVALHO, C.F; BRUSCHI, L.M; EVANGELISTA, C.R; GREMIÃO, D.P.M. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n.1, 2010.

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.

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

CHOUDHURY, A.; DAS, S.; KAR, M. A Review on Novelty and Potentiality of Vaginal Drug Delivery. **International Journal of PharmTech Research**. v.3, n.2, p.1033-1044, 2011.

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

DAS NEVES, J.; NUNES, R.; MACHADO, A.; SARMENTO. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *in press*.

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

DIONÍSIO, M.; CORDEIRO, C.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; SEIJO, B.; DA COSTA, A.M.R.; GRENHA, A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.50, p.102-113, 2013.

ESPOSITO, E; RAVANI, L; CONTADO, C; CONSTENARO, A; DRECHSLER, M; ROSSI, D; MENEGATTI, E; GRANDINI, A; CORTESI, R; Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. **Materials Science and Engineering**, v.33. p. 411-418, 2012.

FLORES, F. C; RIBEIRO, R. F; OURIQUE, A.F; POHLMANN, A.R; BECK, R.C.R; GUTERRES, S.S; ROLIM, C.M.B; SILVA, C.B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

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

FRANK, L.A.; SANDRI, G.; D'AUTILIA, F.; CONTRI, R.; BONFERONI, M.C.; CAMELLA, C.; FRANK, A.G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.3151-3161, 2014.

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.

JØRAHOLMEN, M.W.; VANI, Z.; THO, I.; ŠKALKO-BASNET, N. Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.472, p.94–101, 2014.

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.

KRISHNA, S.V.; ASHOK, V.; CHATTERJEE, A. A review on vaginal drug delivery systems. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences**. v.1, n.2, 2012.

MARCHIORI, M.L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; 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 dexametasone-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.

MERKUS, M.W.M.J; TILBURG, M.D. Treatment of vaginal candidiasis: Orally or vaginally. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.23, n.3, 1990  
MISHRA, B.; PATEL, B.B; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p. 9–24, 2010.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6,p.231-239,1998.

NIKAM, V.K.; KOTADE, K.B.; GAWARE, V.M.; DOLAS, R.T. Eudragit a versatile polymer : A review. **Pharmacologyonline**, v.1, p.152-164, 2011.

NUNES, L.C.C.; LIMA, M.A.R.; SOUSA, K.M.H.; PRADO, A.I.O.; SOARES-SOBRINHO, J.L.S; ROLIM-NETO, P.J. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.93, n.2, p.179-185, 2012.

PERIOLI, L.; VANEZIA, L.; PAGANO, C.; RICCI, M.; ROSSI, C. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.141-145, 2008

PLISZCZAK, D.; BORDES, C.; BOURGEOIS, S.; MAROTE, P.; Zahouani, H.; TUPIN, S.; MATTEI, C.P.; LANTÉRI, P. Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.92, p.168-174,2012.

PRAJAPATI, V.D.; JANI, G.K.; KHANDA, S.M. PULLULAN: An exopolysaccharide and its various applications. **Carbohydrate Polymers**, v.95, p.540-549, 2013.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

RAVANI, L.; ESPOSITO, E.; BORIES, C.; MOAL, V.L.; LOISEAU, P.M.; DJABOUROVD, M.; CORTESI, R.; BOUCHEMAL, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.454, p.695-702, 2013.

ROSS, A. R.; LEE, T.M.; ONDERDONK, B. A. Effect of *Candida albicans* Infection and Clotrimazole Treatment on Vaginal Microflora In Vitro. **Obstetrics and Gynecology**, v.86, n.6, p. 925-930, 1995.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L.M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A.I.H.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v.33, p.1389-1394, 2013.

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

SEKHAVAT, L; TABATABAI, A; TEZERJANI, F. Z. Oral fluconazole 150mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. **Journal of Infection and Public Health**, v.4, p. 195-199, 2011.

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. Genital candidiasis. **Vaginal Infection**, v.33, p.62-65, 2005



SRIAMORNSAK, P.; NATHAYA WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.54-59, 2010

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

SURESH, P.; MANASA, K.; SATISH BABU, S.; BRAHMAIAH, B.; Sd.KHALILULLAH, SREEKANTH NAMA. Bioadhesive drug delivery system - A review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**. v.3, n.1, p.30-37, 2013.

SZUCS, M.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; CAMELLA, 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.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1583-1594, 2005.

TEGELI, V.S.; THORAT, Y.S.; SHIVSHARAN, U.S.; GAJELI, G.B.; KUMBHAR, S.T.; CHOUGULE, G.K. Pemulen as a versatile emulsifier. **International Journal of Drug Formulation & Research**, v.2, n.1, 2011.

VAL, I. C.; FILHO, G. A. Editorial: Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. **Jornal Brasileiro Doença Sexualmente Transmissível**, v. 13, n.4, p.3-5, 2011.

VALENTA, C.; KAST, C.E.; HAIRICH, I.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. **Journal of Controlled release**, v. 77, p. 323-332, 2001.