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

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUPOSITÓRIOS VAGINAIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE TIOCONAZOL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Filippin Cossetin

Santa Maria, RS, Brasil

2015

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUPOSITÓRIOS VAGINAIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE TIOCONAZOL

Luciana Filippin Cossetin

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. Dr. Cristiane de Bona da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cossetin, Luciana Filippin
Desenvolvimento tecnológico de supositórios vaginais contendo nanopartículas poliméricas de tioconazol. / Luciana Filippin Cossetin.-2015.
91 f.; 30cm

Orientadora: Cristiane de Bona da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Nanopartículas poliméricas 2. Tioconazol 3. Produtos sólidos 4. Supositórios vaginais 5. Spray-drying I. Silva, Cristiane de Bona da II. Título.

© 2015
Todos os direitos autorais reservados a Luciana Filippin Cossetin. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: lucianacossetin@gmail.com

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 TECNOLÓGICO DE SUPOSITÓRIOS VAGINAIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE TIOCONAZOL

elaborada por
Luciana Filippin Cossetin

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiane de Bona da Silva, Prof. Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Aline Ferreira Ourique, Prof. Dra. (UNIFRA)

Gisele Scotti do Canto, Prof. Dra. (UFSM)

Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

À minha Família, maior exemplo de perseverança e que apesar das dificuldades e das minhas ausências souberam transmitir apoio e amor constante; e Namorado, pelo incentivo, conforto e alegrias proporcionadas para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado caminhos e oportunidades na minha vida para chegar até aqui e com muita fé concluir mais uma etapa.

Aos meus pais, pelo apoio e pela compreensão, por muitas vezes não poder estar ao lado deles em momentos de reunião em família, em momentos difíceis na qual mesmo sabendo da importância da minha presença ou mesmo passar fins de semana consecutivos eu não pude estar presente. Tudo isso, com certeza, por estar envolvida na construção desta dissertação, mais uma conquista nossa! Minha eterna gratidão e honra a vocês, meus pais, meus heróis, meus exemplos de força e perseverança.

A minha irmã, Jo, mais que querida, que conseguiu conviver comigo nesses dois últimos anos os quais foram vividos com os mais variados sentimentos. Você foi quem aguentou as minhas chatices e brigas, mas foi também quem esteve sempre presente sendo a pessoa que todo dia quando chegava em casa eu podia conversar, desabafar e compartilhar todas experiências vividas. Minha eterna amiga, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu namorado, Ricardo, agradeço de coração cheio de sentimentos puros e verdadeiros, pela sua companhia a qual sempre me fez e faz sentir-me mais feliz. Sensação, essa, que foi essencial na construção deste trabalho, sobretudo na reta final. Também, pelo apoio, dedicação e compreensão; por todos esses anos convividos com quem pude dividir minhas tristezas e compartilhar minhas alegrias e conquistas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me dando forças quando eu mesma duvidava que as tinha. Muito obrigada!

Agradeço a minha colega e amiga Maiara, companheira de longa data, a quem devo boa parte desta conquista. Meus mais sinceros agradecimentos pela amizade que construímos ao longo destes 8 anos e pelo apoio incondicional que sempre me dá. Sem isso, certamente, não teria chegado até aqui. Meu muito obrigado!

Agradeço as colegas e amigas do Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, pela amizade, paciência e pelo suporte, tão determinantes para a realização deste trabalho, em especial: Aline Silveira, Roberta, Watussi, Grazi, Joseane, Thamires, Tati, Lara, Taísa, Nadine, Aline Schineider, Sílvia e Raquel. Agradeço também a Mariana, Júlia e Fernanda pelas análises realizadas no zeta e máster, bem como auxílios e conhecimentos compartilhados sobre o HPLC. Meus mais sinceros agradecimentos.

À Jéssica, minha IC, a qual foi fundamental na construção deste trabalho, pois a partir do nosso trabalho conjunto e convívio diário conseguimos chegar até o final desenvolvendo-o com muita responsabilidade e dedicação contornando as dificuldades e obstáculos sem deixar que o cansaço nos atingisse.

Á Rose, querida! A tua presença e cia. diária além do teu "bom dia contagiante"e o apoio incondicional contribuíram, sem duvidas, para a conclusão deste trabalho. Meu muito obrigado!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização deste trabalho.

À professora Cristiane de Bona da Silva por ter confiado no meu trabalho e no meu potencial, pela transmissão de seus conhecimentos, além de ter servido como base sólida para a construção deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e me incentivaram nessa jornada. Meu muito obrigado!

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUPOSITÓRIOS VAGINAIS CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE TIOCONAZOL

AUTORA: Luciana Filippin Cossetin
ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva
Data e Local da Defesa: 14 de agosto de 2015, Santa Maria.

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados tem proporcionado melhor controle da liberação e o direcionamento de substâncias ativas ao local terapêutico, minimizando, assim, efeitos adversos, além de contribuir para o aumento da eficácia terapêutica. Neste sentido, esses carreadores constituem uma alternativa para o desenvolvimento de produtos administrados pela via vaginal, pois as formas farmacêuticas comumente utilizadas promovem distribuição e penetração inadequadas dos fármacos, além do reduzido tempo de permanência no local. Com isso, este trabalho teve por objetivo desenvolver supositórios vaginais contendo produtos secos preparados a partir de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo tioconazol, um antifúngico utilizado no tratamento de vulvovaginites. As suspensões de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (3 mg/mL) foram preparadas pela técnica da nanoprecipitação e avaliadas quanto ao diâmetro médio de partículas (166 – 203 nm), índice de polidispersão (inferior a 0,20), potencial zeta negativo (6 – 10 mV), pH (fracamente ácido), teor de fármaco (próximo ao teórico) e eficiência de encapsulamento (aproximadamente 100%), as quais foram adequadas e estáveis durante o período de 30 dias sob condições de temperatura ambiente. Após a preparação, as suspensões foram submetidas à secagem por aspersão para a obtenção dos produtos sólidos intermediários, os quais foram caracterizados em relação ao rendimento ponderal, índice de ressuspensão em água, perfil de distribuição de tamanho de partículas, teor de fármaco, umidade e morfologia. Quanto a essas características, os resultados foram satisfatórios: rendimento ponderal de, aproximadamente, 60%, conteúdo de fármaco próximo do valor teórico (21 mg/g), índice de ressuspensão próximo a unidade e recuperação do tamanho submicrométrico das partículas. Essas características mantiveram-se, após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente, somente para os produtos secos contendo as nanoesferas. Posteriormente, os produtos secos foram incorporados em uma base de gelatina-glicerina a fim de obter supositórios vaginais. Todas as formulações apresentaram características de superfície e de dimensões homogêneas; teor de fármaco próximo da concentração teórica (23 mg/supositório); peso médio entre 4,51 e 4,57 g; uniformidade de conteúdo e tempo de desintegração inferior a 60 minutos. Os supositórios constituídos pelas nanoesferas possibilitaram um maior controle da liberação do tioconazol em comparação aos supositórios contendo o fármaco não associado. Dessa forma, as formulações propostas neste trabalho poderão constituir uma alternativa para a administração do tioconazol pela via vaginal, de melhor aceitabilidade face às formas farmacêuticas já existentes (cremes, géis) possibilitando, por hipótese, um maior efeito terapêutico do fármaco, tendo em vista as vantagens que a nanotecnologia apresenta.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas. Tioconazol. Produtos sólidos. Supositórios vaginais. *Spray-drying*.

ABSTRACT

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

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF VAGINAL SUPPOSITORIES CONTAINING POLYMERIC NANOPARTICLES OF TIOCONAZOLE

AUTHOR: Luciana Filippin Cossetin
ADVISER: Cristiane de Bona da Silva
Date and Place of Defense: 14 de agosto de 2015, Santa Maria.

The development of nanostructured materials has provided better control of the release and targeting of active substances to the treatment site, minimizing adverse effects, in addition to contributing to increased therapeutic efficacy. In this sense, these carriers are an alternative for the development of products administered by vaginal route because the pharmaceutical forms commonly used promote inadequate distribution and penetration of drugs, in addition to the reduced time spent on site. Therefore, this study aimed to develop vaginal suppositories containing dried products prepared from polymeric nanoparticle suspensions containing tioconazole, an antifungal used to treat vulvovaginitis. Suspensions of polymeric nanospheres and nanocapsules containing tioconazole (3 mg / ml) were prepared and evaluated for average particle diameter (166-203 nm) polydispersion index (less than 0.20), negative zeta potential (6 - 10 mV), pH (weakly acidic), drug content (value close to the theoretical) and encapsulation efficiency (approximately 100%), which were adequate and stable over the period of 30 days. After the suspensions were subjected to spray drying to obtain the solid intermediates, which were characterized in relation to the weight yield of resuspending in water content profile of particle size distribution, drug content, humidity and morphology. Regarding these characteristics, the results were satisfactory: yield weight, approximately 60%, drug content close to the theoretical value (21 mg / g), resuspending ratio close to unity and maintenance of submicrometric particle size. These characteristics have remained after 30 days of storage at room temperature, only dried products containing the nanospheres. Subsequently, the dried products were incorporated into a gelatin-glycerin base to obtain vaginal suppositories. All formulations had surface characteristics and homogeneous dimensions; drug content close to the theoretical concentration (23 mg / suppository); average weight between 4.51 and 4.57 g; content uniformity and disintegration time less than 60 minutes. Suppositories consisting of the nanospheres enabled greater control of the release of tioconazole compared with suppositories containing the drug not associated. Thus, the formulations proposed in this work may constitute an alternative for the administration by vaginal route tioconazole, better acceptability compared to the existing dosage forms (creams, gels) enabling, by definition, a greater therapeutic effect of the drug in order the advantages that nanotechnology presents.

Keywords: Polymeric nanoparticles. Nanospheres. Dry products. Vaginal suppositories. *Spray-drying*.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Estrutura química do tioconazol. 23

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e estudo de liberação in vitro de formas pulverulentas contendo tioconazol associado à nanopartículas poliméricas

FIGURE 1 – Physicochemical characteristics of TIO-loaded nanocapsules (TIO-NC) and TIO-loaded nanospheres (TIO-NS) during the storage time room temperature. (A) Mean particle size; (B) PDI and (C) zeta potential 35

FIGURE 2 – Particle size distribution (as number of particles) of spray-dried powders containing TIO-NCP (A) and TIO-NSP (B) by laser diffraction, after 1 h of aqueous redispersion 38

FIGURE 3 – Size distribution of polymeric suspensions and spray-dried powders containing TIO: TIO-NS and TIO-NSP (A) and TIO-NC and TIO-NCP (B) by photon correlation spectroscopy. 39

FIGURE 4 – SEM images of spray-dried powders: Lactose - L (A and B); TIO-loaded nanocapsules – TIO-NCP (C and D) and TIO-loaded nanospheres – TIO-NSP (E and F). [A, C and E (1,500x); B, D and F (5,000x)]..... 41

FIGURE 5 – Particle size (A), polydispersity index (PDI) (B) and ressuspension index (Sf/Si) (C) of powders containing TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NSP and TIO-NCP) 42

FIGURE 6 – In vitro release profile of TIO from spray-dried powders (TIO-NSP and TIO-NCP) and ethanol solution (TIO-S) 43

CAPÍTULO 2: Supositórios vaginais de tioconazol: utilização de sistemas pulverulentos contendo nanoesferas como produto intermediário

FIGURA 1 – Conteúdo médio de tioconazol (%) para os supositórios vaginais contendo os pós secos obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO) 63

FIGURA 2 – Resultados obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos supositórios vaginais contendo os pós secos obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO)..... 63

FIGURA 3 – Perfil de liberação in vitro do tioconazol a partir dos supositórios vaginais preparados pela incorporação dos pós obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO) 64

DISCUSSÃO GERAL

FIGURA 1 – Fotografia dos supositórios contendo somente a base (A), lactose (B), mistura física (C) e os pós contendo as nanoesferas de tioconazol (D)..... 75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e estudo de liberação in vitro de formas pulverulentas contendo tioconazol associado à nanopartículas poliméricas

TABLE 1 – Drug content, encapsulation efficiency and pH of TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NS and TIO-NC) and respective blank formulations (mean ± s). 32

TABLE 2 – Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NC and TIO-NS) and respective blank formulations (NC and NS) after preparation (mean ± s) 33

TABLE 3 – Drug content, moisture content and yield of powders containing TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NSP and TIO-NCP) and respective blank formulations (NSP and NCP) after preparation (mean ± s) 36

TABLE 4 – Particle size, polydispersity index (PDI) and ressuspension index (Sf/Si) of powders after redispersion containing tioconazole (TIO-NSP and TIO-NCP) and blank formulations (NSP and NCP) after preparation (mean ± s) ... 38

TABLE 5 – Rate constants (K1 and K2), correlation coefficients (r) and MSC obtained in the mathematical modeling of the TIO release profiles from dry products (TIO-NCP e and TIO-NSP) 44

TABLE 6 – Half-lives (burst and sustained phase) of tioconazole released form polymeric nanoparticle..... 45

CAPÍTULO 2: Supositórios vaginais de tioconazol: utilização de sistemas pulverulentos contendo nanoesferas como produto intermediário

TABELA 1 – Composição quali-quantitativa dos supositórios vaginais 57

TABELA 2 – Dimensões e teor de tioconazol dos supositórios vaginais preparados com os pós secos obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP), com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO), com lactose (SV-L) e supositórios base (SV-B)(média ± s)..... 61

TABELA 3 – Peso médio e tempo de desintegração dos supositórios preparados com os pós secos obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP), com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO), com lactose (SV-L) e supositórios base (SV-B)(média ± s) 62

TABELA 4 – Constantes de velocidade de liberação (K1 e K2), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos na modelagem matemática dos perfis de liberação do tioconazol a partir dos supositórios vaginais contendo os pós obtidos por spray-drying (SV-TIO-NSP) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO)..... 65

TABELA 5 – Tempo de meia-vida (h) das fases burst e sustentada do tioconazol liberado a partir dos supositórios vaginais contendo os pós contendo as nanoestruturas (SV-TIO-NSp) e o fármaco não associado (SV-TIO)..... 65

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 11

1 OBJETIVOS 13
1.1 Objetivo geral 13
1.2 Objetivos específicos 13

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
2.1 Terapia tópica via vaginal 14
2.2 Sistemas nanoestruturados 16
2.3 Técnicas de obtenção de formas farmacêuticas sólidas a partir de sistemas nanoestruturados 19
2.4 Tioconazol 22

3 CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FORMAS PULVERULENTAS CONTENDO TIOCONAZOL ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS 25
3.1 Apresentação 25
Abstract 26
MATERIAL AND METHODS 28
RESULTS AND DISCUSSION 32
CONCLUSION 45
REFERENCES 46

4 CAPÍTULO 2: SUPOSITÓRIOS VAGINAIS DE TIOCONAZOL: UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS PULVERULENTOS CONTENDO NANOESFERAS COMO PRODUTO INTERMEDIÁRIO 51
4.1 Apresentação 51
Resumo 52
1 INTRODUÇÃO 53
2 MATERIAL E MÉTODOS 55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
4 CONCLUSÃO 66
REFERÊNCIAS 67

5 DISCUSSÃO GERAL 71

6 CONCLUSÕES 77

REFERÊNCIAS 78

INTRODUÇÃO

A determinação da forma farmacêutica pode ser fundamental para a eficácia biológica do agente terapêutico tópico administrado na mucosa vaginal, pois a maioria das preparações comerciais possui um curto tempo de retenção, distribuição reduzida da substância ativa no local, são desconfortáveis para aplicar e, muitas vezes, requerem múltiplas administrações diárias (ACARTÜRK, 2009). A maioria dos medicamentos vaginais encontra-se na forma semissólida (géis, cremes e pomadas); no entanto, há um crescente interesse em formas alternativas como o desenvolvimento tecnológico de supositórios capazes de contornar essas dificuldades e fornecer vantagens importantes (GARG et al., 2010; MOHAMED et al., 2012).

Além da facilidade de manuseio e da administração, a melhor estabilidade dos fármacos, a viabilidade de produção em larga escala e o baixo custo são algumas das vantagens que a administração de formas farmacêuticas sólidas oferece em relação às outras formas farmacêuticas (ADAMS; KASHUBA, 2012). Em adição a essas características, a liberação sustentada e controlada a partir de sistemas nanoestruturados pode ser conferida a fim de resolver problemas de dosagem, como picos transientes na concentração do fármaco a partir das formulações semissólidas e concentrações elevadas nos locais próximos a dispositivos intravaginais (WANG; TANG, 2008).

Sistemas transportadores de fármacos, como os nanocarreadores (lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões) têm sido amplamente estudados na área farmacêutica, por conferirem inúmeras vantagens, como a versatilidade de controlar os perfis de liberação de fármacos e, ainda, a capacidade de promover características de superfícies adequadas e ajustáveis (ADIBKIA et al., 2011; CAVALLI et al., 2009). Devido ao seu tamanho reduzido (<1 μm), esses sistemas podem direcionar a substância ativa associada ao sítio específico de ação, aumentando o efeito terapêutico e/ou reduzindo seus efeitos adversos. Além disso, as nanoestruturas podem conferir aumento da estabilidade química dos fármacos associados (SCHAFFAZICK et al., 2003a; OURIQUE et al., 2008; SAVIAN et al., 2015).

Apesar do criterioso estudo de pré-formulação para o desenvolvimento das nanopartículas, estes sistemas apresentam uma limitada estabilidade em meio aquoso, uma vez que, durante o armazenamento, podem ocorrer mudanças nas suas propriedades físico-químicas, como precipitação, degradação de componentes e passagem da substância ativa encapsulada para a fase externa (MAGENHEIM; BENITA, 1991). Desta forma, os processos

de desidratação de sistemas aquosos se apresentam como uma alternativa, pela possibilidade de contornar os obstáculos farmacotécnicos e os relacionados à estabilidade, visando, também, uma melhor e maior aplicabilidade industrial para o desenvolvimento, por exemplo, de formas farmacêuticas sólidas (ABDELWAHED et al., 2006a; GUTERRES; BECK; POHLMANN, 2009).

Dentre as formas sólidas para a administração vaginal, os supositórios vaginais disponíveis comercialmente são constituídos por agentes anti-infecciosos, hormônios, extratos vegetais e esporos do gênero Lactobacillus. Dentre os medicamentos contendo agentes anti-infecciosos na forma de supositórios para administração vaginal incluem clotrimazol, miconazol (UPMALIS et al., 2000), tioconazol, associação de metronidazol e nistatina (SANCHEZ et al., 2004), econazol (LEVY et al., 1992), entre outros.

O tioconazol é um derivado imidazólico que apresenta amplo espectro de atividade antifúngica, sendo indicado no tratamento tópico de infecções fúngicas da pele e unhas, além de candidíase vaginal (FROMTLING, 1988; SWEETMAN, 2006). É administrado na forma de creme, loção, spray ou pó dermatológico (1%), sendo também utilizado em solução tópica a 28%, nos casos de onicomicoses. No Brasil, como medicamento de referência, é comercializado com o nome de Tralen® (Pfizer). No tratamento de vulvovaginites é utilizado em creme ou pomada, na concentração de 6,5%, e em supositórios vaginais (300 mg), com o nome comercial de Gino-Tralen® (Pfizer) (SWEETMAN, 2006).

A necessidade do uso em altas concentrações do tioconazol para obtenção do efeito terapêutico desejado, principalmente nos casos de onicomicoses e vulvovaginites, está intimamente relacionada com o aparecimento de reações adversas, como coceira, irritação local, alergias, eritema, prurido, dor durante o ato sexual e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006). Além disso, outro problema enfrentado na terapêutica é a reduzida absorção cutânea (MUÑOZ et al., 2010) e vaginal (ARTNER; FUCHS, 1983), visto que a eficácia do fármaco depende também da sua biodisponibilidade no local de ação.

Tendo em vista as dificuldades encontradas para a administração tópica do tioconazol, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco em estudo, além da conversão das formulações líquidas nanoestruturadas em pós redispersíveis. Os produtos obtidos apresentaram características satisfatórias e possibilitaram a liberação controlada do fármaco nos estudos *in vitro* realizados, podendo ser empregados na obtenção de novas formas farmacêuticas sólidas, como supositórios vaginais, objetos de estudo deste trabalho, destinadas ao tratamento tópico de infecções fúngicas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolvimento tecnológico de supositórios vaginais obtidos a partir de produtos secos contendo nanopartículas poliméricas com tioconazol.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar tecnologicamente suspensões de nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) de poli(ε-caprolactona) contendo tioconazol, preparadas pelo método de nanoprecipitação, no que se refere ao teor e eficiência de encapsulamento, diâmetro médio de partículas, polidispersão, potencial zeta, pH e análise morfológica;
- Desenvolver produtos secos obtidos a partir de nanopartículas poliméricas contendo tioconazol, empregando a técnica de secagem por aspersão;
- Avaliar as características físico-químicas dos pós (rendimento ponderal, distribuição de tamanho de partículas, teor de tioconazol, diâmetro de partículas e polidispersão após redispersão e morfologia);
- Avaliar os perfis de liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos produtos secos pela técnica de sacos de diálise;
- A partir dos produtos secos nanopartículados, desenvolver supositórios vaginais utilizando o processo de moldagem;
- Avaliar as características físico-químicas da forma farmacêutica no que se refere a: determinação da aparência e dimensões, peso médio, tempo de desintegração, teor e uniformidade de conteúdo;
- Avaliar, *in vitro*, o perfil de liberação dos supositórios vaginais contendo as nanopartículas em comparação com o fármaco não-associado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terapia tópica via vaginal

A administração de fármacos via vaginal pode melhorar o tratamento e a profilaxia de muitas condições que afetam o aparelho reprodutor feminino, tais como doenças sexualmente transmissíveis, infecções fúngicas e bacterianas, além do câncer (GARG et al., 2010). As principais vantagens para esse tipo de via em relação à administração oral convencional incluem a prevenção da irritação no ambiente gastrointestinal e o efeito hepático de primeira passagem, reduzindo efeitos colaterais e possibilitando a administração de doses menores do fármaco para o efeito desejado. Quanto à terapia tópica, a administração local resulta em concentrações mais elevadas no local de ação e, com isso, eficácia potencializada (NEVES et al., 2006; ENSIGN et al., 2014).

Na prática clínica, as formas farmacêuticas mais frequentemente administradas pela via vaginal são os supositórios vaginais, os comprimidos e as preparações semissólidas, como cremes e pomadas. Empregam-se por esta via fármacos adstringentes, anti-infeciosos (antibacterianos, antiprotozoários, antifúngicos, antivirais), queratoplásticos, cicatrizantes, espermicidas, prostaglandinas e hormônios (ACARTÜRK, 2009; GARG et al., 2010; SRIKRISHNA; CARDOSO, 2013). Contudo, as preparações comerciais tradicionais, como cremes, espumas, géis, irrigações e comprimidos, demonstraram ter um curto tempo de retenção, devido ao mecanismo de autodepuração vaginal, o que se associa ao desconforto e à sensação de escorrência, que acaba resultando em uma distribuição não-uniforme do fármaco no local. Além disso, são desconfortáveis de aplicar e muitas vezes requerem múltiplas administrações diárias para que se obtenha o efeito terapêutico desejado (HUSSAIN et al., 2005; ACARTÜRK, 2009). Estas características implicam na diminuição da aceitabilidade da mulher a estas formas farmacêuticas que, por sua vez, conduz a uma menor confiança no próprio tratamento (NEL et al., 2011).

Os supositórios vaginais são as formas farmacêuticas mais comumente utilizadas para a administração de medicamentos para o amadurecimento cervical antes do parto e para a entrega local de fármacos. Alguns exemplos de fármacos empregados na clínica e administrados na forma de supositórios vaginais são: sulfato dehidroepiandrosterona para o

amadurecimento cervical, além de outras classes, como miconazol, tioconazol e clotrimazol para o tratamento de candidíase vaginal, e progesterona para a terapia de reposição hormonal (SRIKRISHNA; CARDOZO, 2013).

Para a preparação de formas farmacêuticas com características adequadas tendo a via vaginal como via de administração, devem ser considerados alguns fatores fisiológicos. Entre eles, a distensão da vagina, que varia entre as mulheres (ALEXANDER et al., 2004). O canal vaginal é revestido pelo epitélio escamoso estratificado contendo numerosas pregas, o que permite maior distensão e área de superfície de absorção. Devido a essas características, a distribuição de um produto vaginal fica comprometida (BARNHART et al., 2004). Além disso, o pH vaginal é variável na presença, por exemplo, de infecções fúngicas ou sêmen, apresentando-se elevado, o que pode afetar a ionização e a absorção de alguns fármacos (VERMANI et al., 2000).

Outro fator que deve ser considerado para a administração de fármacos pela via vaginal é a presença do muco cervical, considerado uma barreira física contra microrganismos patógenos e substâncias externas. No entanto, a produção desse fluido pode ter um impacto significativo sobre a penetração, a distribuição e o tempo de residência do fármaco, pois a quantidade produzida e sua composição podem ser alteradas de acordo com o período menstrual (CONE, 2009; NEVES et al., 2012).

Além disso, a manutenção da microflora vaginal após repetidas aplicações é outro ponto crítico no desenvolvimento dos sistemas de administração. Isso porque, o epitélio vaginal continuamente fornece glicogênio para promover o crescimento da microbiota, resultando na formação de ácido lático, o que diminui o pH vaginal, evitando possíveis infecções. No entanto, com a aplicação de medicamentos vaginais, pode ocorrer o comprometimento da microbiota, contribuindo para um ambiente hostil, adequado para o desenvolvimento de organismos patógenos (NEVES; BAHIA, 2006).

Diante do exposto, promover uma distribuição adequada do fármaco na mucosa vaginal, promover uma fácil penetração e interação da substância ativa com o muco cervical além da manutenção da microbiota são fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de produtos para a administração nesse local (VERMANI et al., 2000). Além disso, atingir concentrações sustentadas na vagina torna-se um desafio, devido à elevada permeabilidade do epitélio vaginal e a expulsão das formas farmacêuticas convencionais do local. (CU et al., 2011; NEVES et al., 2012; ENSIGN et al., 2014).

2.2 Sistemas nanoestruturados

Transportadores de fármacos, tais como, nanocarreadores têm sido muito explorados nas áreas científicas para o desenvolvimento de sistemas eficazes de direcionamento de substâncias, capazes de proporcionar uma melhor distribuição das mesmas no local de ação (MISHRA et al., 2010). O desenvolvimento desses sistemas confere importantes vantagens no âmbito farmacêutico devido à capacidade que as nanoestruturas possuem em controlar a liberação e de direcionar o fármaco ao alvo terapêutico, possibilitando a redução no número de doses, bem como a redução no surgimento de efeitos secundários causados pela distribuição sistêmica inespecífica (TORCHILIN, 2009; SHI et al., 2010; FELICE et al., 2014).

Além disso, esses carreadores, pelo reduzido tamanho de partícula (<1 µm), possuem propriedades adequadas de interação com as barreiras biológicas a partir de parâmetros ajustáveis de superfície e de composição das partículas, a fim de melhorar a absorção, biodisponibilidade e o tempo de permanência do fármaco no local terapêutico (ALEXS et al., 2008; KUMARI et al., 2010). Em adição a essas propriedades, estudos demonstraram outras vantagens a partir da associação do fármaco aos nanocarreadores, como a redução dos efeitos adversos, como por exemplo, efeitos imunossupressores provocados por alguns anti-inflamatórios esteroidais (LIU et al., 2009), aumento da permeabilidade na barreira hematoencefálica e do acúmulo de agentes terapêuticos no cérebro (GAO; JIANG, 2006), proteção do fármaco frente à degradações enzimáticas (BECK et al., 2006; BECK et al., 2007), químicas (WEISS-ANGELI et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; SAVIAN et al., 2015), peroxidação lipídica (SCHAFFAZICK et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2008) e aumento da permeação cutânea (ALVES et al., 2007).

Na área farmacêutica, os principais carreadores nanoestruturados estudados são os lipossomas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas e as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) (MODDARESI et al., 2010).

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas por uma bicamada de fosfolipídios e colesterol, normalmente, que contornam um núcleo aquoso. Essas vesículas possuem tamanho de partícula entre 50 e 700 nm, o qual varia de acordo com a sua estrutura (CHAKRABORTY et al., 2011). O fosfolipídio geralmente utilizado é a fosfotidilcolina, que por ser constituída por estruturas hidrofóbica e hidrofílica, permite suportar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, além da possibilidade de fundir-se com outras bicamadas

fosfolipídicas, por exemplo, a membrana celular, e liberar o seu conteúdo, o que é favorável para a liberação de fármacos na pele (MUDSHINGE et al., 2011).

Outra possibilidade de entrega de fármacos são as nanoemulsões. Esses nanocarreadores são dispersões líquidas, transparentes ou translúcidas, que apresentam tamanho de partícula, em geral, entre 50 e 500 nm (GUGLIELMINI, 2008). Devido ao seu pequeno tamanho, esses sistemas são caracterizados pela estabilidade aumentada em relação à sedimentação, floculação e coalescência devido à estabilização estérica entre as gotículas (ANTON et al., 2008). Quanto a sua preparação, as nanoemulsões podem ser obtidas através de métodos de alta ou baixa energia de emulsificação em que são utilizados tensoativos e, também, co-solventes, quando necessário (SEVCÍKOVÁA et al., 2012). Nesse tipo de carreador, um fármaco lipofílico pode ser adicionado à fase oleosa, enquanto que um hidrofílico pode ser solubilizado na fase aquosa. Esse sistema de entrega é facilmente absorvido pela pele e, de acordo com o fase externa da gotícula, pode ser facilmente incorporado em várias formulações, tais como líquidas, sprays, espumas, cremes, pomadas e géis (CONSTANTINIDES et al., 2008).

As nanopartículas lipídicas sólidas são estruturas de tamanho entre 10 e 200 nm constituídas por um núcleo sólido composto por lipídios sólidos à temperatura ambiente e fisiológica, em que o fármaco pode estar dissolvido ou disperso (MISHRA et al., 2010); carreadores lipídicos nanoestruturados foram desenvolvidos a partir de uma mistura de um lipídio líquido com outro sólido, na qual a substância ativa se encontra dissolvida (MÜLLER et al., 2007).

As nanopartículas poliméricas são dispersões coloidais de partículas sólidas estabilizadas por agentes tensoativos, porém diferem das anteriores pela presença do polímero. Esse sistema de liberação contém partículas de tamanho entre 10 nm e 1000 nm, no qual o fármaco é aprisionado, encapsulado, adsorvido ou ligado à interface da matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003a; BOUCHEMAL; VAUTHIER, 2009). A presença do polímero confere vantagens em relação às outras dispersões coloidais, originando uma morfologia resistente que confere à estrutura maior estabilidade cinética (ANTON et al., 2008). De acordo com a composição e a estrutura, as nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas possuem um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso, onde, geralmente está localizado o fármaco. Com a exceção do núcleo, as nanoesferas possuem uma estrutura matricial em que o composto ativo pode estar firmemente adsorvido na sua superfície ou dissolvido na matriz

polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; BOUCHEMAL; VAUTHIER, 2009; PARVEEN et al., 2012).

Quanto à composição das nanopartículas poliméricas, são utilizadas substâncias biocompatíveis, com mínima citotoxicidade, e biodegradáveis que permitem a liberação prolongada e/ou sustentada do fármaco (PARVEEN et al., 2012). Dentre esses materiais, salientam-se os polímeros biodegradáveis que incluem o ácido poliláctico (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(-ε-caprolactona) (PCL) e poli(metacrilato de metila) que são aprovados pelo FDA (MISHRA et al., 2010). A poli(ε -caprolactona), um polímero semicristalino, é o mais empregado devido as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Dentre os variados métodos de preparação das nanopartículas poliméricas, os mais empregados dividem-se em duas principais classes: a polimerização *in situ* de monômeros dispersos e a precipitação de polímeros pré-formados (MISHRA et al., 2010). As nanoesferas são formadas, principalmente, pela polimerização *in situ* e a precipitação do polímero pré-formado por remoção do solvente (nanoprecipitação). Para a preparação das nanocápsulas, os mais utilizados incluem a polimerização *in situ* e o método de deposição interfacial do polímero pré-formado (ANTON et al., 2008).

A aplicação das nanopartículas poliméricas tem sido amplamente estudada, voltada para a via tópica para a liberação transcutânea de substâncias ativas e melhorar a absorção percutânea (ZHAI; ZHAI, 2014) e/ou promover uma liberação prolongada para uma ação local, evitando possíveis efeitos sistêmicos (FONTANA et al., 2009; MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2010). Para a via oral a administração desses sistemas confere o direcionamento do fármaco a partir da penetração celular e a passagem das barreiras biológicas (VISCIDO et al., 2014), além da proteção do fármaco frente à ação de enzimas digestivas e à diminuição de efeitos adversos, como irritação gástrica (BECK et al., 2006).

No entanto, após a preparação, as nanopartículas poliméricas se encontram sob a forma de suspensão coloidal aquosa e quando armazenadas neste meio, podem apresentar problemas de estabilidade, como mudanças nas propriedades físico-químicas; hidrólise do polímero, levando a perda da substância ativa encapsulada; tendência à agregação das partículas, sedimentação e contaminação microbiana (MAGENHEIM; BENITA, 1991; SCHAFFAZICK et al., 2003b).

2.3 Técnicas de obtenção de formas farmacêuticas sólidas a partir de sistemas nanoestruturados

A transformação de sistemas coloidais submicrométricos em formas sólidas tem sido amplamente estudada como uma alternativa para melhorar a estabilidade desses sistemas (PATRAVALE et al., 2004). Além disso, os produtos sólidos conferem melhor aplicabilidade industrial pela capacidade de sua transformação em formas farmacêuticas sólidas mais convenientes, como comprimidos, cápsulas e supositórios, pois estes possibilitam a redução do volume administrado (ausência de água na formulação), produção em grande escala, maior precisão de dosagem, facilidade de armazenagem e de transferência, além da melhor adesão do paciente (EERDENBRUG et al., 2008; DOLENC et al., 2009).

Os métodos de secagem mais utilizados na conversão das formulações líquidas em sólidas consistem na remoção da água da nanosuspensão por sublimação e dessorção sob vácuo ou evaporação sob baixa temperatura. Dentre estes métodos, os mais empregados são a liofilização (DE CHASTEIGNER et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003) e a secagem por aspersão (MULLER et al., 2000; POHLMANN et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2006; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2006).

A liofilização ou *freeze-drying* é uma técnica de desidratação que envolve a dissecação de uma amostra previamente congelada através da cristalização do gelo, seguida pela sublimação e dessorção do vapor da água a pressão reduzida, resultando em produtos sólidos com estrutura porosa adequada para a redispersibilidade (CRAIG et al., 1999; YUE et al., 2013). Essa técnica é amplamente empregada para o processamento de produtos farmacêuticos de origem biológica, tais como soro e vacinas, fármacos peptídicos, além de serem amplamente utilizados na secagem de sistemas coloidais (DE CHASTEIGNER et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003b; KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). No entanto, durante a criodessecagem, tensões são geradas nas etapas de congelamento e de desidratação, podendo interferir na integridade das partículas e, conseqüentemente, na estabilidade física e química dos sólidos (CHACON et al., 1999; ABDELWAHED et al., 2006a, KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007). Por isso, faz-se necessário a utilização de crioprotetores adequados na formulação a fim de proteger os sólidos liofilizados das tensões do congelamento e da secagem, além de se obter um aumento da estabilidade durante o tempo de armazenamento. Entre os crioprotetores mais comumente utilizados estão os carboidratos, sendo os mono e dissacarídeos os mais efetivos quanto à prevalência das características iniciais da formulação,

principalmente em relação à manutenção do tamanho de partícula da suspensão original (EERDENBRUGH et al., 2008; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Abdelwahed e colaboradores (2006a) verificaram que a padronização das condições de desidratação por liofilização e a utilização do crioprotetor adequado foi fundamental para a estabilidade de nanocápsulas de PCL. Nesse estudo, foram avaliados diferentes lioprotetores nas distintas etapas do processo, sendo que os liofilizados contendo polivinilpirrolidona promoveram boa estabilidade aos carreadores quando submetidos a altas temperaturas e umidade relativa após seis meses de armazenamento.

Em outro estudo, De Chasteigner e colaboladores (1995) avaliaram a liofilização como uma etapa intermediária para a produção de uma forma farmacêutica sólida contendo nanocápsulas de PLA com indometacina. Nesse processo, foi utilizada a glicose (10%) ou a sacarose como crioprotetor, porém, verificou-se que após a redispersão houve um aumento de duas vezes no tamanho da partícula. Segundo os autores, esses resultados são atribuídos a mudanças na estrutura da parede da cápsula ou ao agrupamento das mesmas durante o processo.

Apesar dessa possibilidade de mudança na parede polimérica das nanocápsulas após a liofilização utilizando um crioprotetor, Schaffazick e colaboradores (2003) relataram a adequada liofilização das nanocápsulas preparadas com PCL ou Eudragit® S90, contendo diclofenaco, empregando dióxido de silício coloidal como adjuvante. De acordo com os resultados, os liofilizados obtidos apresentaram teor de fármaco próximo a 100%. A partir disso, para que o processo de liofilização seja bem sucedido, é necessário que a seleção de crioprotetores ou adjuvantes de secagem seja adequada, a fim de proteger as partículas contra os estresses do congelamento e da desidratação. Além disso, o processo é lento e requer instalações complexas, que são de alto custo, dificultando a transposição para a escala industrial (ABDELWAHED et al., 2006b).

A técnica de secagem por aspersão ou *spray-drying* permite a produção de partículas sólidas a partir da atomização de suspensões ou soluções em gotículas finas, seguida pelo processo de secagem, resultando em produtos sólidos pulverulentos (ALVES et al., 2004). Esta técnica apresenta como vantagens o baixo custo, o rápido processo, a possibilidade de modular as características físico-químicas do pó (BECK et al., 2006), fácil transposição de escala, além de ser adequada para moléculas termossensíveis (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Além disso, esse método é amplamente empregado para o encapsulamento de substâncias bioativas, tais como enzimas, aromatizantes e medicamentos peptídicos, bem como na secagem de dispersões coloidais, como nanopartículas poliméricas, lipossomas e

nanoemulsões (ALVES et al., 2004; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; OURIQUE et al., 2014).

No geral, a secagem por aspersão consiste em quatro etapas fundamentais: (1) pulverização da amostra líquida que envolve a atomização da mesma para a formação de gotículas finas, (2) contato do pulverizado com o ar quente, (3) secagem pela evaporação da umidade e (4) separação das partículas secas pelo ar (POHLMANN et al., 2002; TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007). No entanto, para se obter características adequadas dos pós, os parâmetros de funcionamento do processo, como a temperatura de secagem e a velocidade de pulverização devem ser estabelecidos. Além disso, adjuvantes de secagem são utilizados a fim de proteger a integridade das partículas durante o processo e evitam a adesão das mesmas nas paredes do equipamento. Estes podem ser materiais poliméricos sintéticos (polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de silício coloidal) ou carboidratos (lactose, manitol, maltodextrinas), os quais são adicionados às amostras líquidas (TEWA-TAGNE; BRIAÇON; FESSI, 2007; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; GUTERRES et al., 2009).

Em um estudo, Freag e colaboradores (2013) obtiveram produtos sólidos a partir de nanossuspensões de diosmina e avaliaram o processo de secagem por atomização quanto ao tamanho das partículas reconstituídas utilizando manitol (57 %) como adjuvante de secagem e a incorporação do manitol. Nesse estudo, a técnica conservou o tamanho nanométrico e a eficiência de encapsulamento foi de 99,99%. Os estudos de dissolução demonstraram a capacidade dos produtos secos em aumentar a taxa de dissolução do fármaco em comparação com a sua forma livre. Além disso, a permeação intestinal da diosmina *ex vivo* melhorou significativamente.

Schaffazick e colaboradores (2006) desenvolveram micropartículas contendo sistemas nanoestruturados com melatonina, utilizando a secagem por aspersão e dióxido de silício coloidal (3%) como adjuvante de secagem, com o propósito de promover uma liberação sustentada. Os resultados demonstraram que o rendimento do processo foi de, aproximadamente, 74% e a eficiência de encapsulamento da melatonina no pó foi de, aproximadamente, 93%. A partir da microscopia eletrônica de varredura foi detectada a presença de nanopartículas na superfície dos pós secos e obteve-se um perfil de liberação controlado (monoexponecial) em comparação ao fármaco não associado. Além disso, os pós secos por aspersão apresentaram uma estabilidade três vezes maior (um ano) se comparada às suspensões de nanocápsulas (três meses).

Em outro estudo, Ribeiro (2013) desenvolveu produtos secos a partir de suspensões de nanoemulsões e de nanocápsulas de PCL ou Eudragit® RS100 utilizando como métodos de desidratação a liofilização e a secagem por aspersão. Nesse trabalho o fármaco em estudo era o tioconazol e utilizou-se como adjuvante de secagem a lactose (10 %) ou a trealose (10 %), no qual foi avaliada a liberação *in vitro* do fármaco pela técnica de sacos de diálise. Os resultados demonstraram que os produtos secos preparados a partir de nanocápsulas foram capazes de promover o controle de liberação do fármaco, destacando-se os produtos secos obtidos a partir de nanocápsulas de PCL por *spray drying* que apresentaram maior controle na liberação do tioconazol após 48 horas de experimento. Além disso, foi avaliado frente ao processo de secagem por aspersão de nanocápsulas poliméricas de Eudragit® RS100 contendo tioconazol, a utilização de dois adjuvantes de secagem, a lactose e a trealose a fim de compará-los. Ambos os produtos apresentaram adequada redispersibilidade em água e atividade antifúngica após o processo de secagem; entretanto, a utilização de trealose possibilitou obter pós com características mais semelhantes às suspensões originais, além de manter o teor de fármaco durante o armazenamento.

2.4 Tioconazol

O tioconazol (figura 1) é um agente antifúngico imidazólico que apresenta atividade inibitória *in vitro* contra vários microrganismos patógenos, incluindo *Candida* spp., *Torolopsis glabrata*, *Criptococus neoparmans*, *Aspergillus* spp., fungos dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microscoporum* spp.), assim como, bactérias gram-positivas (*Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium minutissimun* e *Staphylococcus epidermidis*), gram-negativas (*Staphylococcus* spp., *Streptococci-enterococci*), tricomonas e clamídias (JONES et al., 1993; MUNOZ et al., 2010; MUNOZ et al., 2013).

O seu mecanismo de ação consiste no efeito fungicida ao inibir a via biossintética do ergosterol presente na membrana celular fúngica, e no efeito fungistático, ao alterar a fluidez e a permeabilidade da mesma, sendo que o efeito fungicida é dependente de sua concentração no meio (MARTENS, 2004). Em virtude disso e do seu amplo espectro de ação, esse fármaco é indicado para o tratamento de micoses superficiais da pele, unhas e infecções fúngicas vaginais (ZHANG, 2007; COLEMAN et al., 2014).

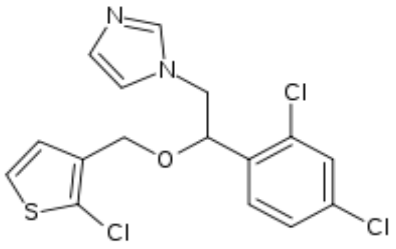

Figura 1 – Estrutura química do tioconazol

Para o tratamento das dermatofitoses e outras micoses superficiais, o tioconazol é administrado topicamente na forma de creme, loção, spray ou pó dermatológico, sendo utilizado, também, em soluções tópicas nos casos de onicomicose (DIAS et al., 2013). Na terapia da vulvovaginite, o fármaco é administrado em creme ou pomada, na concentração de 6,5%, e em óvulos de 300 mg (SWEETMAN, 2006; RAMIRES-SANTOS et al., 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que o tioconazol apresenta atividade fúngica superior a outros antifúngicos imidazólicos, como por exemplo, o miconazol contra *Candida* spp., *Torulopsis glabrata, Cryptococcus neoformans* e fungos dermatófitos. Sua ação antifúngica foi, também, superior ao inibir o crescimento de *C. albicans* em camundongos, cães *bigles* e ratos (JOVENS, 1987).

Em relação à sua atividade antifúngica para o tratamento de onicomicoses, Hay e colaboradores (1985) estudaram a eficácia do tioconazol a partir de aplicações de uma solução tópica (28%) em 27 pacientes com essa doença, sendo que, mais de 11 desses, obtiveram melhoras significativas. Em outro estudo, foi avaliado, *in vitro,* o tempo necessário para atingir o efeito fungicida utilizando uma solução de tioconazol 28% frente aos microrganismos *T. rubrum* e *C. albicans.* Os resultados demonstraram um efeito antifúngico rápido (cinco minutos) do fármaco diferentemente dos casos clínicos de onicomicoses que, segundo os autores, a exposição do tioconazol às células fúngicas é inadequada devido as suas baixas taxas de penetração no tecido ungueal (CRYER; ROBINSON, 1997).

Para o tratamento da candidíase vulvovaginal, a eficácia do tioconazol foi avaliada por Stein e colaboradores (1986). Nesse estudo, a administração única desse fármaco (pomada 6,5%) em pacientes com vulvovaginites foi eficaz igualmente quando comparado ao tratamento de três dias utilizando-se o clotrimazol (comprimidos vaginais) como fármaco antifúngico.

Em outro estudo, Houang e Lawerence (1985) avaliaram a absorção sistêmica e a sua permanência na cavidade vaginal após a administração de óvulo vaginal em dose única em 10

pacientes com candidiase vaginal. Após 8 h, a concentração plasmática média foi de 21,2 ng/mL e não detectável após 24 h. A concentração vaginal, após 24 h, foi de 21,4 mg/L e permaneceu detectável após 72 h.

A partir de relatos da literatura, é possível verificar que altas concentrações do fármaco são necessárias para atingir o efeito terapêutico desejado. Este fato se deve a sua baixa absorção por via cutânea (FROMTLING, 1988). No entanto, o uso de altas concentrações tem provocado o surgimento de sintomas indesejáveis, como alergias de contato (STUBB et al., 1992; HEIKKILA; STUBB; REITAMO, 1996). No caso específico de vulvovaginites, a irritação na mucosa vaginal tem sido um sintoma evidente em pacientes que utilizam o tioconazol na terapia dessa doença (ABDELMONEM et al., 2012).

Cabe salientar que estudos voltados ao desenvolvimento de novas formulações a fim de contornar os efeitos colaterais provocados pelo tioconazol têm sido pouco relatados na literatura. Attama e colaboradores desenvolveram microemulsões contendo tioconazol para administração oral. Os resultados obtidos demonstraram que a administração oral da microemulsão aumentou a atividade antifúngica *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* do fármaco (ATTAMA et al., 2011). Mais recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foram desenvolvidas nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo o tioconazol (1,0 mg/mL), as quais foram incorporadas em formulações semissólidas e, também, se avaliou a conversão dessas formulações líquidas nanoestruturadas em pós redispersíveis. As suspensões, as preparações semissólidas e os pós obtidos possibilitaram uma liberação do fármaco prolongada, e apresentaram, também, atividade antifúngica contra *C. albicans* (HÄRTER, 2013; RIBEIRO, 2013).

3 CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FORMAS PULVERULENTAS CONTENDO TIOCONAZOL ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

3.1 Apresentação

A secagem por aspersão, além de ser utilizada para a produção de pós a partir de formulações líquidas pela indústria farmacêutica, é uma técnica que tem sido amplamente empregada como um método para a desidratação de nanopartículas, visando, muitas vezes, o aumento de estabilidade de sistemas coloidais submicrométricos (GUTERRES et al., 2009). Entre estes sistemas, as suspensões de nanocápsulas e nanoesferas foram convertidas em pó, pela primeira vez em 2000, por Muller e colaboradores que utilizaram a técnica de *spray-drying* como método de secagem.

Os produtos sólidos obtidos pela técnica de secagem por aspersão a partir de suspensões coloidais são caracterizados como microaglomerados, constituídos por um adjuvante de secagem e pelas nanopartículas, as quais podem estar recobrindo a superfície dos pós (MULLER et al., 2000; BECK et al., 2004; BECK et al., 2006) ou ainda, no interior deste sistema sólido (TEWA-TAGNE et al., 2006). Esses sistemas sólidos, além de serem considerados como alternativa para melhorar a estabilidade de suspensões de nanopartículas, têm sido também estudados como produtos intermediários para o desenvolvimento de formas de dosagens finais semissólidas (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2013) e sólidas para administração via oral (BECK et al., 2008; FRIEDRICH et al., 2010).

Apesar da secagem por aspersão ser um método simples, de baixo custo e de fácil execução, só é considerado adequado se mantiver as características das nanopartículas após o processo de secagem. Essa característica foi reportada pelo nosso grupo de pesquisa após o desenvolvimento de pós redispersíveis obtidos pela técnica de secagem por aspersão contendo tioconazol associada às nanocápsulas, um antifúngico imidazólico utilizado no tratamento de micoses superficiais e vulvovaginites (RIBEIRO, 2013). Os resultados obtidos foram promissores e conduziram ao desenvolvimento de novos carreadores poliméricos com uma maior concentração de fármaco e a comparação de dois tipos de estrutura: nanocápsulas e nanoesferas. Diante disso, o presente capítulo descreve a obtenção e a caracterização de sistemas sólidos compostos de lactose e tioconazol associado à nanocápsulas ou nanoesferas, através do método de secagem por aspersão.

PUBLICAÇÃO 1: Development and *in vitro* release study of powders containing tioconazole-loaded polymeric nanoparticles

Artigo a ser submetido

Development and *in vitro* release study of powders containing tioconazole-loaded polymeric nanoparticles

Abstract

The industrial development of polymeric nanoparticle suspensions, such as drug delivery systems, is limited due to the problems in maintaining stability. In this research, the spray-drying technique was applied to dry nanocapsule and nanosphere suspensions, which were prepared with the use of lactose as adjuvant and tioconazole, an antifungal. The polymeric suspensions were prepared with the polymer (PCL) and tioconazole (3.0 mg/ml), and, afterwards, they were evaluated in relation to mean size particles, drug content, pH and encapsulation efficiency. After preparation, the samples presented suitable physicochemical characteristics: mean size particles in the nanometer range (166-203 nm), polydispersity index below 0.20, drug content near to the theoretical value and encapsulation efficiency of approximately 100%. Furthermore, the formulations have been stable for 30 days. After, the liquid formulations were subjected to spray-drying technique by using lactose 10% (w/v) as adjuvant. The powders were characterized in relation to yield, index resuspension in water, drug content, moisture and morphology. The dried products showed satisfactory physicochemical characteristics: yield 59-65%, drug content near to the theoretical (21.99 and 23.36 mg/g for samples obtained from nanocapsules and nanospheres, respectively), percentage of moisture of less than 1%, adequate index resuspension (1.0 ± 0.16 and 1.3 ± 0.19 for samples obtained from nanocapsules and nanospheres, respectively) and mean particle size similar to the original suspensions, after filtration. In morphological analysis, the presence of spherical particles was observed. In tioconazole *in vitro* release study, the dried products containing the nanoparticles were able to promote the control release of the drug.

Uniterms: Lactose. Nanoespheres. Nanocapsules. Spray-drying. Tioconazole.

INTRODUCTION

Tioconazole (TIO) is an antifungal imidazole agent and it presents inhibitory activity against various pathogenic microorganisms (*Candida* spp., *Toropis glabrata*, *Criptococus neoparmans*, *Aspergillus* spp., dermatophites, thricomonas, chlamydias, bacteria gran-negative and gran-positive) (Jones *et al*., 1993; Muñoz *et al*., 2010; Muñoz *et al*., 2013). The mechanism of action of this drug is based on the fungicidal effect by inhibiting the biosynthetic via of the ergosterol present in the fungal cell membrane and on the fungistatic effect to change its fluidity and permeability (Maertens, 2004). This drug is indicated for the treatment of superficial mycoses of the skin, nails and vaginal fungal infections (Zhang, Camp, Elewski, 2007; Coleman, Fleckman, Huang 2014).

In the topical treatment of dermatophytoses and other superficial mycoses, the tioconazole is used topically in pharmaceutical dosage forms, such as cream, lotion, spray or powder and it is also administered as topical solution in the therapeutic of onychomycoses (Hay, Mackie, Clayton, 1985). In the therapy of vulvovaginitis, this drug is administered in cream and ointment in the concentration of 6.5%, and ovules of 300 mg (Jones *et al*., 1993; Sweetman, 2006). It has antifungal activity against *Candida* spp. equal or superior to comparison with other drugs, such as clotrimazole, econazole and miconazole (Upmalis *et al*., 2000). However, after administration, a few serious adverse events were reported, as burning, sting and itching sensations (Fromtling, 1988; Stubb *et al*., 1992). Besides, another problem is its reduced cutaneous and vaginal absorption (Artner, Fuchs, 1983).

In order to minimize the adverse effects events and to modulate the cutaneous delivery of drugs from pharmaceutics formulations, drug carrier systems have been developed, because of their capacity of increasing drug efficacy, by reducing toxicity, as well as by controlling drug release (Bamrungsap *et al*., 2012). Among different systems, nanocarriers are widely studied in pharmaceutics area and they consist of sub-micron size, which allow suitable properties of interaction with biological barriers from adjustable parameters and surface composition of the particles in order to improve the absorption and bioavailability of the drug residence time in the therapeutic site (Kumari, Yadav, Yadav, 2010; Moddaresi *et al.*, 2010).

Polymeric nanoparticles are colloidal aqueous suspensions. According to their composition and structure, they can be divided into nanocapsules and nanospheres. The nanocapsules have a polymeric shell disposed around an oily or aqueous core, where the drug is usually located. With the exception of the core, the nanospheres have an array structure in which the active compound can be firmly adsorbed on the surface or dissolved in the polymer

matrix. However, these aqueous systems are more susceptible to physical, chemical and microbiological instability (Guterres, Beck, Pohlmann, 2009).

Spray-drying is a common technique for the elimination of water in liquid formulations, including colloidal suspensions in order to obtain solid products. In 2000, Muller and collaborators reported, for the first time, the use of spray-drying in dehydration of polymeric nanocapsules, with adequate yields (Müller *et al.,* 2000). Furthermore, they described the use of this technique for obtaining similar powders with the use of nanocapsules and nanospheres as coating material for microparticles (Beck, Pohlmann, Guterres, 2004; Beck *et al.,* 2005). The nanoparticles-coating act as a surface of control which could allow the modulation of the drug release profile, as previously reported by Domingues and co-workers (2008) (Domingues, *et al*., 2008).

Recently, in our research group, dry products containing TIO-loaded nanoemulsions and nanocapsules (1mg/mL) were developed with the use of different dehydration techniques: spray-drying or freeze-drying (Ribeiro, 2013). In this study, the dried products containing PCL-nanocapsules and prepared by spray-drying were able to promote better the control release of the tioconazole. Lactose and trehalose were used as adjuvant, and differences between these substances in relation to physicochemical characteristics of the powders were not obtained (Ribeiro, 2012).

Based on these results, in this research, we proposed to increase the content of TIO in the nanocapsules, as well as evaluating the possibility of obtaining a new dried powder with nanospheres, prepared by spray-drying technique. The new nanocarriers and dried products were evaluated in relation to physicochemical characteristics and also in vitro drug release.

MATERIAL AND METHODS

Material

TIO was obtained commercially from Pharma Nostra (São Paulo, Brazil). Poly-(**ε-**caprolactone) (PCL, Mn = 70,000 – 90,000) and sorbitan monooleate (Span® 80) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Poly-sorbate 80 (Tween® 80) and acetone were supplied from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil); caprylic/ capric triglyceride mixture and monohydrate lactose were purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Dialysis bag (MWCO = 14 KDa, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) was purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Methanol HPLC grade was acquired from Tedia (São Paulo, Brazil). All chemicals and solvents presented pharmaceutical or HPLC grade.

Preparation and characterization of polymeric nanoparticles

TIO-loaded nanocapsules (TIO-NC) were prepared (n=3) by the interfacial deposition of the preformed polymer method (Fessi, Puisieux, Devissaguet, 1988). An organic phase containing 500 mg of polymer (PCL), 150 mg of TIO, 400 mg of capric/caprylic triglicerides mixture, and 385 mg of sorbitan monooleate were dissolved in 134 mL of acetone at temperature of 40 °C, for 60 minutes. This organic solution was added into 270 mL of an aqueous phase containing 385 mg of polysorbate 80, under moderate magnetic stirring. After 10 min, the solvents were eliminated and the suspension was concentrated by evaporation at 40 °C under reduced pressure (50 mL), obtaining a TIO concentration of 3 mg/mL. In addition, TIO-loaded nanospheres (TIO-NS) were prepared by nanoprecipitation method (Fessi, Puisieux, Devissaguet, 1988), omitting the presence of the oil. For comparison, nanocapsules (NC) and nanospheres (NS) without the drug (blank formulations) were also prepared as described above. All formulations were stared at room temperature and protected from light.

The formulations were characterized in terms of drug content and association, pH, zeta potential, particle size and polydispersity index. These physicochemical characteristics were evaluated after preparation, and after 30 days of storage at room temperature.

The total drug content was determined by liquid chromatography (LC), according to validated method (Härter *et al*., 2014). For extraction of the drug, an aliquot of the suspensions (200 µL) was diluted in methanol (20 mL) and submitted at sonication (40 min) and filtration though a membrane (Nylon, 0.45 µm, Allcrom®). The TIO non-encapsulated (free drug) was determined by the ultrafiltration/centrifugation technique (Amicon® 10.000 MW, Millipore), at 2200 xg, during 10 minutes. The concentration of drug entrapped in the nanocapsule and nanosphere was calculated by the difference between the total and the free drug concentrations and the encapsulation efficiency was determined by the quotient of the entrapped and the total drug content (Härter *et al*., 2014).

The pH was measured directly in the suspensions by a calibrated potentiometer (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil).

Analysis particle size and polydispersity indices were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) after adequate dilution (1:500) of an aliquot of the formulations in ultra-pure water (Zetasizer® Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The zeta potential was measured by electrophoretic mobility after dilution of the samples in 10 mM NaCl solution (1:500), with the use of the same equipment.

Preparation of spray-dried powders

The TIO-loaded nanocapsules suspensions (n=3) were mixed with lactose (10% w/v) under magnetic stirring, during 20 minutes. After, the samples were fed into a spray dryer (Spray-dryer MSD 1.0, Labmaq, Ribeirão Preto, Brazil) and, after, they were submitted to the following drying conditions (Ribeiro, 2013): inlet temperature at the drying chamber was set maintained at 120 ± 2°C; two-fluid nozzle with cap orifice diameter of 0.7 mm and feeding rate was set to 0.22 L/h. Dried powders were also prepared using TIO-loaded nanospheres to evaluate the influence of the presence of the oil on their physicochemical characteristics. The samples obtained from nanocapsules and nanospheres were named TIO-NC_P and TIO-NS_P, respectively. Samples without the drug too were prepared and were named NC_P and NS_P.

Characterization of spray-dried powders

The spray-dried powders were evaluated in relation to: yield weight, drug content, distribution of the particles size, mean particles size after redispersing in water, morphological analyses and residual moisture content.

Yield of the spray-drying process was calculated by the ratio between the weight obtained experimentally and the sum of the weights of all components (lactose and nanostructures) discounting the content of water of the suspensions.

TIO content of spray-dried powders was determined by HPLC, according the conditions described above. The samples were diluted in methanol, and kept under stirring during 15 minutes. After, were filtered using a membrane (Nylon, 0.45 µm, Allcrom®), and injected into the chromatograph.

Laser diffraction (Mastersizer® 3000, Marvern Instruments, UK) was used for the evaluation of the distribution of particle size. The powders were dispersed in water and analyzed after 1 h of stirring.

The powders were dispersed in ultra-pure water to obtain a TIO concentration of 3 mg/mL (similar to the original suspensions). The samples were stirred for 5 minutes and after, 20 µL of this redispersion were diluted 500 times in ultra-pure water, filtered through a membrane (Nylon, 0.45 µm, Allcrom®) and the particle size was measured by photon correlation spectroscopy (Zetasizer® Nanoseries, Malvern Instruments, UK). The resuspension index (Sf/Si) was determined by the relation between the average particle size of the powder after redispersion in water (Sf) and the average size of the suspensions (Si).

The morphological analysis was carried out by using scanning electron microscopy (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan) at different magnifications, after plating the samples with gold.

The residual moisture content of the powders was measured by Karl Fischer titration in dry methanol using a DL38 titrator (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). Measurements were conducted in triplicate.

***In vitro* release study of powders**

In vitro release studies of the redispersed spray-dried powders containing TIO-loaded nanocapsules and nanospheres were evaluated (n=3) by the dialysis bag method, by using ethanol:water (30:70, v/v) as a release medium, according to the sink condition, at 37 °C (Ribeiro, 2013). For the study, the powders were weighed and redispersed in ultra-pure water to obtain a concentration of 3 mg/mL of TIO. The dialysis bag containing 1 mL of this dispersion was placed in a beaker containing the medium under stirring. In determined times, 1 mL of the medium was collected and replaced by an equal volume of fresh medium. For comparison, an ethanol solution containing TIO not associate (TIO-S – 3 mg/mL) was also prepared and evaluated. The content of TIO release at different times was determined by HPLC, according to a previously validated method (Ribeiro, 2012)

For determining the *in vitro* release profile of the samples (TIO-S, TIO-NC_P and TIO-NS_P), some mathematical models were used: zero-order (Eq. (1)) and first order of monoexponencial (Eq. (2)) or biexponencial (Eq. (3)) types, considering the best correlation between the experimental points and theoretical profiles and the highest value of model selection criteria (MSC) (MicroMath® Scientist® for Windows™).

$$C = 100 - [C_0 - kt] \quad (1)$$

$$C = 100 - [C_0 e^{-kt}] \quad (2)$$

$$C = 100 - [Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}] \quad (3)$$

Where: C is the percentage of the TIO released at time t (h), C_O is total concentration and k, α and β (h^{-1}) are rate constants.

In addition, Korsmeyer-Peppas model was used to determine the mechanism of release of the TIO from the nanoparticles applying the power law (Eq. (4)).

$$ft = at^n \quad (4)$$

Where *n* characterizes different release mechanisms ($n = 0.43$ for diffusion of the drugs; $n = 0.85$ for polymer degradation; $0.43<n<0.85$ for anomalous transport).

Statistical Analysis

All formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean ± s (standard deviation). One-way and two-way analyses of variance (ANOVA) were used for comparison of the experimental data. Post-hoc multiple comparisons were carried out by Tukey's test for significance at *p*-values < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of nanoparticles

TIO -loaded polymeric suspensions (TIO-NC and TIO-NS) containing 3 mg/mL and respective formulations without the drug (blank formulations) were prepared by precipitation method with the use of a semi-crystalline and biodegradable polymer (PCL), which is widely used due to its biocompatibility (Guterres, Alves, Pohlmann, 2007). Both suspensions presented macroscopic homogeneous aspect like a milky white bluish opalescent fluid (Tyndall effect). Their physicochemical characteristics after preparation are presented in Tables 1 and 2.

TABLE 1 – Drug content, encapsulation efficiency and pH of TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NS and TIO-NC) and respective blank formulations (mean ± s)

Formulation	Tioconazole content (%)	Encapsulation efficiency (%)	pH
TIO-NS	100.84 ± 0.91[a]	99.69 ± 0.11[a]	6.10 ± 0.06[a]
NS	-	-	5.35 ± 0.07[b]
TIO-NC	100.20 ± 1.08[a]	97.38 ± 0.95[a]	6.17 ± 0.14[a]
NC	-	-	5.47 ± 0.34[b]

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, p <0.05).

The content of TIO in all formulations was close to their theoretical value (3.00 ± 0.06 mg/mL and 3.02 ± 0.02 mg/mL to TIO-NC and TIO-NS, respectively). Besides, the encapsulation efficiency suspensions were similar and higher than 97%. This result indicates that the polymer present in organic phase was responsible for the drug entrapment efficiency

once it increased the diffusion resistance to drug molecules to aqueous phase (Das *et al*., 2010). In relation to particle size, all formulations presented nanometric size (166 – 203 nm) and the type of nanoparticle influenced in mean size (NC>NS; $p<0.05$). That might be explained by the presence of the oil and the viscosity organic phase, which influenced on the droplet formation (Schaffazick *et al.*, 2003). These results are in agreement with a previous report for Fontana and collaborators (Fontana *et al.*, 2009) that evaluated the influence of the type of nanostructured system loaded with clobetasol proprionate for mean particle size. In addition, the formulations containing TIO-NC, developed by the present work, presented mean particle size similar in comparison with nanocapsules containing the same drug developed by Ribeiro (2013). That may be explained by the reduction of concentration of the oil and the increase of concentration of drug in TIO-NC formulation. There was a significant difference ($p < 0.05$) between diameters of both empty and charged nanocapsules.

TABLE 2 – Particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NC and TIO-NS) and respective blank formulations (NC and NS) after preparation (mean ± s)

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
TIO-NS	179 ± 10^{a}	0.16 ± 0.05^{a}	-5.53 ± 1.93^{a}
NS	167 ± 6^{a}	0.17 ± 0.03^{a}	-10.21 ± 0.54^{b}
TIO-NC	204 ± 4^{b}	0.16 ± 0.05^{a}	-5.48 ± 1.66^{a}
NC	179 ± 2^{a}	0.10 ± 0.01^{b}	-7.04 ± 1.20^{a}

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p< 0.05$).

As it can be observed above, the PDI values were below 0.20 (0.10 – 0.17), which indicates a suitable size uniformity of the systems, the zeta potential was negative for suspensions, being it attributed because of the presence of the polymer, since PCL has terminal carboxylic acid groups present in its structure. They are a consequence of the negative surface density of charge due to the presence of oxygen atoms in the molecules. Comparing the results from the TIO-loaded nanocapsules and nanospheres, it was noticed that it did not influence in zeta potential and polydispersity index ($p>0.05$). The similar zeta potential result is a consequence of the particle/emulsion coating with polysorbate 80. These results are in agreement with other reports in literature (Fontana *et al.*, 2009).

The formulations were stored at room temperature and protected from light for 30 days in order to evaluate their stability. Regarding the macroscopic aspect, the samples kept their initial characteristics. The results of mean particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of the suspensions are showed in figure 1**.** The mean particle size in the formulations ranged from 161 nm to 197 nm under storage. In relation to PDI, the values were similar to the ones obtained after the preparation (below 0.20) for all polymeric suspensions. Regarding zeta potential nanoparticles maintained negative values and the reduction of this value in module was not significant ($p>0.05$). Besides, the drug content of the formulations did not present any significant alteration during the storage time when compared to the values determined after the preparation (2.98 ± 0.2 mg/mL and 2.96 ± 0.02 mg/mL to TIO-NS and TIO-NC, respectively).

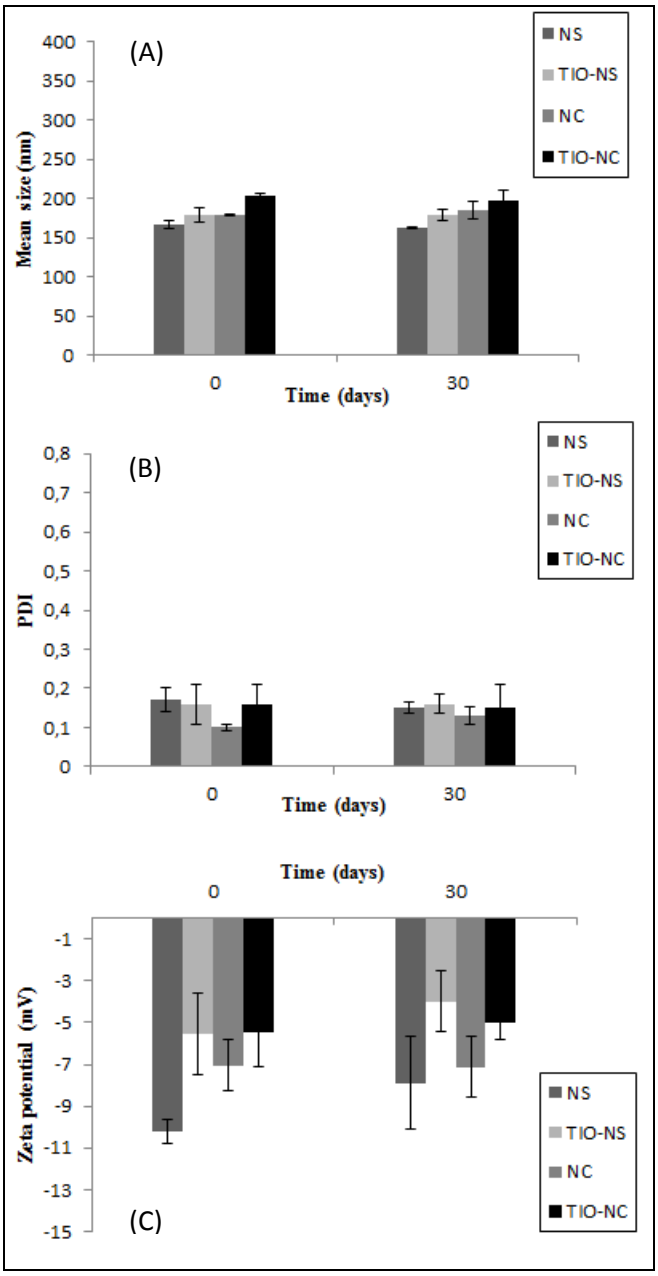

FIGURE 1 – Physicochemical characteristics of TIO-loaded nanocapsules (TIO-NC) and TIO-loaded nanospheres (TIO-NS) during the storage time room temperature. (A) Mean particle size; (B) PDI and (C) zeta potential.

According to the results, the samples are stable in period of 30 days once the polymeric suspensions presented good stability for parameters of mean particle size, polydispersity, drug content and also zeta potential. On the other hand, the increase of concentration of TIO (3 mg/mL) e reduction/or absence of the oil (TCM) for TIO-NC and TIO-NS, respectively, did not influence the stability of these formulations when compared to the formulations containing polymeric nanocapsules associated with TIO (1 mg/mL) and

evaluated for same time period (Ribeiro, 2013). These results might be attributed to the affinity of the drug for the polymeric materials (Schaffazick *et al*., 2006).

Considering these results, it is possible to observe the importance of the presence of the polymer regarding the maintenance of the stability of the colloidal suspensions preventing the agglomeration/coalescence of vesicles. They are in agreement with a previous report for nanocapsules and nanospheres of PCL in comparison with nanoemulsions, which did not present polymer in their structure (Fontana *et al.*, 2009; Ribeiro, 2012).

Preparation and characterization of spray-dried powders containing polymeric nanoparticles

The colloidal systems that were developed in this research were dehydrated by spray-drying process. As adjuvant, the lactose (at 10%, w/v) was used. Lactose is generally recognized as safe (GRAS) excipient and included in the FDA as inactive ingredients database (IM, IV: powder for injection solution; IV and sublingual preparations; oral: capsules and tablets; powder for inhalation; vaginal). Lactose acts as a drying support for the process and it is important for the protection of the thermal stability against the drying stress of process. Besides, it helps to assure the size particle after redispersion for obtaining the respective original colloidal size (Tewa-Tagne; Briançon; Fessi, 2007). The obtained spray-dried powders were recovered and kept away from the moisture sorption into closed vials stored at room temperature in desiccators. Table 3 presents the yield, drug and moisture content and yield of powders obtained from TIO-loaded nanocapsules (TIO-NC) and nanosphares (TIO-NS), as well as their respective blank formulations (NC and NS).

TABLE 3 – Drug content, moisture content and yield of powders containing TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NS_P and TIO-NC_P) and respective blank formulations (NS_P and NC_P) after preparation (mean ± s)

Formulation	Drug content (mg/g)	Moisture content (%, w/w)	Yield (%)
TIO-NS_P	22.44 ± 1.2^a	0.18 ± 0.00^a	65.91 ± 2.4^a
NS_P	-	0.19 ± 0.00^a	65.87 ± 1.5^a
TIO-NC_P	22.32 ± 0.2^a	0.11 ± 0.00^b	59.31 ± 1.3^b
NC_P	-	0.17 ± 0.00^a	63.15 ± 4.0^a

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p < 0.05$).

The spray-drying yield were similar for all formulations ($p>0.05$), around 60%, being resembling to those ones described in our previous studies for TIO spray-dried powders using lactose as drying adjuvant (Ribeiro, 2013). Those results indicated that the particles are well recovered from the cyclone separator because of their good fluidity properties. This fluidity is a result of non-cohesive characteristics of the particles which may to be explained by their low moisture content (below 0.2). The moisture content of powders in spray-drying process is influenced mainly by the nature of the material due to its interactions with water molecules (Sollohub, Krzysztof, 2010).

In relation to TIO content, the obtained values were 23 mg/g and 22 mg/ g for TIO-NS_P and TIO-NC_P, respectively, and near to the theoretical concentration (23.3 mg/ g and 21.9 mg/ g for TIO-NS_P and TIO-NC_P, respectively), which indicates that the process of dryer did not influence in this parameter and it was similar for two types of nanoparticle ($p > 0.05$). In comparison to the powders containing TIO associated at nanocapsules development by Ribeiro (2013), the increase of concentration of drug in this work did not alter the values of the yield process and content drug. This shows that the process of dyer was carried out effectively and there was not selective degradation or loss of drug during the process of dehydration of formulations. However, it was observed that the moisture content was lower in relation to the study reported in 2013 (higher than 2%). That might be explained by the presence of a higher concentration of oil, as it was already discussed - in comparison to nanospheres.

The distribution evaluation of overall size particle of the powders obtained was analyzed by laser diffraction. This technique allows the determination of submicron particle and size greater than 1 μm and, consequently, it becomes possible to evaluate the distribution profile. The obtained data were evaluated using the number distribution (Figure 2). The powders presented: d(4,3) of 97.35 and 122.5 μm; d(n, 90) of 0.88 and 1.02 μm; d(n, 50) of 0.640 and 0.713 μm; d(n, 10) were 0.5 and 0.6 μm, for TIO-NC_P and TIO-NS_P, respectively. The laser light scattering analysis showed a higher particle size for the powders obtained in comparison with others prepared from dehydration of colloidal suspensions by *spray-drying*, using the lactose as adjuvant (Hoffmeister *et al*, 2012). This could be explained by a decrease in the density and interparticle interactions due to the presence of thicker lactose coating (Wauthoz *et al*., 2011).

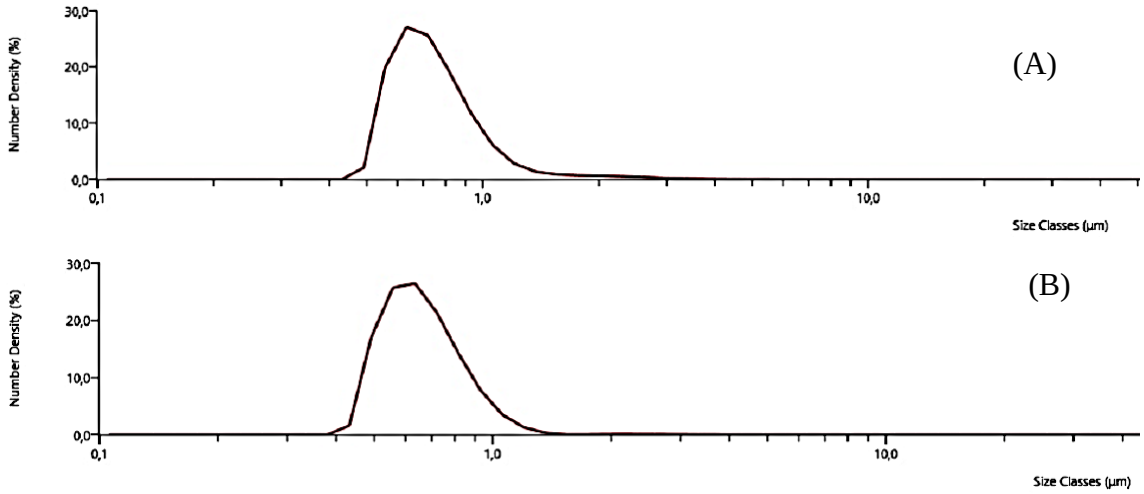

FIGURE 2 – Particle size distribution (as number of particles) of spray-dried powders containing TIO-NC_P (A) and TIO-NS_P (B) by laser diffraction, after 1 h of aqueous redispersion.

In addition, to compare the diameter with the original colloidal suspensions, the powders were reconstituted in water and evaluated in relation to mean particle size and polydispersity index by photon correlation spectroscopy. The resuspension index was calculated and the results are presented in table 4 and figure 3.

TABLE 4 – Particle size, polydispersity index (PDI) and ressuspension index (Sf/Si) of powders after redispersion containing tioconazole (TIO-NS_P and TIO-NC_P) and blank formulations (NS_P and NC_P) after preparation (mean ± s)

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Sf/Si
TIO-NS_P	233 ± 32^a	0.35 ± 0.05^a	1.30 ± 0.19^a
NS_P	178 ± 16^b	0.35 ± 0.03^a	1.07 ± 0.12^a
TIO-NC_P	212 ± 14^a	0.15 ± 0.05^b	1.00 ± 0.16^a
NC_P	195 ± 29^a	0.37 ± 0.01^a	1.08 ± 0.15^a

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p < 0.05$).

According to results, similar values were obtained in the comparison between the formulations (suspensions and powders). Therefore, the drier process did not influence in the size of particles containing TIO-loaded polymeric nanoparticles and their respective blank formulations. The ration between the size final and the initial is represented in figure 3. According to this parameter, the powders easily dispersed in water, and, thus, they showed the

importance of lactose in recovering the nanoparticles, being in agreement with the results previously reported by Tewa-Tagne *et al*. (2007).

However, it was observed an increase of the PDI in comparison to the original suspensions and between the type of nanostructure system ($p<0.05$). This increase may be an indicative of the presence of both released nanoparticles, nanoparticles/lactose and/or agglomerates of lactose in the obtained powders. That may be occasioned during the process of atomization for droplet formation from the vaporizing the sample. Besides, the nature of the properties of the sample to be submitted to atomization such as surface tension, viscosity and density should be considered for the control of the particle size (Nandiyanto, Okuyama, 2011). This variation of size also was observed by Kho and collaborators, who used the spray-drying of nanoparticles of PCL with lactose-leucin as adjuvant. At this research, the authors attributed the difference in values of index resuspension to the PCL melting point, which is about 60°C. This way, the high temperature during the drying process in spray-drying may produce partial fusion or total polymer wall, suggesting a new molecular rearrangement in structure. This action might be moderated by the low time of the particles stay in equipment.

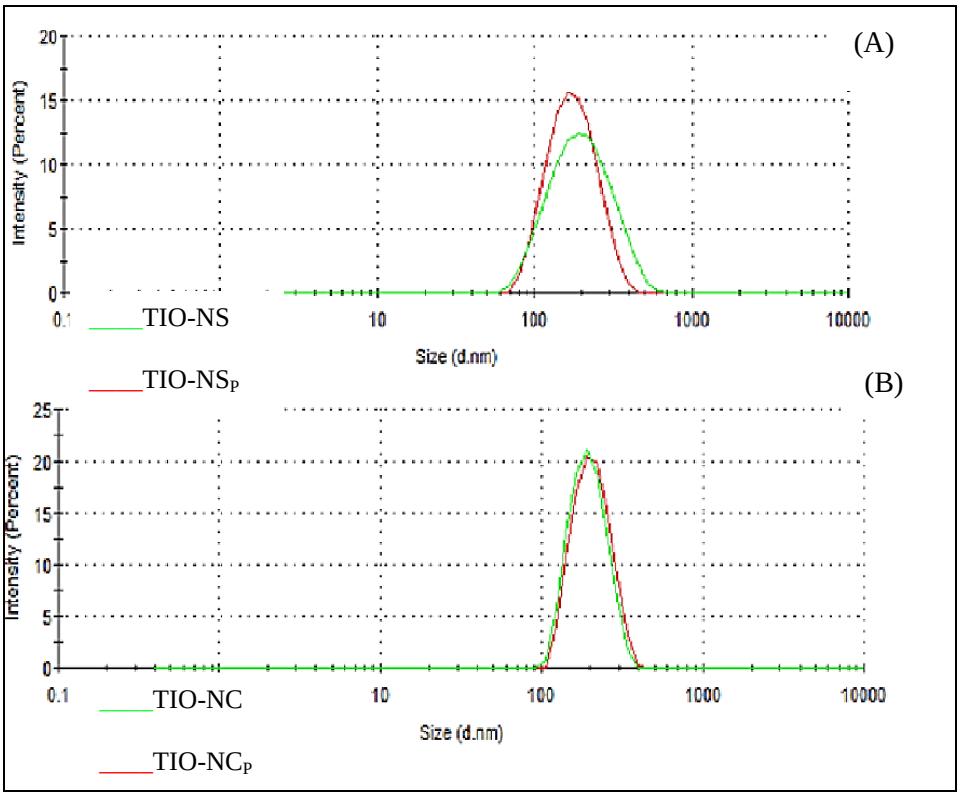

FIGURE 3 – Size distribution of polymeric suspensions and spray-dried powders containing TIO: TIO-NS and TIO-NS_P (A) and TIO-NC and TIO-NC_P (B) by photon correlation spectroscopy.

The morphological analysis of powders TIO-NS_P and TIO-NC_P was observed from the micrographic obtained by scanning electron microscopy (SEM). They are represented in figure 4. According to the SEM images, the morphology of spray-dried particles was spherical. The particles of the lactose dried presented smoother surface and with cracks (figure 4A and 4B). This characteristic was not observed for the powders containing the nanostructures. Besides, the spray-dried prepared from colloidal suspensions presented similar morphology and it was composed of micron-size regular and dense agglomerates being the nanoparticles probably included in the particles, as previously suggested in other studies (Tewa-Tagne *et al*. 2007; Marchiori *et al*., 2012).

In particular, the powders prepared with TIO-loaded nanocapsules (TIO-NC_P) presented looser and bigger clusters, with slightly rough surface and a narrow size distribution (figure 4C and 4D), when compared to those ones prepared with nanospheres (TIO-NS_P) (figure 4E and figure 4F). The influence of the viscosity, as well as of the moisture content can be considered the difference between the formulations might explain the more cohesive agglomerates when the powders prepared from TIO-NS_P are analyzed. This cohesion would also be the result of the smaller size of TIO-NS, once the size of the particle on suspension directly influenced the droplet size formed during the drying and it is an important parameter that affects the morphology of particles (Iskandar, Gradon, Okuyama, 2003).

In parallel, it could be observed that the dried process did not influence the structure of the TIO-NS, once the lactose - which is a soluble adjuvant, was able to protect the nanocarriers during the drier to evolve the nanostructures. This morphologic organization was not observed for the spray dried powders prepared with colloidal suspension and addition of other adjuvants, for example, colloidal silicon dioxide (Müller *et al.*, 2000; Guterres *et al*., 2001), which morphological analysis showed spherical microparticles with nanoparticles on their surfaces. Besides, it was verified, in literature, that the rearrangement of nanospheres may occur during the spray-drying process in the presence of silicon dioxide (Pohlmann, 2002).

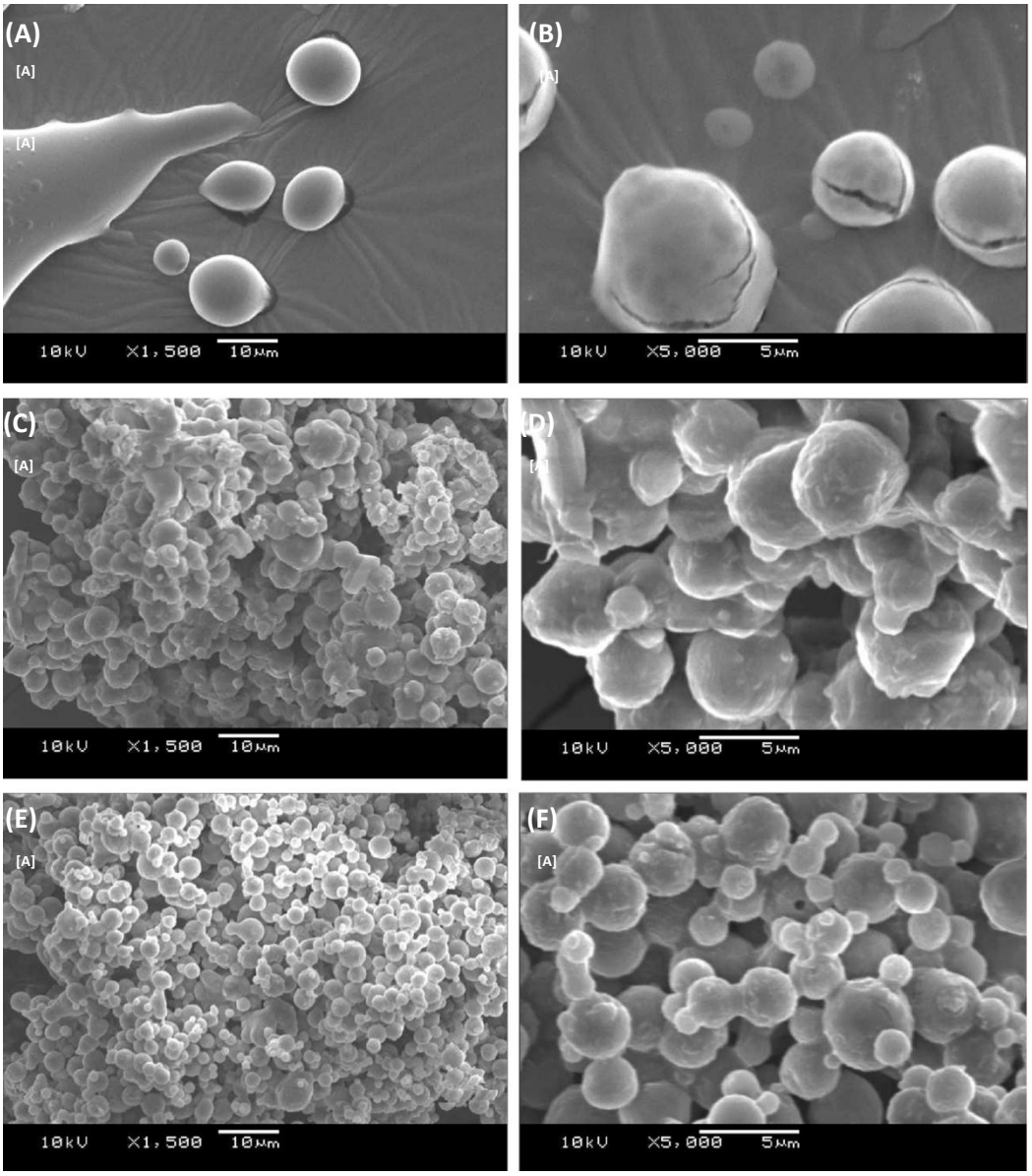

FIGURE 4 – SEM images of spray-dried powders: Lactose - L (A and B); TIO-loaded nanocapsules – TIO-NC_P (C and D) and TIO-loaded nanospheres – TIO-NS_P (E and F). [A, C and E (1,500x); B, D and F (5,000x)].

The stability of spray-dried powders was evaluated after 30 days of the preparation and, for parameters evaluation, mean particle size, polidispersity index, drug content and resuspension index were used. These results are presented in figure 5. Comparing the diameter and polydispersity, only TIO-loaded nanospheres maintained the similar values after one month of storage ($p<0.05$). For TIO-NC_P, an increase of the polidispersity and resuspension indexes was observed, showing the instability of these systems for this parameter. The resuspension index was similar for other samples. In relation to drug content,

the values were near to those ones after preparation (21 mg/ g and 20 mg/ g for TIO-NS_P and TIO-NC_P, respectively). This parameter is in agreement with values described by Ribeiro (2013) for powders prepared with nanocapsules containing TIO.

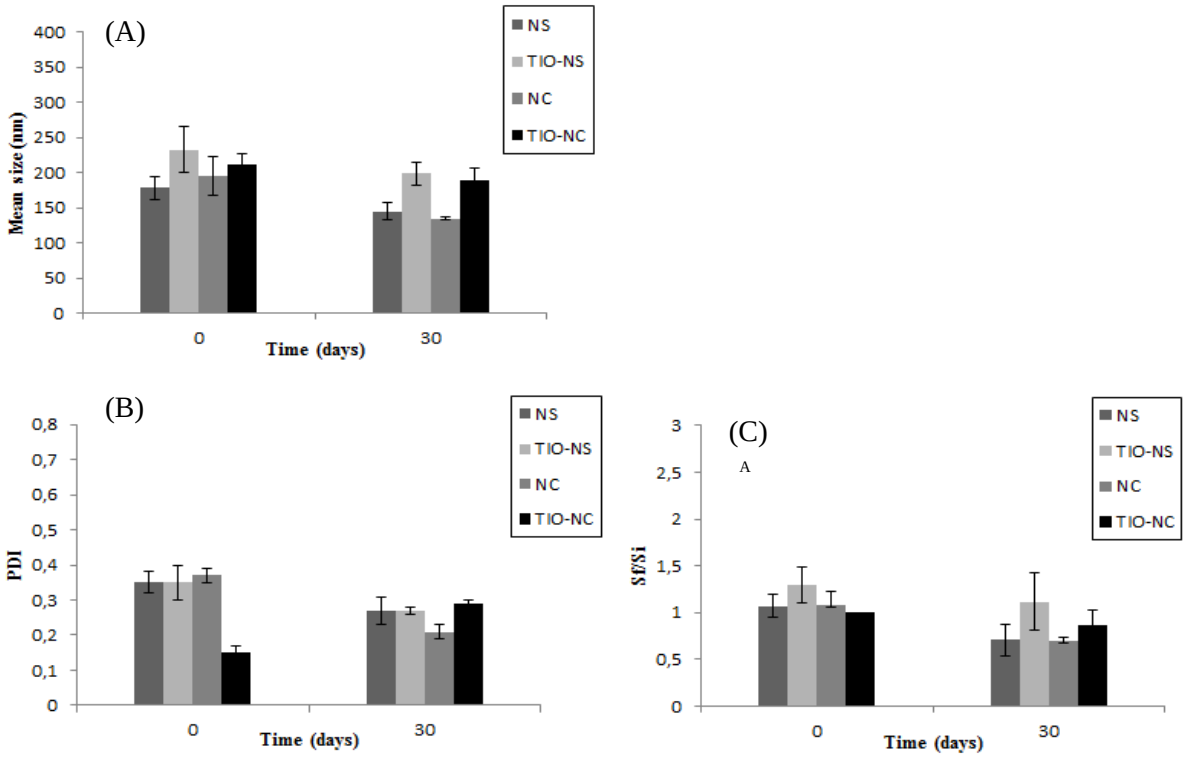

FIGURE 5 – Particle size (A), polydispersity index (PDI) (B) and ressuspension index (Sf/Si) (C) of powders containing TIO-loaded polymeric suspensions (TIO-NS_P and TIO-NC_P).

According to the results, a higher stability was verified for powders obtained from nanospheres (TIO-NS_P). This stability can be related to a smaller size and more tendencies at agglomeration that the nanocapsules. On other hand, the drying process can change the particle surface affecting the structure overall of the powder and promote a transformation phase (Ward, Schultz, 1995). This transformation can include crystallization of amorphous lactose, oftentimes induced by heat and moisture during storage and interfering on the properties of the powder as solubility (Mahlin *et al.*, 2004; Maher *et al.*, 2015). This induction might have influenced the properties of redispersion for the powder prepared with nanocapsules, once polydispersity and ressuspension index were significant different after preparation ($p<0.05$).

***In vitro* release study**

Drug release properties of spray-dried particles were verified *in vitro* by the dialysis bag method redispersing the powders in water. Their properties were compared to the TIO in ethanol solution (TIO-S), which represents the drug that is not associated with the nanocarrier. The profile of TIO release is presented in figure 6.

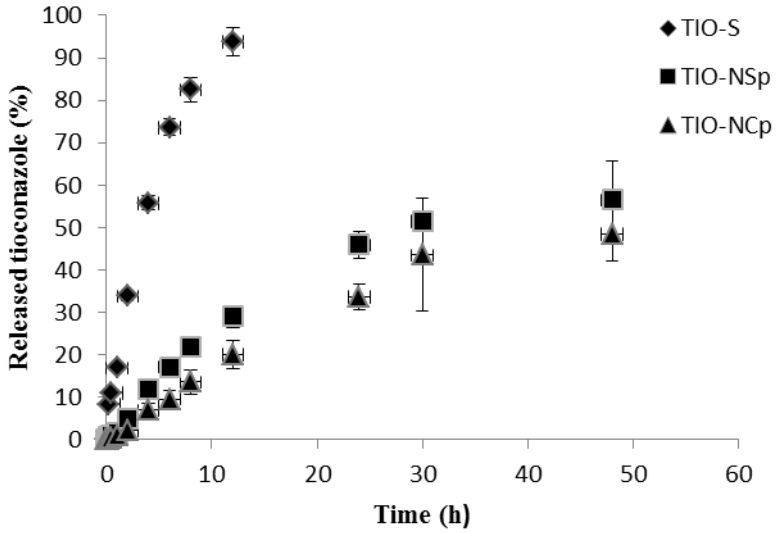

FIGURE 6 – *In vitro* release profile of TIO from spray-dried powders (TIO-NS_P and TIO-NC_P) and ethanol solution (TIO-S).

The percentage of drug released from TIO-S achieved 100 % after 12 h, while at the same time period, the powders containing the nanocapsules (TIO-NC_P) and nanospheres (TIO-NS_P) presented 20 ± 3% and 29 ± 2%, respectively. These lower releases showed that polymeric nanostructured system revealed a considerably prolonged TIO release profile. The release of drugs from these systems could happen by drug desorption, by diffusion through the polymer barrier, by erosion of the polymer material or by combination of these factors (Soppimath *et al*., 2001).

According the mathematical models used to describe the release profile, the best fitting to nanocarriers was biexponential model (table 5). Following this model, the formulation presented a biphasic drug release pattern, representing a burst phase at the initial followed by a sustained phase. The rate constants observed for the burst (K_1) were 0.0260 ± 0.0871 h^{-1} (TIO-NC_P) and 0.0524 ± 0.0193 h^{-1} (TIO-NS_P) and the observed rate constants for

the sustained phase (K_2) were 0.0107 ± 0.0606 and 0.0163 ± 0.0408 for TIO-NC_P and TIO-NS_P, respectively.

The initial concentration of TIO, which was released in the burst phase (a) for nanoparticles formulations, ranged from 49 mg/ mL to 65 mg/ mL in which in the sustained phase (b) varied from 51 mg/mL to 34 mg/mL. This value indicating that around 50% of the drug was entrapped within the nanocarriers (oil core for nanocapsules or polymeric matrix for nanospheres) and the remainder was superficially adsorbed. Then, the formulations presented different behavior that could be explained from the presence of polymer (nanospheres) or both polymer and oil (nanocapsules). The PCL is a polymer that presented high hydrophobicity and crystallinity which might explain the slower the release of the drug from of the nanoparticles (Pohlmann *et al.,* 2013). Those results are in agreement with other ones obtained for PCL nanoparticles (Fontana *et al*., 2010).

TABLE 5 – Rate constants (K_1 and K_2), correlation coefficients (r) and MSC obtained in the mathematical modeling of the TIO release profiles from dry products (TIO-NC_P e and TIO-NS_P)

	TIO-S	**TIO-NC_P**	**TIO-NS_P**
Zero Ordem			
R	0.9576 ± 0.0067	0.9664 ± 0.01794	0.9431 ± 0.0307
MSC	1.7524 ± 0.1458	2.5402 ± 0.6786	1.7679 ± 0.4341
Monoexponential			
R	0.9975 ± 0.0024	0.9844 ± 0.0105	0.9792 ± 0.0201
MSC	5.4516 ± 0.9676	3.5611 ± 1.0380	3.0924 ± 0.9397
K		0.0165 ± 0.0038	0.0230 ± 0.0029
Biexponential			
K1	0.1632 ± 0.0498	0.0260 ± 0.0871	0.0524 ± 0.0193
K2	0.0088 ± 0.2152	0.0107 ± 0.0606	0.0163 ± 0.0408
A	0.9956 ± 0.2098	0.4907 ± 0.4705	0.6574 ± 0.2931
B	0.2396 ± 0.3199	0.5163 ± 0.4711	0.3478 ± 0.2956
R	0.9986 ± 0.0012	**0.9981 ± 0.0006**	**0.9993 ± 0.0002**
MSC	5.2394 ± 1.1195	**5.0036 ± 0.3342**	**6.0482 ± 0.4391**

In addition, the half-life in each phase was calculated, and higher values were obtained from TIO-NS_P ($p<0.05$): TIO-NS_P, bust phase $t_{1/2}$ =13 h and sustained phase $t_{1/2}$ = 42 h; TIO-NC_P, burst phase $t_{1/2}$= 28 h and sustained phase $t_{1/2}$ = 68 h. These results showed difference between the type of nanocarrier (vesicular or matritial) and suggested the existence of the interaction between the TIO, lipophilic drug, and the polymer as well as the high lipophilicity of the drug in oil, preventing its diffusion from NC to the medium. These results corroborate with the ones previously observed for powder prepared from nanocapsules containing TIO which presented also the release biphasic profile (biexponencial) and half-life in each phase was similar at this study (bust phase $t_{1/2}$ =10 h and sustained phase $t_{1/2}$ = 63 h). This indicates that the higher concentration of the TIO did not influence the profile but it was observed a higher control of release for nanocapsules in relation to nanospheres (Ribeiro, 2013).

TABLE 6 – Half-lives (burst and sustained phase) of tioconazole released form polymeric nanoparticle

Formulation	**$t_{1/2}$ burst (h)**	**$t_{1/2}$ sustained (h)**
TIO-NC_P	28.17 ± 5.80^a	68 ± 5.43^a
TIO-NS_P	13.20 ± 3.22^b	42 ± 4.05^b

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p \leq 0.05$).

Furthermore, the mechanism of tioconazole release was determined with the use of Pawer Law model. For the formulations the *n* found were 0.7423 ± 0.0506 and 0.6123 ± 0.0431 for nanocapsules and nanospheres, respectively. Those values indicate that the release mechanism is an anomalous transport ($0,43 < n < 0,85$), in which the drug transfer occurs by the relaxation of the polymer chains and drug Fickian diffusion. These results were similar to other ones found for nanoparticles (NC and NS) prepared with the same polymer (Cruz *et al.*, 2006; Ribeiro, 2012).

CONCLUSION

Tioconazole-loaded nanocapsules and nanospheres suspensions were obtained with appropriate characteristics. But, the purpose of this research was the conversion of the liquid formulations in powders. The preparation of dry solid was investigated by the spray-drying process by using the lactose as a drying adjuvant. The results demonstrated the potentiality of

the technique, by nanostructures, was recovered after aqueous redispersion of powders, as showed by PCS. Furthermore, greater control of the release was observed in tioconazole post from the both nanoparticles prepared by spray-drying. This fact is interesting once the release control is very important because it may promote an increase in the permanence of drug application site thereby achieving greater efficacy therapy beyond safer and convenient administration (fewer doses apply). Due to the purpose of this study, the spray drying method would be the best choice once, in addition to greater control of drug release, it presents advantage to be a more rapidly and well accepted method, at industrial terms.

REFERENCES

ARTNER, J.; FUCHS, G. Open studies of the efficacy, tolerance, systemic absorption and vaginal persistence following single application of tioconazole ointment in the treatment of patients with vaginal candidiasis. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau*, v. 23, p. 12-19, 1983.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, v. 7, p. 1253-1271, 2012.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *Journal of Microencapsulation*, v. 21, p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BENVENUTTI, E. V.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: Preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. *Journal of the Brazilian Chemical Society***,** v. 16, p. 1633-1640, 2005.

COLEMAN, N. W.; FLECKMAN, P.; HUANG, J. I. Fungal Nail Infections. *Journal Hand Surgery American*, v. 39, p. 985-988, 2014.

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

DAS, M.; DHAK, P.; GUPTA, S.; MISHRA, D.; MAITI, T. K; BASAK, A.; PRAMANIK, P. Highly biocompatible and water-dispersible, amine functionalized magnetite nanoparticles, prepared by a low temperature, air-assisted polyol process: a new platform for bio-separation and diagnostics. *Nanotechnology*, v. 21, p. 103-125, 2010.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Química Nova***,** v. 31, p. 1966-1972, 2008.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation dês systèmes coloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent*, 0274961 A1, 1988.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 254-263, 2009.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphus polyesters: Effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 3091-3099, 2010.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 1, p. 187-217, 1988.

GUTERRES, S. S.; MÜLLER, C. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastrointestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P. Pharma Sciences*. v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

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

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview. *Brazilian Journal of Physics*, v. 39, p. 205-209, 2009.

HARTER, A. P. G.; MOTTA, M. H.; BARROS, J. G.; RIBEIRO, R. F.; ADAMS, A. I. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; SILVA, C. B. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. *Quimica Nova***,** *in press*, 2014.

HAY, R. J.; MACKIE, R. M.; CLAYTON, Y. M. Tioconazole nail solution: an open study of its efficacy in onychomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 10, p. 111-115, 1985.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, n. 251, p. 1-13, 2012.

ISKANDAR, F.; GRADON, L.; OKUYAMA, K. Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 265, p. 296-303, 2003.

JONES, R. N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIN, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (Vagistat-1 6.5%) application. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 17, p. 45-51, 1993.

KHO, K.; CHEOW, W. S.; LIE, R. H.; HADINOTO, K. Aqueous re-dispersibility of spraydried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. *Powder Technology,* v. 203, p. 432-439, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegrable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 75, p. 1-18, 2010.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology Infections*, v. 10, p. 1-10, 2004.

MAHER, P. G.; AUTY, M. A. E.; ROOS, Y. H.; ZYCHOWSKI, L. M.; FENELON, M. A. Microstructure and lactose crystallization properties in spray dried nanoemulsions. *Food Structure***,** v. 3, p. 1-11, 2015.

MAHLIN, D.; BERGGREN, J.; GÖRAN, A.; ENGSTRÖM, S. Moisture-Induced Surface Crystallization of Spray-Dried Amorphous Lactose Particles Studied by Atomic Force Microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 29-37, 2004.

MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 12, n. 3, p. 059-2067, 2012.

MODDARESI, M.; BROWN, M. B.; ZHAO, Y.; TAMBURIC, S.; JONES, S. A. The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery. *International Jornal of Pharmaceutics***,** v. 400, p. 176-182, 2010.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P .R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, p. 343-347, 2000.

MUÑOZ, A. J. C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J. M. H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. *Revista Iberoamericana Micología*, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

MUÑOZ, A. J. C.; ROJAS, F.; TUR-TUR, C.; SOSA, M. A.; DIEZ, G. O.; ESPADA, C. M.; PAYÁ, M. J.; GIUSIANO, G. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against Malassezia species. *Blackwell Verlag GmbH Mycoses*, v. 56, p. 571-575, 2013.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*, v. 22, p. 1-19, 2011.

POHLMANN, A. R.; WEISS.V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanosphers: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K., BECK, R. C. R; GUTERRES, S. S. Poly(e-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery***,** v. 10, p. 623-238, 2013.

RIBEIRO, R. F. **Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Secos Redispersíveis a partir de Nanoestruturas Contendo Tioconazol.** 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

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

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

STUBB, S.; HEIKKILÄ, H.; REITAMO, S.; FÖRSTRÖM, L. Contact allergy to tioconazole. *Contact Dermatitis*, v. 26, n. 3, p. 155-158, 1992.

SOLLOHUB, K.; KRZYSZTOF, C. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, p. 587-597, 2010.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHA, T. M.; K ULKARNI, A. R; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices**.** *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SWEETMAN, S. C. Martindale: *Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapéutica*. 2. ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. 2006, p. 588.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, p. 124-135, 2007.

UPMALIS, D. H.; CONE, F. L.; CATHLEEN, B. A.; LAMIA, A.; REISMAN, H.; RODRIGUEZ-GOMEZ, G.; GILDERMAN, L.; BRADLEY, L. Single-Dose Miconazole Nitrate Vaginal Ovule in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: Two Single-Blind, Controlled Studies Versus Miconazole Nitrate 100 mg Cream for 7 Days. *Journal of Women's Health & Gender-based Medicine*, v. 9, n. 4, p. 421-429, 2000.

VERGER, M. L.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 137-143, 1998.

WARD, G. H.; SCHULTZ, R. K. Process-Induced Crystallinity Changes in Albuterol Sulfate and Its Effect on Powder Physical Stability. *Pharm Res*, v. 12, p. 773-779, 1995.

WAUTHOZ, N.; DELEUZE, P. SAUMET, A.; DURET, C.; KISS, R. AMIGHI, K. Temozolomide-Based Dry Powder Formulations for Lung Tumor-Related Inhalation Treatment. *Pharm Res*, v. 28, p. 762-775, 2011.

ZHANG, A. Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. *Dermatologic Clinics*, v. 25, p. 165-183, 2007.

4 CAPÍTULO 2: SUPOSITÓRIOS VAGINAIS DE TIOCONAZOL: UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS PULVERULENTOS CONTENDO NANOESFERAS COMO PRODUTO INTERMEDIÁRIO

4.1 Apresentação

A aplicação tópica de medicamentos via vaginal visa tratar, principalmente, afecções que acometem o trato geniturinário feminino, portanto, é essencial que o fármaco fique retido no local de aplicação, evitando que aconteça a supressão da dosagem administrada e, também, efeitos sistêmicos (NEVES; BAHIA, 2006). Outra característica importante para essa aplicação é que a formulação tópica apresente-se como um sistema de liberação controlada, permitindo que a ação terapêutica do fármaco seja sustentada ao longo do tratamento, promovendo uma redução no número de aplicações e ausência da necessidade de altas concentrações para o efeito terapêutico desejado (BODUPALLI et al., 2010). A fim de modular a liberação de fármacos, sistemas nanocarreadores têm sido desenvolvidos em associação com agentes terapêuticos, pois proporcionam uma liberação mais controlada, evitando o contato imediato de altas concentrações de fármacos no local terapêutico e o aparecimento de possíveis efeitos adversos que alguns fármacos desencadeiam quando aplicados topicamente (ENSIGN et al., 2014).

O tioconazol, empregado no tratamento de vulvovaginites, está intimamente relacionado com o desenvolvimento de alguns efeitos colaterais, como coceira, irritação local, alergias, eritema, prurido, dor durante o ato sexual e queimação vaginal. Essas reações podem estar diretamente relacionadas com a necessidade de doses mais elevadas do fármaco para obtenção da resposta terapêutica (MUÑOZ et al., 2010).

Diante do exposto, no presente capítulo, foi proposta a preparação de supositórios vaginais empregando, como produto intermediário, pós contendo tioconazol associado à nanoesferas, preparados pela técnica de secagem por aspersão, descritos no capítulo anterior. Neste contexto, buscou-se a obtenção de uma forma farmacêutica sólida contendo o tioconazol associado às nanoestruturas, que permaneça na cavidade vaginal e possibilite uma liberação sustentada do fármaco.

Resumo

Produtos sólidos obtidos a partir da técnica de *spray-drying* constituídos de tioconazol associado à nanoesferas possibilitaram importantes vantagens, como o aumento da estabilidade do fármaco em comparação com as suspensões líquidas de origem e uma liberação mais sustentada a partir dessas formas sólidas. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade tecnológica de preparação de supositórios vaginais contendo os pós descritos acima. Para tal, suspensões de nanoesferas contendo tioconazol (3 mg/mL) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e submetidas à secagem por atomização utilizando a lactose (10%, m/v) como adjuvante. Posteriormente, os supositórios foram preparados pelo método de moldagem utilizando como base uma mistura de gelatina-glicerina, na qual as formas sólidas (pós contendo as nanoesferas ou a mistura física de lactose e o fármaco) foram incorporadas. As formulações apresentaram características de superfície e de dimensões homogêneas; teor de fármaco próximo da concentração teórica (23 mg/supositório); peso médio entre 4,51 e 4,57 g e tempo de desintegração próximo de 60 minutos. Além disso, os supositórios contendo tioconazol apresentaram uniformidade de conteúdo em relação à quantidade de fármaco para as unidades analisadas. Os supositórios constituídos pelos sistemas nanocarreadores apresentaram maior controle na liberação do que os supositórios contendo o fármaco não associado. Tendo em vista tais resultados, a obtenção dos supositórios vaginais contendo as nanoestruturas constitui uma alternativa tecnológica inovadora para a administração do tioconazol, voltada ao tratamento tópico de vulvovaginites.

Palavras-chave: Nanoesferas. Produtos secos. Supositórios vaginais. Tioconazol.

1 INTRODUÇÃO

A infecção fúngica vaginal é a segunda causa mais comum de vaginite do aparelho geniturinário feminino. Os principais agentes dessa doença são pertencentes ao gênero Candida, sendo a *Candida albicans*, a espécie mais comum, com 90 % de prevalência (ACHKAR; FRIES, 2010). Essa espécie é o agente principal da candidíase vulvovaginal (CVV) e tal infecção pode ser diagnosticada, mundialmente, em 70% das mulheres pelo menos uma vez em qualquer fase da vida (ZHANG et al., 2014; DOVNIK et al., 2015).

A CVV é decorrente da colonização das leveduras após sua a aderência na mucosa vaginal, originando os sintomas e sinais clínicos dessa vaginite (IRIE et al., 2006). As principais características clínicas dessa condição inflamatória são o prurido e a queimação vulvar, corrimento e dor vaginal, irritação, dispareunia e disúria (SOBEL, 2014). Existem alguns fatores que são considerados predisponentes, tais como a gravidez, o uso de contraceptivos orais, diabetes mellitus não controlada e o tratamento ao longo prazo com antibióticos de amplo espectro (CASSONE et al., 2014). Devido a esses fatores, além da susceptibilidade genética e de ser uma doença sexualmente transmissível, a CVV tem sido uma enfermidade recorrente e de grande freqüência, com altos níveis de internação e de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SARDI et al., 2013).

O tratamento da CVV é limitado à administração de antifúngicos da classe dos polienos e dos derivados imidazólicos (ACHKAR; FRIES, 2010). Dentre os polienos, a nistatina é o fármaco mais utilizado, porém um número crescente de espécies com susceptibilidade dependente da dose tem sido relatado para o efeito terapêutico desejado (MARTINS et al., 2012). A terapia realizada com os azóis (tioconazol, clotrimazol, fluconazol, miconazol, entre outros) tem sido eficaz em até 90 % das infecções vaginais tratadas. Esse efeito é devido ao amplo espetro de ação desses agentes, sendo ativos contra infecções fúngicas causadas por diversas espécies de *Candida* e no tratamento de infecções bacterianas (RICHTER et al., 2005).

Os fármacos antifúngicos imidazólicos são igualmente efetivos quando administrados por via oral ou vaginal (MENDLING et al., 2004; PAPPAS et al., 2009). Apesar dos fármacos administrados oralmente estarem associados a melhor adesão entre os pacientes devido a sua facilidade de administração, esses originam importantes efeitos de toxicidade sistêmica (SOONG; EINARSON, 2009). Além disso, as formulações tópicas devem ser consideradas como o tratamento de escolha durante a gestação, uma vez que a absorção sistêmica desses medicamentos é mínima, o que representa segurança contra possíveis malformações

congênitas (AGUIN; SOBEL, 2015; KALKANCI et al., 2012). Essa aplicação tópica via intravaginal pode ser realizada a partir das formas farmacêuticas semissólidas (creme, gel e pomada) ou sólidas, como comprimidos e supositórios (MENDLING et al., 2015). As apresentações sólidas possuem importantes vantagens em relação às outras, uma vez que são preparadas com dosagens mais precisas para períodos de tratamento longo evitando, assim, a necessidade de contínuas aplicações.

Os supositórios tem sido um sistema de liberação de fármaco comumente utilizado para o tratamento local de infecções vaginais, pois é facilmente administrado devido as suas características de superfície (lisa e escorregadia), além de serem desenvolvidos para se desintegrarem/dissolverem na cavidade vaginal (SOBEL, 2007; ACARTUK, 2009). Além disso, para o tratamento tópico ideal de vulvovaginites, é necessário que uma formulação fique retida na mucosa, prolongando o tempo de residência da mesma e que seja eficaz em baixas concentrações, possibilitando uma redução dos efeitos adversos e uma posologia conveniente (MACHADO, 2008).

O tioconazol é um antifúngico pertencente à classe dos imidazóis e é administrado na terapia da vulvovaginite, nas apresentações semissólidas (creme ou pomada), na concentração de 6,5%, e em óvulos de 300 mg. O seu mecanismo de ação consiste no efeito fungicida ao inibir a via biossintética do ergosterol presente na membrana celular fúngica, e no efeito fungistático ao alterar a fluidez e a permeabilidade da mesma, sendo que o efeito fungicida é dependente da sua concentração do meio (MARTENS, 2004). No entanto, devido à necessidade do uso de altas concentrações do fármaco para obtenção do efeito terapêutico desejado, sua administração está intimamente relacionada com o aparecimento de reações adversas, como coceira, irritação local, alergias, eritema, prurido, dor durante o ato sexual e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006). Além disso, outro problema enfrentado na terapêutica é a reduzida absorção cutânea (MUÑOZ et al., 2010) e vaginal (ARTNER & FUCHS, 1983), visto que a eficácia do fármaco depende também da sua biodisponibilidade no local de ação.

Considerando as características relatadas em relação à administração tópica do tioconazol, o uso da nanotecnologia tem sido sugerida como uma alternativa para reduzir seus efeitos adversos. Recentemente, em nosso grupo de pesquisas foram desenvolvidas nanoemulsões e nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) contendo o tioconazol (1,0 mg/mL), as quais foram incorporadas em formulações semissólidas e, também, se avaliou a conversão dessas formulações líquidas nanoestruturadas em pós redispersíveis. As suspensões, as preparações semissólidas e os pós obtidos possibilitaram uma liberação do fármaco

prolongada, apresentando, também, atividade antifúngica contra *C. albicans*. Além disso, as nanocápsulas possibilitaram aumentar a estabilidade do tioconazol frente à radiação ultravioleta e durante o armazenamento à temperatura ambiente em relação às nanoemulsões (HÄRTER, 2013; RIBEIRO, 2013).

Dando continuidade aos estudos, nanocápsulas e nanoesferas foram posteriormente preparadas, contendo uma maior concentração de tioconazol (3,0 mg/mL). De acordo com os resultados obtidos a partir dos pós secos, as nanoestruturas matriciais foram mais estáveis durante 30 dias e promoveram uma liberação mais rápida na primeira fase, porém, controlada após essa fase, sendo esta característica interessante para o tratamento da CVV.

Com base no exposto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento tecnológico de supositórios vaginais contendo nanoesferas de tioconazol, desidratadas previamente pela técnica de secagem por aspersão. A viabilidade dos produtos foi avaliada em relação às propriedades físico-químicas dos supositórios vaginais, bem como a possibilidade desta formulação inovadora em promover uma liberação controlada do fármaco a partir do estudo *in vitro*. Cabe salientar que até o presente momento esta abordagem tecnológica para o fármaco em estudo não foi relatada na literatura, constituindo uma etapa importante para o desenvolvimento de nanomedicamentos tópicos destinados ao tratamento da CVV.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O tioconazol e a gelatina foram adquiridos comercialmente da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil). Poli (**ε-**caprolactona) (PCL, Mn = 70,000 – 90,000) e monooleato de sorbitano (Span® 80) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Polissorbato 80 (Tween® 80) e acetona foram adquiridas da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Triglicerídeos de cadeia média (TCM) e lactose monohidratada foram obtidos da Delaware (Porto Alegre, Brasil). Glicerina foi obtida da Enerquímica (Paraná, RS). Metanol grau HPLC foi adquirido da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Preparação das nanoesferas e dos pós

Nanoesferas contendo tioconazol (TIO-NS – 3,0 mg/mL) foram preparadas por nanoprecipitação (Fessi et al., 1988). Após, as suspensões foram submetidas à secagem por aspersão em *spray dryer* (Spray-dryer MSD 1.0, Labmaq, Ribeirão Preto, Brasil), utilizando a

lactose (10%, m/v) como adjuvante (TIO-NS_P), de acordo com as condições descritas no capítulo 1.

2.3 Preparação de supositórios vaginais contendo os pós

Os supositórios vaginais foram preparados pelo método de moldagem (n=10) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Inicialmente, a base foi formulada dispersando a gelatina na glicerina, juntamente com a água. Esta mistura foi submetida à fusão, a temperatura de 60 °C em banho termostatizado, por 60 minutos. A fim de determinar a quantidade total de base necessária para a preparação dos supositórios, calculou-se o fator de deslocamento, que corresponde a quantidade de base deslocada por um grama de pó (Equação 1). Para a determinação desse fator, foram preparados 10 supositórios sem os pós (SV-B) e o mesmo número de supositórios contendo 22,8 % de lactose (SV-L). A quantidade de pó utilizada foi incorporada na base a temperatura de 50 °C em banho termostatizado. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas em molde apropriado para posterior resfriamento, solidificação e retirada dos supositórios do molde, e determinação do peso médio.

Equação 1:

$$fd = \frac{100(p - G)}{(G) \times (X)} + 1 \qquad (1)$$

Onde:

fd: fator de deslocamento;

p: peso médio dos supositórios de base pura (g);

G: peso médio dos supositórios com X % de pó (g).

A partir desta determinação, a quantidade de base necessária foi calculada, estimando-se um peso total de cinco gramas por supositório, cada um contendo 25 mg de tioconazol. Para comparação, supositórios vaginais contendo o fármaco não associado às nanoestruturas foram preparados, contendo a mistura física do tioconazol com lactose (SV-TIO). A tabela 1 representa a composição quali-quantitativa das formulações desenvolvidas.

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa dos supositórios

Componentes	**SV-B**	**SV-L**	**SV-TIO-NS_P**	**SV-TIO**
Gelatina	1,000 g	0,750 g	0,678 g	0,678 g
Glicerina	3,500 g	2,630 g	2,378 g	2,378 g
TIO-NS_P	----	----	1,140 g	----
M_{L+TIO}	----	----	----	1,140 g
Lactose	----	1,140 g	----	----
Água destilada	0,500 g	0,500 g	0,340 g	0,340 g

SV-B : base de supositório ; SV-L : base de supositório com lactose ; SV-TIO-NS_P:supositório com o produto seco contendo as nanoesferas; SV-TIO : supositório com a mistura física de tioconazol e lactose.

2.4 Caracterização físico-química dos supositórios vaginais

2.4.1 Determinação da aparência e dimensões

A aparência física dos supositórios vaginais foi analisada de acordo com a sua homogeneidade e aos aspectos visuais de superfície. As dimensões de 10 supositórios para cada formulação foram avaliadas individualmente quanto ao diâmetro e espessura com um auxílio de um paquímetro digital (F. Bras. V, 2010).

2.4.2 Determinação do peso médio

Os supositórios preparados foram pesados individualmente (n=10) em balança analítica e o peso médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram determinados. A uniformidade de peso foi verificada para o limite de desvios de 10% do valor médio e não mais que duas unidades para o limite de desvio de 5% do valor médio (F. Bras. V, 2010).

2.4.3 Determinação do tempo de desintegração

O tempo de desintegração foi determinado em dissolutor (Pharma Test PTS-3) utilizando água (37 ± 1 °C) como meio, de acordo com metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira V (2010). Foi verificado o tempo necessário para a completa desintegração de três supositórios, de cada formulação, o qual não pode exceder a 60 minutos.

2.4.4 Teor e uniformidade de conteúdo

A quantificação do tioconazol nos supositórios foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Uma unidade de cada formulação foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, utilizando 20 mL de água aquecida (40 °C). Esta mistura foi mantida sob agitação magnética durante 30 minutos para a completa dissolução do supositório, seguida pela adição de metanol como solvente. Após, a mistura foi submetida ao ultrassom para eliminação das bolhas existentes, por um período de 60 minutos, completando-se o volume com metanol. Uma alíquota desta solução (600 µL) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol para obtenção de uma concentração de 30 µg/mL de tioconazol. A amostra foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo. O sistema consistiu de um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Shimadzu, Japão), equipado com bomba LC-20AT e detector PDA SPD-M20, CBM-20A como controlador. Foi utilizada uma coluna Gemini Phenomenex® C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e pré coluna Phenomenex® C18 (4,0 x 3,0 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída por 80% de metanol, 20% de água ultra pura e 0,18% de hidróxido de amônio; a vazão utilizada foi de 1 mL/min; detecção UV a 219 nm e volume de injeção de 20 µL (HARTER et al., 2014; Ribeiro, 2013). O método foi validado e os parâmetros avaliados foram linearidade, especificidade e precisão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A avaliação da uniformidade de conteúdo foi determinada a partir do doseamento do conteúdo individual de tioconazol de 10 unidades, para todas as formulações preparadas (SV-TIO-NS_P e SV-TIO). Os critérios de avaliação seguiram as condições estabelecidas pela Farmacopéia Européia VII (2010), a qual estabelece uma variação de ± 15% entre as unidades testadas, e pela Farmacopéia Brasileira V (2010), a qual estipula que as quantidades são consideradas uniformes se o Valor de Aceitação (Equação 2), calculado para as 10 primeiras unidades, não for superior a 15 (L1).

Equação 2:

$$VA = M - \bar{X} + Ks \tag{2}$$

Onde:

VA = Valor de aceitação;

M = Valor de referência;

$\bar{X}$ = Média dos conteúdos individuais, expressa como porcentagem da quantidade declarada;

K = Constante de aceitabilidade;

s = Desvio padrão da amostra.

2.5 Avaliação da liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos supositórios vaginais

2.5.1 Preparação do Fluido Vaginal Simulado (FVS)

O FVS foi preparado como previamente descrito (Owen e Katz, 1999). Para isso, o cloreto de sódio (3,51 g), hidróxido de potássio (1,4 g), hidróxido de cálcio (0,22 g), albumina de soro bovino (0,018 g), ácido láctico (2,0 g), ácido acético (1,0 g), glicerol (0,16 g), ureia (0,4 g) e glicose (5,0 g) foram adicionados a 900 mL de água destilada numa proveta para dissolução dos componentes. O pH final foi ajustado para 4,8 (compatível com a via vaginal – 4,5 a 5,5) (Neves; Bahia, 2006) e o volume foi completado para 1 L.

2.5.2 Determinação do perfil de liberação do tioconazol a partir dos supositórios vaginais

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado utilizando-se a técnica de difusão em saco de diálise (n = 3) para os supositórios contendo o fármaco associado às nanoesferas e para os supositórios contendo o tioconazol livre (não associado). Para o ensaio, o meio de liberação foi constituído de FSV preparado como descrito na secção 2.5.1 acrescido de 0.5 % de polissorbato 80, o qual foi mantido a temperatura de 37 ± 0.5 °C, sob agitação magnética de acordo com a condição *sink*. Como barreira de liberação, foram utilizados sacos de diálise (MWCO = 12,000 Da, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) contendo o supositório juntamente com 10 mL de meio. Em tempos pré-determinados (0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 30 e 48 horas) foram coletadas alíquotas (2,5 mL) repondo-se o mesmo volume de meio fresco. Essas alíquotas foram diluídas em metanol, filtradas (membrana de nylon, 0.45 µm) e a quantidade de tioconazol liberada foi quantificada por CLAE, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 2.4.4. O método foi validado para os parâmetros de especificidade, linearidade e precisão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os perfis de liberação *in vitro* do fármaco, a partir dos supositórios, foram analisados mediante modelagem matemática (MicroMath Scientist® for WindowsTM).

2.6 Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente avaliados, em triplicata e expressos como média ± desvio padrão, através da Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, a um nível de significância de 5 %, empregando-se o software SigmaStat Windows versão 3.0.1.0 (Jandel Scientific, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação e caracterização dos supositórios vaginais

Em trabalhos anteriores foi possível verificar a viabilidade em preparar pós redispersíveis contendo nanoesferas de tioconazol a partir da secagem por aspersão. Estas formulações apresentaram características tecnológicas satisfatórias e possibilitaram a liberação controlada do tioconazol nos estudos *in vitro* realizados, podendo ser empregadas na obtenção de novas formas farmacêuticas sólidas, como os supositórios vaginais descritos no presente trabalho.

A base utilizada para a preparação dos supositórios constituiu-se de gelatina e glicerina, a qual apresentou um fator de deslocamento de 0,98 para o pó. A partir deste valor, foi possível determinar a quantidade necessária de base para preparar os supositórios contendo o fármaco em estudo. Os supositórios contendo as nanoestruturas foram obtidos após a incorporação do pó contendo as nanoesferas em forma sólida na base. Formulações controle contendo o fármaco não associado também foram preparadas, adicionando-se uma quantidade da mistura física composta por lactose e tioconazol. Quanto aos aspectos visuais, os supositórios apresentaram aspecto brilhante e homogêneo. Supositórios que foram preparados sem adição dos pós apresentaram transparência, característica da base empregada.

Para a quantificação do tioconazol nos supositórios vaginais o método analítico por CLAE foi validado, demonstrando ser específico, uma vez que não se observou a interferência dos excipientes no pico cromatográfico do fármaco, e preciso (DPR = 1,69%). O método analítico foi linear na faixa de concentração de 5 a 50 μg/mL ($y = 56255x – 1380,7$; $r^2 = 0,9999$). Através da análise estatística, verificou-se regressão significativa (Fcalculado = 64123,05 > Ftabelado = 4,53) e ausência de desvio de linearidade (Fcalculado = 1,69 < Ftabelado = 3,21).

Em relação às dimensões avaliadas (Tabela 2), os supositórios contendo o fármaco associado às nanoestruturas e não associado apresentaram diâmetros entre 13,62 e 14,07 mm e 13,91 e 14,25 mm, respectivamente. Quanto ao comprimento, os valores obtidos foram entre 34,00 e 34,93 para SV-TIO-NS_P, e 34,15 e 35,16 para SV-TIO. As preparações que continham o tioconazol apresentaram teor de fármaco próximo aos valores teóricos (25 mg/supositório) demonstrando que o processo de preparação não interferiu na quantidade total de fármaco presente. Diferenças significativas não foram observadas entre as formulações para os parâmetros avaliados ($p>0,05$).

Tabela 2 – Dimensões e teor de tioconazol dos supositórios vaginais preparados com os pós secos obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P), com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO), com lactose (SV-L) e supositórios base (SV-B) (média ± s)

Formulação	Teor (mg/supositório)	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)
SV-B	----	14,24 ± 0,20	34,54 ± 0,32
SV-L	----	14,16 ± 0,15	34,23 ± 0,30
SV-TIO-NS_P	23,27 ± 0,30	14,02 ± 0,25	34,67 ± 0,24
SV-TIO	23,71 ± 0,55	14,09 ± 0,11	34,82 ± 0,45

A determinação do peso médio permite verificar se as unidades preparadas apresentam uniformidade de peso. No presente trabalho, os supositórios vaginais foram pesados individualmente em balança analítica e os resultados estão expressos como média, valor máximo e mínimo do peso obtido para cada formulação preparada (tabela 3). Os resultados foram analisados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira V (2010), em que não se tolera mais que duas unidades da variação de peso de ± 5 % do valor médio e nenhuma unidade do dobro da porcentagem indicada. Os limites máximo e mínimo para os supositórios preparados com os pós contendo as nanoestruturas (SV-TIO-NS_P) foram, respectivamente, 4,79 a 4,34 g, com variação de 5 %, e 5,02 a 4,11 g, respectivamente, para 10 % de variação do peso médio. Em relação aos supositórios preparados com a mistura de lactose e tioconazol (SV-TIO) os limites foram 4,79 a 4,33 (± 5 %) e 5,02 a 4,10 (± 10%). A análise demonstrou que os pesos se mantiveram dentro dos limites especificados, assim como para as formulações sem o fármaco: 4,73 – 4,28 (± 5 %) e 4,96 – 4,06 (± 10%) – supositórios base (SV-B); 4,73 – 4,30 (± 5 %) e 4,98 – 4,08 (± 10%) supositórios com lactose (SV-L).

Para a avaliação do tempo necessário para a desintegração dos supositórios vaginais, três unidades de cada formulação foram avaliadas, contendo água destilada como meio de desintegração, a uma temperatura de 37 °C. De acordo com os resultados, as análises foram satisfatórias, pois todas as amostras se desintegraram em um tempo inferior a 60 minutos, limite máximo preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Tabela 3 – Peso médio e tempo de desintegração dos supositórios preparados com os pós secos obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P), com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO), com lactose (SV-L) e supositórios base (SV-B) (média ± s)

Formulação	Peso (g)			Tempo de desintegração (min)
	Média	Máximo	Mínimo	
SV-B	4,51 ± 0,04	4,56	4,43	53
SV-L	4,53 ± 0,10	4,65	4,37	54
SV-TIO-NS_P	4,57 ± 0,11	4,76	4,38	56
SV-TIO	4,56 ± 0,11	4,74	4,40	54

Para a avaliação da uniformidade de conteúdo, os resultados foram analisados conforme as farmacopéias Européia e Brasileira. O conteúdo médio determinado das 10 unidades analisadas para cada tipo de formulação está representado na figura 1. De acordo com os resultados obtidos da média do doseamento individual das unidades (22,68 e 23,04 mg de tioconazol/supositório para SV-TIO-NS_P e SV-TIO, respectivamente), os valores ficaram próximos de 90%, tanto para as formulações contendo o fármaco associado como para o fármaco apenas misturado na lactose (90,72 % ± 2,88 e 92,18 % ± 5,44, respectivamente). Além disso, com a determinação do conteúdo individual foi possível verificar que todas as unidades analisadas permaneceram dentro dos limites especificados, aceitando-se uma variação de ± 15 %, conforme preconizado pela Farmacopéia Européia (figura 2). O valor de aceitação calculado foi igual a 14,69 e 13,9 para SV-NSp e SV-TIO, respectivamente, o qual é menor que o limite especificado pela Farmacopéia Brasileira (L1 = 15). Cabe salientar que ambas as farmacopéias não apresentam a monografia do tioconazol, tanto para a matéria-prima como para especialidades farmacêuticas. Entretanto, apresentam os critérios gerais descritos para formas farmacêuticas sólidas (F. Bras. V) e para supositórios (F. Europ. VII).

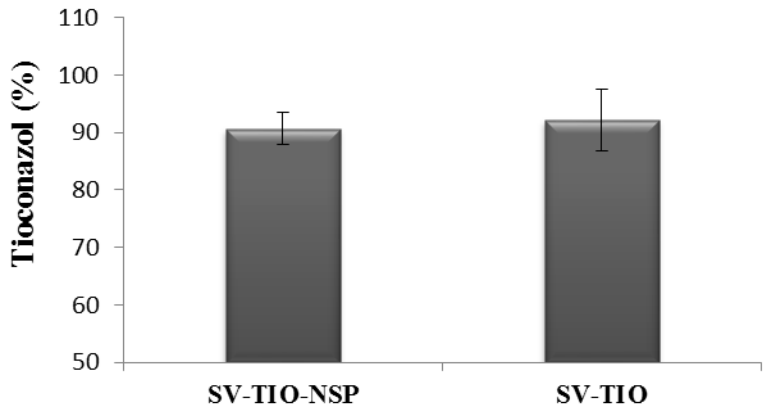

Figura 1 – Conteúdo médio de tioconazol (%) para os supositórios vaginais contendo os pós secos obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO).

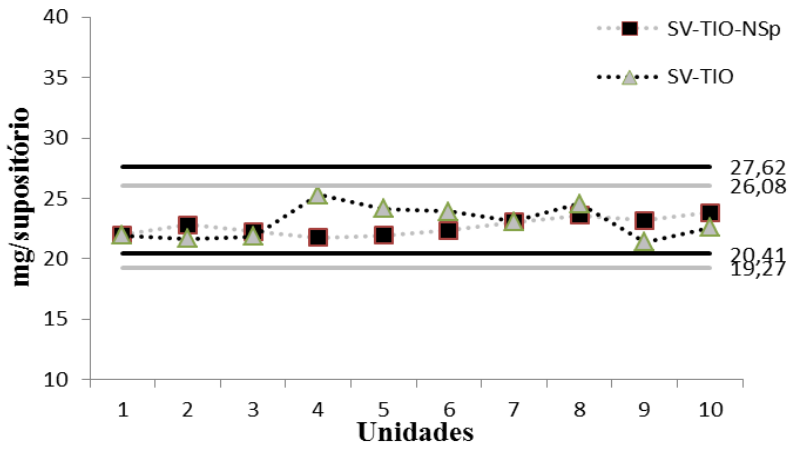

Figura 2 – Resultados obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos supositórios vaginais contendo os pós secos obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO).

A análise dos dados permite assegurar que cada unidade preparada apresentou quantidade de tioconazol próxima da quantidade declarada (25 mg de tioconazol/supositório), apresentando uniformidade de conteúdo em relação ao componente ativo presente em todas unidades testadas.

3.2 Avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos supositórios vaginais

As propriedades cinéticas de liberação do tioconazol foram avaliadas *in vitro* pelo método de difusão em saco de diálise a partir dos supositórios vaginais contendo o fármaco associado às nanoesferas (SV-TIO-NS_P) e a partir dos supositórios contendo o tioconazol

livre (SV-TIO). Para a quantificação do tioconazol, o método analítico foi validado e se mostrou específico, ou seja, o meio receptor não interferiu no doseamento do fármaco; linear na faixa de concentração de 0,1 a 40 μg/mL (y = 53938x + 1456,9; r^2 = 1), apresentando regressão linear significativa ($F_{calculado}$ = 1035,97 > $F_{tabelado}$ = 4,96) e ausência de desvio de linearidade ($F_{calculado}$ = 0,4091 < $F_{tabelado}$ = 3,71) e preciso (repetibilidade – DPR: 1,38%). O perfil de liberação do fármaco em função do tempo está representado na figura 3.

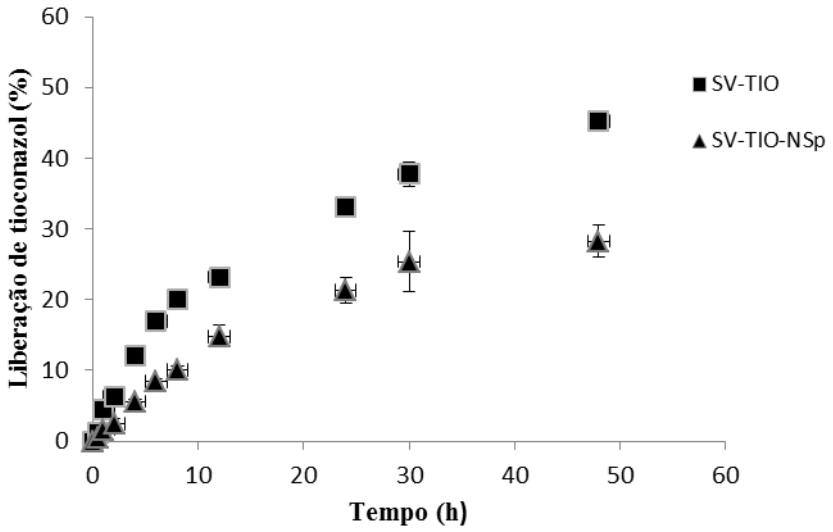

Figura 3 – Perfil de liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos supositórios vaginais preparados pela incorporação dos pós obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO).

Observa-se que, após 48 h de experimento, as porcentagens de fármaco liberadas a partir das formulações SV-L e SV-TIO-NS_P foram de 48,5 e 28, 5 %, respectivamente. Dessa forma, é possível verificar que o tioconazol não associado aos nanocarreadores apresentou liberação mais rápida enquanto que as preparações contendo os sistemas nanoestruturados revelou um perfil de liberação mais prolongado, evidenciando a eficácia das nanoestruturas em controlar a liberação do fármaco mesmo após a incorporação na base.

Os perfis de liberação para ambas as formulações (SV-TIO-NS_P e SV-TIO) se adequaram ao modelo cinético de primeira ordem biexponencial (tabela 4). De acordo com esse modelo, as formulações apresentam um comportamento bifásico, representado por uma fase inicial de liberação rápida (*burst*) e outra sustentada.

Tabela 4 – Constantes de velocidade de liberação (K1 e K2), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos na modelagem matemática dos perfis de liberação do tioconazol a partir dos supositórios vaginais contendo os pós obtidos por *spray-drying* (SV-TIO-NS_P) e com a mistura física do tioconazol e lactose (SV-TIO).

	SV-TIO-NS_P	SV-TIO
Ordem Zero		
R	0,9453 ± 0,0030	0,9537 ± 0,0173
MSC	1,3030 ± 0,0982	1,8218 ± 0,3727
Monoexponencial		
R	0,9703 ± 0,0029	0,9691 ± 0,0134
MSC	1,9234 ± 0,1429	2,2916 ± 0,4899
K	0,0160 ± 0,0006	0,0091 ± 0,0011
Biexponencial		
K1	0,1850 ± 0,0200	0,0243 ± 0,0009
K2	0,0084 ± 0,0007	0,0130 ± 0,0060
A	0,1877 ± 0,0070	0,7508 ± 0,0681
B	0,8143 ± 0,0070	0,2496 ± 0,0679
R	**0,9981 ± 0,0006**	**0,9980 ± 0,0007**
MSC	**5,0036 ± 0,3342**	**4,8649 ± 0,2700**

As constantes de velocidade observadas para a fase *burst* (K_1) foram 0,1850 ± 0,0200 h^{-1} e 0,0243 ± 0,0009 h^{-1}; e para a fase sustentada (K_2) foram 0,0084 ± 0,0007 h^{-1} e 0,0130 ± 0,0060 h^{-1} para as formulações SV-TIO e SV-TIO-NS_P, respectivamente. Os tempos de meia-vida em cada fase foram calculados e estão expressos na tabela 5. De acordo com esses resultados, os supositórios preparados com os pós contendo o fármaco associado ao nanocarreador apresentaram um comportamento de liberação mais rápido na fase inicial ($t_{1/2}$ foi de 3,74 h), porém, essa liberação foi mais controlada na segunda fase ($t_{1/2}$ igual a 82,5 h) quando comparado com as formulações contendo o fármaco não associado (fase *burst*: $t_{1/2}$ foi de 28,5 h e na fase sustentada: $t_{1/2}$ de 53,3 h).

Tabela 5 – Tempo de meia-vida (h) das fases *burst* e sustentada do tioconazol liberado a partir dos supositórios vaginais contendo os pós contendo as nanoestruturas (SV-TIO-NSp) e o fármaco não associado (SV-TIO)

Formulação	**Fase *burst***	**Fase sustentada**
SV-TIO-NS_P	$3,74 \pm 4,12^a$	$82,5 \pm 3,66^a$
SV-TIO	$28,5 \pm 5,34^b$	$53,3 \pm 2,89^b$

Letras iguais na mesma coluna não são estatisticamente diferentes (Anova, teste Tukey, $p<0.05$).

Os resultados obtidos permitem supor que a incorporação dos pós contendo as nanoesferas na base de gelatina-glicerina permitiu um controle maior da velocidade de liberação do fármaco, uma vez que a substância necessita ser liberada da nanoestrutura para então difundir através do supositório. Essa liberação pode ser influenciada por vários fatores e, sendo a primeira vez em que se estudou a incorporação desses pós contendo nanopartículas em base de supositórios vaginais, sugere-se que esse processo depende, além da dessorção do fármaco das partículas ou da difusão do mesmo através da parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003), da afinidade do fármaco pela base de supositório.

Com isso, é possível evidenciar que a base utilizada também influenciou na liberação do tioconazol a partir dos supositórios, uma vez que a formulação contendo o fármaco não associado também apresentou um comportamento de liberação controlado, evidenciado pelo modelo matemático obtido. Cabe salientar que a base de gelatina-glicerina é hidrofílica e facilmente mistura-se aos fluidos corporais. Nishimura e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades cinéticas de liberação do nifedipino, um fármaco lipofílico, complexado com 2-hidroxipropil-b-ciclodextrina pelo método de *spray-drying*. Os complexos foram dispersos em diferentes tipos de bases de supositórios e, a partir dos resultados, se verificou que o perfil de liberação do fármaco na base de gelatina-glicerina foi mais controlado quando comparado ao obtido com a utilização de bases lipofílicas. Assim, a liberação de fármacos a partir destas bases depende não apenas da sua taxa de difusão a partir da base, mas também da taxa de dissolução da própria base (YARNYKH et al., 2011).

Por fim, o fato das formulações desenvolvidas neste trabalho apresentarem uma liberação controlada do tioconazol é bastante vantajoso por permitir que a ação terapêutica do fármaco seja sustentada ao longo do tempo, levando a uma redução no número aplicações e, consequentemente, a uma maior comodidade para o paciente.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados, verificou-se pela primeira vez, a viabilidade tecnológica na preparação de supositórios vaginais contendo tioconazol associado às nanoesferas, constituídos de uma base hidrofílica e apresentando características físico-químicas satisfatórias preconizadas pelos códigos oficiais, como: aparência, peso médio, tempo de desintegração e uniformidade de conteúdo adequados. O estudo de liberação *in vitro* do fármaco revelou um maior controle da liberação do tioconazol a partir dos supositórios contendo os pós obtidos por *spray-drying*. Este fato é interessante visto que o controle da

liberação é muito importante, pois pode promover um aumento da permanência do fármaco no local de aplicação, consequentemente, favorecendo uma maior eficácia terapêutica, além da administração mais segura e conveniente (menor número de doses aplicadas). Tendo em vista o bom desempenho verificado para as formulações desenvolvidas neste trabalho, configura-se, assim, uma nova plataforma para a obtenção de formas de dosagem sólidas destinadas ao tratamento tópico de CVV.

REFERÊNCIAS

ACARTÜRK, F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 193-205, 2009.

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 253-273, 2010.

AGUIN, T. J.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal Candidiasis in Pregnancy. **Current Infectious Disease Reports**, v. 17, p. 1-6, 2015.

ARTNER, J.; FUCHS, G. Open studies of the efficacy, tolerance, systemic absorption and vaginal persistence following single application of tioconazole ointment in the treatment of patients with vaginal candidiasis. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, v. 23, p. 12-19, 1983.

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.

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

DOVNIK, A.; GOLLE, A.; NOVAK, D.; ARKO, D.; TAKAČ, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Dermatovenerologic**. v. 24, p. 5-7, 2015.

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.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. v. 1, 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

HÄRTER, A. G. D**esenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis**. 2013. 127f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

IRIE, M. M. T.; CONSOLARO, M. E. L.; GUEDES, T. A.; DONATTI, L.; PATUSSI, E. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. A Simplified Technique for Evaluating the Adherence of Yeasts to Human Vaginal Epithelial Cells **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 20, p. 195-203, 2006.

KALKANCI, A.; GÜZEL, A. B.; KHALIL, I. I. J.; AYDIN, M.; ILKIT, M.; KU§TIMUR. S. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. **Medical Mycology**, v. 50, p. 585-593, 2012.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology Infections**, v. 10, p. 1-10, 2004.

MARTINS, H.; RODRIGUES, P.; DA SILVA, M. C.; PAIVA, L. C. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Efficacy of Fluconazole and Nystatin in the Treatment of Vaginal *Candida* Species. **Acta Dermato Venereologic**, v. 92, p. 78-82, 2012.

MENDLING, W.; FRIESE, K.; MYLONAS, I.; WEISSENBACHER, E. R.; BRASCH, J.; SCHALLER, M.; MAYSER, P.; EFFENDY, I. Vulvovaginal Candidosis (excluding chronic mucocutaneous candidosis). Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (AWMF Registry No. 015/072, S2k Level, December 2013). **Geburtsh Frauenheilk**, v. 75, p. 342-354, 2015.

MENDLING, W.; KRAUSS, C.; FLADUNG, B. A clinical multicenter study comparing efficacy and tolerability of topical combination therapy with clotrimazole (Canesten®, two formats) with oral single dose fluconazole (Diflucan®) in vulvovaginal mycoses. **Mycoses**, v. 47, p. 136-142, 2004.

MUÑOZ, A. J. C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J. M. H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

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

NISHIMURA, K.; HIDAKA, R.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Improvement of Dispersion and Release Properties of Nifedipine in Suppositories by Complexation with 2-Hydroxypropyl-b-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 56, p. 85-88, 2006.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K. J.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E. J.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 503-535, 2009.

RIBEIRO, R. F. **Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Secos Redispersíveis a partir de Nanoestruturas Contendo Tioconazol**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitisand Epidemiology of Recurrent Cases. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, p. 2155-2162, 2005.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

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

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

SOBEL, J. D. Genital candidiasis. **Medicine**, v. 42, p. 364-368, 2014.

SOONG, D.; EINARSON, A. Vaginal yeast infections during pregnancy. **Canadian Family Physician**, v.55, p. 255-256, 2009.

SWEETMAN, S. C. Martindale: **Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica**. 2 ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. 2006, p. 588.

YARNYKH, T. G.; TOLOCHKO, E. V.; CHUSHENKO, V. N. Studying an assortment of suppository bases (review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, p. 21-26, 2011.

ZHANG, J.; LIU, J.; LIU, F.; XIA, Y.; WANG, J.; LIU, X.; ZHANG, Z.; ZHU, N.; YAN-YAN; YING, Y.; HUANG, X. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. **Mycoses**, v. 57, p. 584-591, 2014.

5 DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de sistemas nanocarreadores de fármacos é uma área da pesquisa de importância considerável e crescente nos últimos anos para o âmbito farmacêutico (BAMRUNGSAP et al., 2012). Dentre os sistemas desenvolvidos, destacam-se as nanopartículas poliméricas conferindo vantagens relacionadas com o aumento da eficácia (FACHINETTO et al., 2008; BERNARDI et al., 2009; MARCHIORI et al., 2010), a redução dos efeitos colaterais, a segurança (PAESE et al., 2009, CASTRO et al., 2009), o aumento da estabilidade e a melhora das características físico-químicas dos fármacos associados (OURIQUE et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; KÜLKAMP et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; OURIQUE et al., 2010a; SAVIAN et al., 2015).

As nanopartículas poliméricas caracterizam-se como dispersões coloidais de partículas sólidas e, de acordo com a composição e a estrutura, esses sistemas podem ser classificados como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas possuem um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso, onde, geralmente está localizado o fármaco. Com a exceção do núcleo, as nanoesferas possuem uma estrutura matricial em que o composto ativo pode estar firmemente adsorvido na sua superfície ou dissolvido na matriz polimérica (SCHAFFAZICK, et al., 2003a). No entanto, por essas dispersões se apresentarem na forma aquosa, muitas vezes, apresentam limitada estabilidade físico-química durante o armazenamento, devido à possibilidade de agregação das partículas (CHACON, et al., 1999), a degradação dos componentes, tais como o polímero (ABDELWAHED, et al., 2006) ou extravazamento do fármaco (SCHAFFAZICK, et al., 2006).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo em que foram desenvolvidas nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1 mg/mL), um antifúngico imidazólico de amplo espectro. Nestes trabalhos, os autores identificaram características físico-químicas adequadas após a preparação, bem como o potencial dos sistemas nanoestruturados em proteger o fármaco contra a radiação UVC e a manutenção da atividade antifúngica frente às leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* após a preparação dos nanocarreadores. No entanto, após 30 dias de preparação, essas suspensões foram instáveis em relação ao pH, devido a possível hidrólise do óleo e/ou degradação do polímero (HARTER, 2013). É importante ressaltar que esta diminuição já foi relatada em outros estudos encontrados na literatura (ALMEIDA et al., 2009; FONTANA et al., 2009; FLORES

et al., 2011). Com o intuito de aumentar a estabilidade físico-química destas formulações, foi proposta a conversão da suspensão coloidal de nanocápsulas e de nanoemulsões contendo tioconazol em material pulverulento, através de duas técnicas de desidratação: a secagem por aspersão e a liofilização, utilizando lactose ou trealose como adjuvante. Segundo Ribeiro (2013), os produtos sólidos obtidos a partir da secagem por *spray-drying* das nanocápsulas empregando a lactose como adjuvante, apresentaram uma maior estabilidade físico-química frente ao armazenamento quando comparados às suspensões convencionais por um período de 30 dias. Além disso, os produtos sólidos foram considerados redispersíveis, uma vez que tais sistemas foram capazes em recuperar, parcial ou totalmente, o tamanho dos sistemas nanoestruturados originais quando redispersos em água. Essa viabilidade de transposição em formas sólidas a partir de suspensões coloidais também foi reportada com eficiência por outros estudos (MARCHIORI, et al., 2013;TEWA-TAGNE et al., 2007a; KHO e HADINOTO, 2010). Ainda referente ao mesmo estudo, uma liberação controlada do tioconazol foi verificada para os produtos secos obtidos por *spray-drying*, os quais apresentaram 53% de fármaco liberado em 48 horas.

De posse dos resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa, o presente trabalho descreveu no capitulo 1 a obtenção de suspensões poliméricas contendo a associação do tioconazol à nanocápsulas e a nanoesferas de PCL a uma concentração de tioconazol de 3 mg/mL de dispersão, tendo em vista que os trabalhos anteriores empregaram uma menor quantidade de fármaco (1 mg/mL). A taxa de associação do tioconazol nas nanopartículas foi maior que 97%, estando de acordo com a literatura (RIBEIRO, 2013; HARTER, 2013) e indicando que a presença da dose tripla de fármaco ou a ausência do núcleo oleoso, no caso das nanoesferas, não prejudicou a encapsulação do mesmo.

A fim de avaliar físico-quimicamente as suspensões após a preparação e após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as amostras foram caracterizadas quanto ao teor, tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, pH e potencial zeta. Após a preparação, ambas as formulações apresentaram teor de fármaco próximo ao valor teórico, tamanho nanométrico de partícula (166-203 nm), índice de polidispersão inferior a 0,20; pH em torno de 6,0 e potencial zeta negativo.

Dando continuidade aos estudos, a próxima etapa do trabalho foi avaliar a técnica de secagem por aspersão das suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas utilizando a lactose como adjuvante, convertendo as amostras líquidas em materiais pulverulentos.

Os produtos secos foram avaliados em relação ao rendimento do processo, e apresentaram valores entre 59 % e 65 % para os produtos secos contendo as nanocapsulas e

nanoesferas, respectivamente. Estes resultados foram satisfatórios e superiores aos valores reportados na literatura na secagem de nanocápsulas com lactose (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012) como adjuvante.

O teor de fármaco foi próximo ao teórico (22 mg/g), demonstrando que não ocorreu perda do mesmo durante o processo de desidratação empregando altas temperaturas. Quanto à morfologia das partículas sólidas, foi observada a presença de estruturas esféricas com superfície lisa para ambos os sistemas desenvolvidos, sendo que os pós preparados com as nanocápsulas apresentaram tamanho maior que aquelas contendo as nanoesferas. A presença das nanoestruturas não foi verificada na superfície das partículas, por estarem, provavelmente, aderidas a matriz de lactose (TEWA-TAGNE, et al., 2007a; MARCHIORI et al., 2012). Essa organização estrutural está intimamente relacionada com a solubilidade do adjuvante empregado (TEWA-TAGNE et al., 2007a; GUTERRES et al., 2009).

Além disso, foi verificado o perfil de distribuição do tamanho das partículas por difração a laser, a fim de avaliar o perfil de desaglomeração dos produtos secos após a redispersão em água, em que se observou uma distribuição ampla, porém com populações nanométricas, confirmando a eficiência da redispersão de tais sistemas em recuperar, parcialmente, o tamanho dos sistemas nanoestruturados originais. Estes resultados corroboram com os obtidos por Ribeiro (2013).

Finalizando o capitulo 1, um estudo de liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos pós foi realizado. Os resultados demonstraram que as nanopartículas poliméricas possibilitaram um perfil de liberação do fármaco consideravelmente prolongado. Após 48 h, verificou-se um percentual de liberação do tioconazol de 48 ± 4% e 56 ± 2% para as nanocápsulas e nanoesferas, respectivamente, enquanto que a solução do fármaco não associado apresentou uma liberação completa no mesmo período. Além disso, diferenças entre o tipo de sistema (reservatório ou matricial) não foram verificadas em relação ao perfil de liberação. A liberação do tioconazol a partir dos pós seguiu uma cinética de primeira ordem constituída por duas fases, representada por uma liberação inicial rápida *(efeito burst)*, seguida por uma lenta liberação do fármaco, em que 49% e 65% do mesmo se encontra dentro da nanopartícula, e 51% e 35% do fármaco está adsorvido ou independentemente livre no sistema para os produtos secos constituídos por nanoesferas e nanocápsulas, respectivamente. Resultados similares foram obtidos pelo nosso grupo para as nanocápsulas contendo tioconazol (1 mg/mL), secas por aspersão (cinética de primeira ordem bifásica e uma liberação de 53% após 48 h), mostrando que, após a incorporação de uma quantidade maior de fármaco, mesmo reduzindo o conteúdo do óleo no núcleo das nanocápsulas ou até mesmo sem o núcleo, no

caso das nanoesferas, o sistema nanoestruturado ainda permaneceu com a capacidade de conferir um controle de liberação, sugerindo que o fármaco possui grande afinidade pelo polímero (PCL) e este, por se apresentar características anfifílicas (POLHMANN, et al., 2013), contribuiu para a organização supramolecular dos sistemas, mantendo, assim, as propriedades de controle de liberação.

Ao final deste capítulo, concluímos que o método proposto, bem como suas condições experimentais, foi adequado para a secagem das suspensões contendo tioconazol associado às nanocápsulas ou às nanoesferas a uma concentração de 3 mg/mL. Após o processo de secagem, as nanoestruturas puderam ser recuperadas, verificado após a redispersão aquosa do pó, e ainda, conseguiram controlar a liberação do fármaco, caracterizando um perfil de liberação constituído por duas fases para os dois tipos de nanoestruturas. Porém, se obteve uma liberação ligeiramente maior para os pós obtidos a partir das nanoesferas. Cabe salientar que esse fato é interessante, uma vez que tais sistemas podem promover um aumento da permanência do tioconazol no local de aplicação, proporcionando doses constantes, mais eficazes para o tratamento de vulvovaginites causadas por espécies de *Candida*.

De posse destas informações, o capítulo 2 abordou a utilização dos pós contendo tioconazol associado às nanoesferas como produtos intermediários na preparação de supositórios vaginais, a partir da técnica de moldagem utilizando a gelatina-glicerina como base. Na primeira etapa desta parte do trabalho, foi determinado o fator de deslocamento da base utilizada (0,98) para estabelecer a quantidade necessária da mesma para as formulações desenvolvidas. Além disso, para fins comparativos, foram preparados supositórios sem o fármaco, ou seja, somente com a lactose (SV-B) e também com o fármaco não-associado a partir de uma mistura física contendo lactose e tioconazol (SV-L). A caracterização dos supositórios foi realizada a partir da análise dos aspectos visuais e de superfície, determinação do peso médio e das suas dimensões, avaliação do tempo de desintegração, teor de tioconazol e uniformidade de conteúdo. Para as amostras avaliadas, o conteúdo de tioconazol foi próximo ao valor teórico (25 mg/supositório) e as características visuais dos supositórios que continham o fármaco e a lactose foram semelhantes, apresentando aspecto homogêneo, brilhante e coloração branca. Os supositórios preparados somente com a base diferiram dos anteriores apenas pela ausência de cor (Figura 1).

Figura 1: Fotografia dos supositórios contendo somente a base (A), lactose (B), mistura física (C) e os pós contendo as nanoesferas de tioconazol (D).

Para a determinação do peso médio, os supositórios foram pesados individualmente em balança analítica. Os supositórios preparados com os pós contendo as nanoesferas apresentaram peso médio de 4,57 ± 0,11 g, não diferindo em relação aos contendo o fármaco não associado. Com relação às dimensões, todas as formulações foram semelhantes apresentando valores de comprimento entre 34 e 35 mm, e valores de diâmetro em torno de 14 mm. Outra característica determinada foi o tempo que as formulações necessitaram para se desintegrarem as quais apresentaram resultado satisfatório (55 minutos, a 37 ºC), atendendo ao requisito preconizado pela Farmacopeia Brasileira V. No que se refere ao teste de uniformidade de conteúdo, as amostras cumpriram com as especificações descritas pela Farmacopéia Européia e Brasileira para a forma farmacêutica analisada.

Diante dos resultados, procedeu-se ao estudo de liberação *in vitro* a partir da técnica de difusão em saco de diálise, utilizando como meio de liberação o fluido vaginal simulado acrescido de 0,5% de polissorbato 80, garantindo a condição *sink*. A partir do experimento, observou-se que, após 48 horas, as porcentagens de fármaco liberadas a partir das formulações SV-L e SV-TIO-NS_P foram de 48,45 e 28,25 %, respectivamente. Dessa forma, foi possível verificar que o tioconazol não associado aos nanocarreadores apresentou liberação mais rápida, enquanto que as preparações contendo as nanoesferas desidratadas revelou um perfil de liberação consideravelmente mais prolongado, evidenciando a eficácia das nanoestruturas em controlar a liberação do fármaco.

O conjunto de todos os resultados obtidos neste trabalho demonstra a possibilidade da preparação de nanocápsulas e nanoesferas contendo tioconazol (3 mg/mL) e a sua conversão em produtos sólidos a partir da técnica de secagem por aspersão, bem como a efetiva incorporação da forma sólida escolhida em uma base de gelatina-glicerina, visando o desenvolvimento de supositórios vaginais. Por fim, tendo conhecimento dos problemas que são enfrentados na terapêutica com o tioconazol relacionado ao uso vaginal, como o

aparecimento de algumas reações adversas (coceira, edema, irritação local, ardor, prurido dor durante o ato sexual e queimação vaginal) e a viabilidade da obtenção dos supositórios vaginais, os quais possibilitaram um controle da liberação do fármaco, o presente trabalho contribui, assim, para o desenvolvimento tecnológico de uma formulação inovadora para tratamento tópico de infecções fúngicas vaginais. Como perspectivas para sua continuidade, destaca-se a avaliação da cinética *in vivo* e da eficácia terapêutica frente à *Candida albicans* da formulação obtida.

6 CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram desenvolvidas suspensões coloidais aquosas (nanoesferas e nanocápsulas poliméricas de PCL) contendo tioconazol, as quais apresentaram características físico-químicas compatíveis com os sistemas nanométricos e mantiveram-se estáveis durante 30 dias, a temperatura ambiente.

- A partir das suspensões, foi possível obter produtos sólidos intermediários contendo as nanoestruturas pela técnica de secagem por aspersão. Os pós apresentaram valores satisfatórios com relação ao rendimento ponderal, ao teor de fármaco e ao conteúdo de água, além da presença de partículas de tamanho nanométrico após redispersão em água.

- Os produtos secos possibilitaram um controle de liberação do tioconazol. A partir da modelagem matemática dos resultados, foi possível verificar que a liberação do fármaco seguiu o modelo cinético de primeira ordem constituído de uma fase *burst* e uma fase sustentada. O perfil de liberação para os produtos secos a partir das nanoestruturas foram semelhantes.

- Uma das formas sólidas obtidas a partir da secagem por aspersão foi utilizadas como produtos intermediários na preparação de supositórios destinados a aplicação via vaginal, empregando-se a técnica de moldagem e como base a mistura de gelatina-glicerina. Os supositórios vaginais apresentaram características adequadas, de acordo com os requisitos preconizados pelos códigos oficiais.

- A incorporação dos pós secos na base de gelatina-glicerina não alterou a habilidade das nanoesferas em controlar a liberação do tioconazol. Além disso, foi possível verificar que a base utilizada também influenciou no perfil de liberação do fármaco.

- Os supositórios vaginais desenvolvidos neste trabalho mostraram-se promissores como forma farmacêutica tópica para a administração do tioconazol via vaginal associado à nanoesferas.

REFERÊNCIAS

ABDELMONEM, A. M.; RASHEED, S. M.; MOHAMED, A. S. Bee-honey and yogurt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. **Archives Gynecology Obstetrics**, v. 286, p. 109-114, 2012.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, HATEM. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87-94, 2006b.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006a.

ACARTÜRK, F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 193-205, 2009.

ADAMS, J. L.; KASHUBA, A. D. M. Formulation, pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical microbicides. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 26, p. 451-462, 2012.

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

ALEXANDER, N. J.; BAKER, E.; KAPTEIN, M.; KARCK, U.; MILLER, L.; ZAMPAGLIONE, E. Why consider vaginal drug administration? **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 1-12, 2004.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.

ALMEIDA, J. S. **Formulações nanoestruturadas contendo rutina:** Desenvolvimento, atividade anti-oxidante in vitro e efeito sobre a cicatrização cutânea. 2010. 139f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PEASE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Jounal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v. 145, p. 139-148, 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.

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

ARRUEBO, M.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nanotoday**, v. 2, p. 22-32, 2007.

ARTNER, J.; FUCHS, G. Open studies of the efficacy, tolerance, systemic absorption and vaginal persistence following single application of tioconazole ointment in the treatment of patients with vaginal candidiasis. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, v. 23, p. 12-19, 1983.

ATTAMA, A. A.; AYOGU, I. J.; KENECHUKWU, F. C.; OGBONNA, J. D. N.; OKORE, V. C. A New Lipid Based Drug Delivery System (LBDDS) for Oral Delivery of Tioconazole. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 743-753, 2011.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. **7,** p. 1253-1271, 2012.

BARNHART, K. T.; PRETORIUSC, E. S.; TIMBERSA, K.; SHERAD, D.; SHABBOUTD, M., MALAMUDE, D. In vivo distribution of a vaginal gel: MRI evaluation of the effects of gel volume, time and simulated intercourse. **Contraception**, v. 70, p. 498-505, 2004.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R.; HASS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A. R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, p. 990-996, 2006.

BECK, R. C. R.; LIONZO, M. I. Z.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RÉ, M. I.; GALLAS, M. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Surface morphology of spray-dried nanoparticle-coated microparticles designed as an oral drug delivery system. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 389-398, 2008.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; HOFFMEISTER, C.; GALLAS, M. R.; COLLNOT, E.; SCHAEFER, U. F.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C. M. Dexamethasone-loaded nanoparticle- coated microparticles: correlation between *in vitro* drug release and drug transport across caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Bioharmaceutics**, v. 67, p. 18-30, 2007.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, R.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.

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.

BOLTON, S. Aplicações estatísticas às ciências farmacêuticas. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, p. 425-505, 2001.

BOLTON, S. Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 80, p. 327-354, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n 475, de 19 de março de 2002. **Guia para a validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 de março de 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

BRITISH PHARMACOPOEIA. 2010: Her Majesty. Stationary Office, v. 2, London, p. 2103-2104, 2010.

CARR, R. L. Evuluanting flow properties of solids. **Chemical Engineering**, v. 72, n. 2, p. 163-168, 1965.

CASTRO, G. A.; COELHO, A. L. L. R.; OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, A. B.; ORÉFICE, R. L.; FERREIRA, L. A. M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 77-83, 2009.

CAVALLI, R.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; FERRUTI, P.; RANUCCI, E.; TROTTA, F.; LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β-cyclodextrin-poly (4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 137, p. 166- 122, 2009.

CHACON, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 99-107, 1999.

CHAKRABORTY, M.; JAIN, S.; RANI, V. Nanotechnology: Emerging Tool for Diagnostics and Therapeutics. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 165, p. 1178-1187, 2011.

COLEMAN, N. W.; FLECKMAN, P.; HUANG, J. I. Fungal Nail Infections. **Journal Hand Surgery American,** v. 39, p. 985-988, 2014.

CONE, R. A. Barrier properties of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 75-85, 2009.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 757, 2008.

CRAIG, D. Q. M.; ROYALL, P. G.; KETT, V. L.; HOPTON, M. L. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 179-207, 1999.

CRYER, J. R.; ROBINSON, C. J. In vitro study to establish the efficacy of 28% tioconazole solution (Trosyl) against *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans.* **The International Journal of Foot Science**, v. 7, n. 1, p. 27-29, 1997.

CU, Y.; BOOTH, C. J.; SALTZMAN, W. M. In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 258-264, 2011.

DE CHASTEIGNER, S.; FESSI, H.; CAVÉ, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 5, p. 242-246, 1995.

DOLENC, A.; KRISTL, J.; BAUMGARTNER S.; SEK, P. O. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, p. 204-212, 2009.

EERDENBRUGH, B. V.; MOOTER, G. V.; AUGUSTIJNS, P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 64-75, 2008.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. **Journal of Controlled Release**, in press, 2014.

FACHINETTO, J. M.; OURIQUE, A. F.; LUBINI, G.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on Allium cepa root-tip compared to the free drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 668-673, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. v. 2, 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

FELICE, B.; PRABHAKARAN, M. P.; RODRÍGUEZ, A. P.; RAMAKRISHNA, S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. **Materials Science and Engineering C**, v. 41, p. 178-195, 2014.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation dês systèmes coloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

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. Nanostructurated systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

FONTANA, M. C.; BASTOS, M. O.; BECK, R. C. R. Development and Validation of a Fast RP-HPLC Method for the Determination of Clobetasol Propionate in Topical Nanocapsule Suspensions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 8, p. 637-640, 2010.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254-263, 2009.

FREAG, M. S.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDALLAH, O. Y. Development of novel polymer-stabilized diosmin nanosuspensions: In vitro appraisal and ex vivo permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 462-471, 2013.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promissing approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 616-621, 2010.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 187-217, 1988.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 213-219, 2006.

GARG, S.; GOLDMANB, D.; KRUMMEC, M.; ROHAND, L. C.; SMOOTE, S.; FRIENDF, D. R. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. **Antiviral Research**, v. 88, p. 19-29, 2010.

GUGLIELMINI, G. Nanostructured novel carrier for topical application. **Clinics in Dermatology** v. 26, p. 341-346, 2008.

GUOYT, J. C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; MAFROID, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SEGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatives aux methods generals d'analyse des forms orales solides récemment introduites dans les pharmacopeés française et européenne. Rapport d'une commission. SFSTP **S.T.P. Pharma Pratiques**, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.

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

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.

HARTER, A. G. **Desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e incorporação em hidrogéis**. 2013. 127f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HARTER, A. P. G.; MOTTA, M. H.; BARROS, J. G.; RIBEIRO, R. F.; ADAMS, A. I. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; SILVA, C. B. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. **Quimica Nova,** *in press*, 2014.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. **International Journal of Powder Metallurgy**, v. 3, p. 7-13, 1967.

HAY, R. J.; CLAYTON, Y. M.; MOORE, M. K. A comparison of tioconazole 28% nail solution versus base as an adjunct to oral griseofulvin in patients with onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 12, p. 175-177, 1987.

HAY, R. J.; MACKIE, R. M.; CLAYTON, Y. M. Tioconazole nail solution: an open study of its efficacy in onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 10, p. 111-115, 1985.

HEIKKILA, H.; STUB, S.; REITAMO, S. A study of 72 patients with contact allergy to tioconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 134, p. 678-680, 1996.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal- controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 251, p. 1-13, 2012.

HOUANG, E. T.; LAWRENCE, A. G. Systemic absorption and persistence of tioconazole in vaginal fluid after insertion of a single 300-mg tioconazole ovule. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 964-965, 1985.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 301-13, 2005.

ICH. International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005.

JONES, R. N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIN, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (Vagistat-1 6.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, p. 45-51, 1993.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 631-644, 2007.

KHO K.; HADINOTO K. Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates. **Powder Technology**, v. 198, p. 354-363. 2010.

KULKAMP, I. C.; PAESE, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.

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

LEVY, G.; PONTONNIER, G.; TAURELLE, R.; VITSE, M. Three-day Treatment of Patients with Vulvovaginal Candidiasis: A Comparison of Butoconazole Inserts with Econazole Ovules. **Current Therapeutic Research**, v. 52, n. 5, 1992.

LIU, L.; YUAN, S.; LONG, Y.; GUO, Z.; SUN, Y.; LI, Y.; NIU, Y.; LI, C.; MEI, Q. Immunomodulation of Rheum tanguticum polysaccharide (RTP) on the immunosuppressive effects of dexamethasone (DEX) on the treatment of colitis in rats induced by 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1568-1577, 2009.

MACHADO, R. S. M. **Desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica:** a folha vaginal. 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology Infections**, v. 10, p. 1-10, 2004.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MARCHIORI, M. C. L.; RASCOVETZKI, R. H.; OURIQUE, A. F.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; BECK, R. C. R. Improved tretinoin photostability in a topical nanomedicine replacing original liquid suspension with spray-dried powder with no loss of effectiveness. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, p. 579-586, 2013.

MARCHIORI, M. C. L.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 2059-2067, 2012.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, G.; NORA, D. 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 dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 962-971, 2010.

MISHRA, B.; BHAVESH, P. 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.

MODDARESI, M.; BROWN, M. B.; ZHAO, Y.; TAMBURIC, S.; JONES, S. A. The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery. **International Jornal of Pharmaceutics**, v. 400, p. 176-182, 2010.

MOHAMED, R. A.; ABASSA, H. A.; MOHAMED, A. A.; HEIKALB, O. A. Formulation and evaluation of metoclopramide solid lipid nanoparticles for rectal suppository. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, p. 1607-1621, 2012.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BHALGAT, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, p. 129-141, 2011.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 343-347, 2000.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 59, p. 522-530, 2007.

MUÑOZ, A. J. C.; ROJAS, F.; TUR-TUR, C.; SOSA, M. A.; DIEZ, G. O.; ESPADA, C. M.; PAYÁ, M. J.; GIUSIANO, G. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against Malassezia species. **Blackwell Verlag GmbH Mycoses**, 2013, v. 56, p. 571-575, 2013.

MUÑOZ, A. J. C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J. M. H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, p. 49-56, 2010.

NEL, A. M.; MITCHNICK, L. B.; RISHA, P., MUUNGO, L. T. M.; NORICK, P. M. Acceptability of Vaginal Film, Soft-Gel Capsule, and Tablet as Potential Microbicide Delivery Methods Among African Women. **Journal of Women's Health**, v. 20, p. 1207- 1214, 2011.

NEVES, J.; ARAÚJO, F.; ANDRADE, F.; MICHIELS, J.; ARIËN, K. K.; VANHAM, G.; AMIJI, M.; BAHIA, M. F.; SARMENTO, B. In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Polymeric Nanoparticles for Vaginal and Rectal Delivery of the Anti-HIV Drug Dapivirine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 2793-2807, 2013.

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

NEVES, J.; ROCHA, C. M. R.; GONÇALVES, M. P.; CARRIER, R. L.; AMIJI, M.; BAHIA, M. F.; SARMENTO, B. Interactions of Microbicide Nanoparticles with a Simulated Vaginal Fluid. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 3347-3356, 2012.

OURIQUE, A. F.; CHAVES, P. D.; SOUTO, G. D.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 174-182, 2014.

OURIQUE, A. F.; LIMA, S. I.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214-226, 2010.

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

PAESE, K.; JAGER, A.; POLETTO, F. S.; FONSECA, E. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: Effectiveness, i*n vitro* photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 240-246, 2009.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine:** Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 8, p. 147-166, 2012.

PASQUALOTO, K. F. M.; FUNCK, J. A. B.; SILVA, F. E. B.; KRATZ, C. P. Utilização de probitos como instrumento estatístico simples à avaliação da distribuição de tamanho de partículas de dois tipos de celulose microcristalina. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, p. 31-34, 2005.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 56, p. 827-840, 2004.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly(e-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, p. 623-638, 2013.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanosphers: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Porto: Calouste Gulbenkian, v. 3, cap. 17, 1996.

RAMÍREZ-SANTOS, A.; PEREIRO, M. J.; TORIBIO, J. Recurrent Vulvovaginitis: Diagnostic Assessment and Therapeutic Management. **Actas Dermosifiliografics**, v. 99, p. 190-198, 2009.

RIBEIRO, R. F. **Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Secos Redispersíveis a partir de Nanoestruturas Contendo Tioconazol**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

SANCHEZ, S.; GARCIA, P. J.; THOMAS, K. K.; CATLIN, M.; HOLMES, K. K. Intravaginal metronidazole gel versus metronidazole plus nystatin ovules for bacterial vaginosis: A randomized controlled Trial. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, p. 1898-906, 2004.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMS, A. I. H.; DE ANDRADE, D. F.; BECK, R. C. R.; DA 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, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin, **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. I**nternational Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 505-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64-71, 2008.

SEVCÍKOVÁA, P.; KASPÁRKOVÁA, V.; VLTAVSKÁA, P.; KREJCÍ, J. On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. **Colloids and Surfaces A:** Physicochemical and Engineering Aspects, v. 410, p. 130-135, 2012.

SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano Letters**, v. 10, p. 3223-3230, 2010.

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

STEIN, G. E.; GURWITH, D.; MUMMAW, N.; GURWITH, M. Single-dose tioconazole compared with 3-day clotrimazole treatment in vulvovaginal candidiasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 29, p. 969-971, 1986.

STUBB, S.; HEIKKILÄ, H.; REITAMO, S.; FÖRSTRÖM, L. Contact allergy to tioconazole. **Contact Dermatitis**, v. 26, p. 155-158, 1992.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapéutica**. 2. ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L. 2006, p. 588.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 63-74, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 30, p. 124-135, 2007.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 431-444, 2009.

UPMALIS, D. H.; CONE, F. L.; CATHLEEN, B. A.; LAMIA, A.; REISMAN, H.; RODRIGUEZ-GOMEZ, G.; GILDERMAN, L.; BRADLEY, L. Single-Dose Miconazole Nitrate Vaginal Ovule in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: Two Single-Blind, Controlled Studies Versus Miconazole Nitrate 100 mg Cream for 7 Days. **Journal of Women's Health & Gender-based Medicine**, v. 9, p. 421-429, 2000.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VERMANI, K.; GARG, S. The scope and potential of vaginal drug delivery. **Contraception**, v. 70, p. 498-505, 2004.

VISCIDO, A.; CAPANNOLO, A.; LATELLA, G.; CAPRILLI, R.; FRIERI, G. Nanotechnology in the treatment o inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis,** in press, 2014.

WANG, L.; TANG, X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: Design, in vitro and 'in vivo' evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 181-187, 2008.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.

WISSINGA, S. A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

YUE, P.; LI, Y.; WANA, J.; YANGA, M.; ZHUA, W.; WANG, C. Study on formability of solid nanosuspensions during nanodispersion and solidification: I. Novel role of stabilizer/drug property. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 269-277, 2013.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release,** in press, 2014.

ZHANG, A.Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, v. 25, p. 165-183, 2007.