

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da performance e caracterização *in vitro* de diferentes hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal

Luiza Abrahão Frank

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da performance e caracterização *in vitro* de diferentes hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal

Dissertação apresentada por **Luiza Abrahão Frank**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, março de 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.^a Maria Palmira Daflon Gremião, Dra.

PPGCF/ UNESP

Prof. Helder Ferreira Teixeira, Dr.

PPGCF / UFRGS

Prof. Ruy Carlos Ruver Beck, Dr.

PPGCF / UFRGS

Frank, Luiza Abrahão

Avaliação da performance e caracterização *in vitro* de diferentes hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal / Luiza Abrahão Frank. -- 2014. 77 f.

Orientadora: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Quitosana. 2. Nanocápsulas. 3. Via vaginal. 4. Eudargit RS100. 5. Eudragit S100. I. Stanisçuaski Guterres, Sílvia, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração entre o Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Dipartimento di Scienze del Farmaco da Univesità Degli Studi di Pavia, Itália. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

“Aplicando-me a conhecer a sabedoria e a ver o trabalho que há sobre a terra – pois nem de dia nem de noite vê o homem sono nos seus olhos -, então, contemplei toda a obra de Deus e vi que o homem não pode compreender a obra que se faz debaixo do sol; por mais que trabalhe o homem para descobrir, não a entenderá; e, ainda que diga o sábio que a virá a conhecer, nem por isso a poderá achar.” Eclesiastes 8: 16,17

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por conduzir minha vida e me conceder tantas oportunidades de aprendizado.

Agradeço ao meu esposo Alejandro Frank, pelo incentivo, encorajamento, ajuda e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradeço carinhosamente à minha avó Fatima Abrahão, que infelizmente já não está entre nós, mas que desde pequena me incentivou a estudar e a lutar pelos meus sonhos e não poupou esforços para me ver feliz.

Agradeço, de forma especial, à minha orientadora Prof^a Dr^a Sílvia Guterres, por ter acreditado em mim, pelas discussões construtivas, pelo incentivo à pesquisa e pela oportunidade que me concedeu de realizar o mestrado sanduíche. Agradeço também aos professores Dr^a Adriana Pohlmann e Dr. Ruy Beck pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço à professora Dr^a Carla Caramella pela acolhida e pela oportunidade de trabalho junto ao seu grupo de pesquisa na Università Degli Studi di Pavia e também às professoras Giuseppina Sandri e Maria Cristina Bonferoni pelas discussões científicas e o ensinamento transmitido.

Aos meus colegas do Laboratório 405 e do K204, em especial à Renata Vidor Contri, Márcia Adorne, Joana Forgearini e Cecília Michalowski, pela amizade.

RESUMO

A via de administração vaginal pode ser considerada uma alternativa para diversos tratamentos, tanto de ação farmacológica local como sistêmica. No entanto, o tempo de permanência do fármaco no local da aplicação e a eficácia esperada representam um desafio para o desenvolvimento de formulações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas de superfície catiônica (EUDRAGIT[®] RS 100) ou aniônica (EUDRAGIT[®] S 100), contendo ou não o marcador de fluorescência Vermelho do Nilo como um modelo de fármaco lipofílico, e incorporar essas partículas em hidrogéis de quitosana, a fim de aumentar o tempo de residência da formulação na mucosa vaginal, devido às propriedades mucoadesivas desse polímero. Diversas formulações foram preparadas com concentrações crescentes de quitosana e analisadas em termos de pH e comportamento reológico, a fim de selecionar a mais adequada para aplicação vaginal. Os hidrogéis foram produzidos com quitosana 2,5% p/p, com ou sem nanocápsulas. Foi avaliada a aderência (mucoadesividade e perfil lavabilidade) e a capacidade de penetração (microscopia confocal e extração seguido de quantificação do vermelho do nilo) das formulações quando aplicadas em mucosa vaginal de porcas. As suspensões de nanocápsulas apresentaram diâmetro em torno de 200 nm e potencial zeta entre +13 mV (NC-RS) e -13 mV(NC-S) e valores de pH entre 5,1 e 6,2. A formulação de quitosana apresentou viscosidade característica e pH ácido (em torno de 4,5), ideal para aplicação vaginal. Os testes de mucoadesão mostraram que as formulações propostas contendo nanocápsulas poliméricas apresentaram maior adesividade em mucosa vaginal em comparação com a formulação composta somente de quitosana. Através do experimento de lavabilidade não foram encontradas diferenças significativas entre as formulações. No entanto, as técnicas de microscopia confocal e a quantificação após a extração de fluorescência a partir da mucosa demonstraram uma maior penetração de vermelho do nilo quando nanoencapsulado, especialmente em nanocápsulas catiônicas. As formulações desenvolvidas com base no veículo do hidrogel de quitosana e nanocápsulas poliméricas, especialmente as nanocápsulas catiônicas, demonstraram aplicabilidade para a entrega de substâncias hidrofóbicas pela via vaginal.

Palavras-chave: quitosana, nanocápsulas, via vaginal, EUDRAGIT[®] RS100, EUDRAGIT[®] S100.

ABSTRACT

The vaginal route of administration might be an alternative for several treatments, either for local or systemic pharmacological effect. However, the permanence of the drug at the site of application and its expected effectiveness represent a challenge in the development of formulations. Thus, the objective of this work was to develop nanocapsules with cationic or anionic surface charge, containing or not Nile red as a model of lipophilic substance, and to incorporate such particles into chitosan vehicle in order to increase the residence time of the formulation due to chitosan mucoadhesive properties. Several formulations prepared with increasing chitosan concentrations were analyzed in terms of pH and rheological behaviour in order to select the most suitable one for vaginal application. Gel formulations were produced with chitosan at 2.5% w/w, with or without nanocapsules. The adhesion (tensile stress test and washability profile) and penetration enhancement properties (confocal microscopy- CLSM and extraction followed by quantification) of the formulations, when applied on porcine vaginal mucosa, were evaluated. The nanocapsule suspensions presented adequate properties and pH values around 5.1 and 6.2. The chitosan formulation presented a characteristic viscosity and an acid pH (around 4.5), which is suitable for vaginal application.

Mucoadhesion tests showed that the proposed formulations containing polymeric nanocapsules had higher adhesion to the vaginal mucosa in comparison with the formulation containing only chitosan. The washability evaluation showed no significant differences between the formulations. However, the confocal microscopy and the fluorescence quantification after extraction from the mucosa showed higher penetration of Nile red when nanoencapsulated, especially into cationic-charged nanocapsules. The formulations developed, based on chitosan gel vehicle and polymeric nanocapsules, especially the cationic nanocapsules, demonstrated applicability for the vaginal delivery of hydrophobic substances.

KEYWORDS: chitosan, nanocapsule, vaginal route, EUDRAGIT[®] RS100, EUDRAGIT[®] S100

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 Cruzamento das palavras nano* e vaginal realizada no Web of Science no dia 22/01/2014.....19
- Figura 2 Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).....36
- Figura 3 Distribuição do tamanho das partículas, por rastreamento de nanopartículas das suspensões de nanocápsulas poliméricas..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 Viscosidade como uma função da taxa de cisalhamento para os géis de quitosana (média \pm SD, n = 3).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5 Viscosidade como uma função da taxa de cisalhamento para os géis de quitosana contendo nanocápsulas de EUDRAGIT[®] RS 100 (média \pm SD, n = 3).
Erro! Indicador não definido.
- Figura 6 Viscosidade como uma função da taxa de cisalhamento para os géis de quitosana contendo nanocápsulas de EUDRAGIT[®] S 100 (média \pm SD, n = 3).
Erro! Indicador não definido.
- Figura 7 Força média de separação em função da distância de deslocamento para o trabalho realizado no teste de Mucoadesão de hidrogéis de quitosana (2.5% de quitosana).....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 Força de separação realizada no teste de mucoadesão de hidrogéis de quitosana (2.5% de quitosana) (média \pm SE, n = 6).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9 Trabalho de separação realizado no teste de Mucoadesão de hidrogéis de quitosana (2.5% de quitosana) (média \pm SE, n = 6).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10 Perfil de lavabilidade das formulações contendo o marcador de fluorimetria vermelho do nilo após incorporação em hidrogel de quitosana 2.5% (média \pm SE, n = 3).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11 Quantidade de vermelho do nilo acumulado dentro da mucosa vaginal em função da profundidade de tecido, após análise da lavabilidade com hidrogéis de quitosana (2.5% de quitosana) (média \pm SE, n = 3) .**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12 Imagens da mucosa vaginal por microscopia confocal após aplicação dos hidrogéis de quitosana contendo vermelho do nilo (2.5%).**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química das nanocápsulas poliméricas.....	43
Tabela 2 Hidrogéis de quitosana obtidos.....	45
Tabela 3 Caracterização do diâmetro das suspensões de nanocápsulas por diferentes técnicas (media± SD; n=3).....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4 Parâmetros reológicos dos hidrogéis a 25°C para as formulações com diferentes concentrações de quitosana com e sem nanocápsulas poliméricas (média ± SD, n = 3).....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5 Quantidade de NR que penetrou dentro do tecido vaginal (média ± SD, n = 3) e a razão entre as nanocápsulas com NR e o gel de quitosana com NR.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

NR: vermelho do nilo

NC-RS: nanocápsulas brancas de EUDRAGIT[®] RS 100

NC-S: nanocápsulas brancas de EUDRAGIT[®] S 100

NC-RS-NR: nanocápsulas contendo vermelho do nilo de EUDRAGIT[®] RS 100

NC-S-NR: nanocápsulas contendo vermelho do nilo de EUDRAGIT[®] S 100

CH-RS: gel de quitosana contendo nanocápsulas brancas de EUDRAGIT[®] RS 100

CH-S: gel de quitosana contendo nanocápsulas brancas de EUDRAGIT[®] S 100

CH-RS-NR: gel de quitosana com nanocápsulas contendo vermelho do nilo de EUDRAGIT[®] RS 100

CH-S-NR: gel de quitosana com nanocápsulas contendo vermelho do nilo de EUDRAGIT[®] S 100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2. OBJETIVO.....	Erro! Indicador não definido.
2.1. Objetivo Geral	Erro! Indicador não definido.
2.2. Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	Erro! Indicador não definido.
3.1. Via Vaginal.....	Erro! Indicador não definido.
3.2. Aplicação de fármacos na via vaginal	Erro! Indicador não definido.
3.3 Modelos para o estudo da via vaginal	Erro! Indicador não definido.
3.4 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal	Erro! Indicador não definido.
3.5 Quitosana	Erro! Indicador não definido.
4 MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Materiais	Erro! Indicador não definido.
4.2 Produção das nanocápsulas	Erro! Indicador não definido.
4.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas	Erro! Indicador não definido.
4.3.1 Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão das formulações.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.2 Tamanho de partícula e distribuição granulométrica	Erro! Indicador não definido.
4.3.3 Determinação do diâmetro por rastreamento de nanopartículas.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.4 Potencial zeta das partículas	Erro! Indicador não definido.
4.3.5 pH das suspensões das nanocápsulas poliméricas	Erro! Indicador não definido.

4.4	Produção dos hidrogéis de quitosana e estudo da concentração ótima de quitosana	Erro! Indicador não definido.
4.5	Caracterização dos hidrogéis de quitosana.....	Erro! Indicador não definido.
4.6	Estudos <i>in vitro</i> com mucosa vaginal de suínos..	Erro! Indicador não definido.
4.6.1	Análise da mucoadesão	Erro! Indicador não definido.
4.6.2	Análise da lavabilidade	Erro! Indicador não definido.
4.7	Penetração do vermelho do Nilo em mucosa vaginal	Erro! Indicador não definido.
4.7.1	Microscopia confocal (CLSM): análise da penetração do vermelho do Nilo em mucosa vaginal.....	Erro! Indicador não definido.
4.8	Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
4.9	Gerenciamento de resíduos.....	Erro! Indicador não definido.
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
5.1	Caracterização das nanocápsulas.....	Erro! Indicador não definido.
5.2	Seleção do melhor hidrogel para aplicação vaginal	Erro! Indicador não definido.
5.3	Análise da adesividade <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
5.4	Análise da penetração <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
6	CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.
	REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
	ANEXO A – Artigo aceito para publicação	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem sendo extensamente pesquisada para aplicação em medicamentos e cosméticos e já se encontra em alguns produtos disponíveis no mercado. Nanoestruturas têm sido descritas na literatura desde a década de 1960 em pesquisas na área farmacêutica. Uma das vantagens apresentada pelo uso dessas partículas é um tratamento mais efetivo e menos tóxico que o convencional, uma vez que o sistema administrado tem afinidade pelo alvo específico (órgão, tecido ou célula) (TEDESCO, et al., 2007) e também um controle da liberação do fármaco (SCHAFZICK E GUTERRES 2003).

Uma via estudada para a aplicação de nanoestruturas é a via vaginal (VALENTA 2005; BONFERONI et al., 2008; PERIOLI et al., 2008). A mucosa vaginal apresenta uma elevada irrigação sanguínea, o que facilita a absorção de fármacos. Por apresentar essa característica, podem ser administrados fármacos com uma pequena dosagem, como é o caso de hormônios (VALENTA 2005). A administração de fármacos através da via vaginal pode ser considerada uma alternativa em relação a outras vias, uma vez que apresenta interessantes características como: local de fácil aplicação, elevada irrigação sanguínea, ausência do metabolismo de primeira passagem que fármacos sofrem no fígado, dentre outras (BONFERONI et al., 2008; VALENTA 2005).

Uma pesquisa realizada no web of science fazendo o cruzamento das palavras nano* e vaginal mostrou que essa via apesar de apresentar as inúmeras vantagens já expostas, ainda não é uma via extensamente estudada. Porém, observa-se na Figura 1 que nos últimos anos essa via tem sido alvo de pesquisa na área de nanotecnologia.

Por outro lado, uma das desvantagens que essa via apresenta é o ambiente hostil da mucosa vaginal que diminui o tempo de residência de fármacos, quando estes são administrados (YEN CU et al., 2009). Isto se deve ao fato desta mucosa apresentar uma descarga vaginal que envolve fluidos endometriais, secreções das glândulas bortholinas e transudatos através do epitélio, contribuindo para a remoção da formulação do local de aplicação. Somando-se a esses inconvenientes, muitos fármacos que são administrados pela via vaginal produzem efeitos adversos como coceira, irritação e dor o que contribui para a não adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Contudo, a nanotecnologia pode ser uma estratégia para contornar este problema. O

fármaco pode ser incorporado em nanoestruturas, podendo levar a uma menor degradação do mesmo e também uma possível diminuição dos efeitos adversos (SHAFFAZICK e GUTERRES, 2003, CONTRI et al., 2014). Adicionalmente, essas nanoestruturas podem ser incorporadas em polímeros mucoadesivos, o que ocasiona aumento do tempo de permanência do fármaco no local da aplicação, além de aumentar sua absorção (HUSSAIN e AHSAN, 2005; VALENTA, 2005 e RICHARDSON e ILLUM, 1992). O desempenho da maioria dos fármacos poderiam ser melhorados usando transportadores bioadesivos, que fornecem tempo de contato prolongado entre o sistema polimérico e a camada superficial da mucosa (BALOGLU et al., 2009) e uma liberação controlada de fármacos (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).

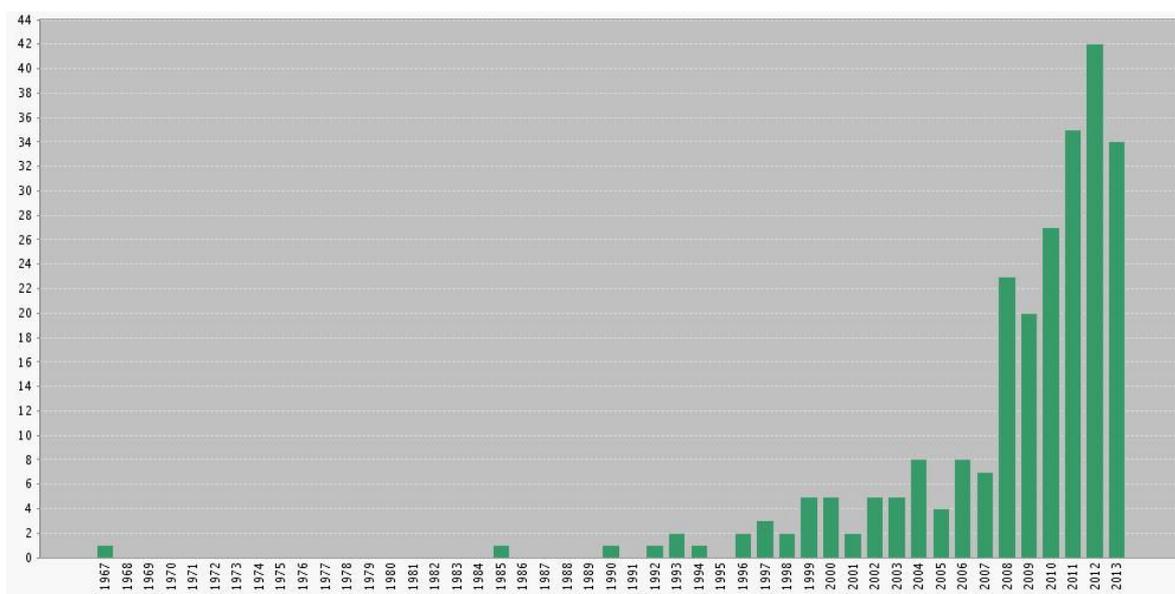


Figura 1 Cruzamento das palavras nano* e vaginal realizada no Web of Science no dia 22/01/2014

Os hidrogéis são conhecidos por se apresentarem na forma de rede polimérica tridimensional capazes de absorverem grandes quantidades de água enquanto permanecem insolúveis, devido a interligações entre as cadeias individuais do polímero (LIN e METTERS, 2006). Hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros sintéticos ou naturais ou, ainda, podem ser uma combinação de ambos (HIN, 2004). Entre os polímeros naturais mais utilizados na preparação de hidrogéis pode-se citar a quitosana (LIN e METTERS, 2006). A quitosana é um polissacarídeo

desacetilado originado da quitina que é um polissacarídeo de D-glicose que contém grupamentos amino na sua estrutura. Sua principal fonte industrial é exoesqueleto dos crustáceos marinhos (VÅRUM E SMIDSRØD, 2005). A quitosana apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, atividade bacteriostática e capacidade de formação de filme e de regeneração de tecidos lesados, além de ser o único polímero pseudonatural catiônico (BERGER et al., 2004a; BERGER et al., 2004b; RINAUDO 2006). A presença de OH e NH₂ juntamente com o seu caráter catiônico, permitem o estabelecimento de ligações de hidrogênio com as cadeias de mucina presente no muco, resultando em um bom caráter mucoadesivo, e por esse motivo esse polímero é um veículo interessante para entrega de fármacos em mucosas (PERIOLI et al., 2009; SAYIN et al., 2009). Por apresentar essas inúmeras e interessantes características, este biopolímero apresenta aplicações tanto nas áreas biomédicas, de cosméticos, de tecnologia alimentícia e também na área farmacêutica (RAVI KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006). Uma possível aplicação da quitosana é a veiculação de fármacos utilizados na via vaginal, uma vez que apresenta mucoadesão e, por consequência, um aumento do tempo de contato do fármaco com a mucosa (SANDRI et al., 2004; PERIOLI et al., 2009).

Em base ao acima exposto, este trabalho propõe trabalhar de maneira conjunta as vantagens que a nanotecnologia, a via vaginal e os hidrogéis de quitosana apresentam, propondo soluções para melhorar o desempenho de possíveis formulações aplicadas na via vaginal, aumentando o tempo de contato entre a formulação e a mucosa e levando a uma liberação controlada do fármaco.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver suspensões de nanocápsulas com polímeros catiônico ou aniônico contendo o vermelho do nilo como marcador das formulações para sua incorporação em hidrogéis de quitosana visando a aplicação na via vaginal.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas contendo ou não o marcador fluorimétrico vermelho do nilo quanto ao diâmetro, potencial zeta e pH;
- b) Incorporar nanocápsulas em quantidades crescentes de hidrogel de quitosana bem como realizar a análise reológica das formulações;
- c) Analisar a mucoadesividade das formulações em mucosa vaginal de porcas;
- d) Analisar a lavabilidade dos diferentes hidrogéis de quitosana utilizando mucosa vaginal de porcas;
- e) Analisar a penetração do marcador fluorimétrico das formulações desenvolvidas utilizando como modelo a mucosa vaginal de suínos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Via Vaginal

A vagina é um tubo fibromuscular que mede em torno de 7 a 10 cm que se estende desde o exterior do corpo até o útero. A morfologia do tecido vaginal varia em relação à região anatômica (VALENTA 2005; MALLIPEDDI e ROHAN 2010). A vagina é um complexo sistema dinâmico que contém fluidos que podem exercer função tanto de barreira à entrada de substâncias quanto alvo de entrega de fármacos. Esse órgão possui todos os elementos essenciais para uma resposta imune eficaz e fornece um sistema de defesa inato que não deve ser alterado (MALLIPEDDI e ROHAN 2010).

Esta via representa uma excelente alternativa para administração de fármacos por apresentar vantagens como: (i) grande superfície de contato (ii) boa permeabilidade a muitos fármacos, (iii) elevada irrigação sanguínea, (iv) relativa facilidade de administração do fármaco, (v) evita o metabolismo de primeira passagem que os fármacos sofrem no fígado, (vi) redução da incidência e severidade de efeitos adversos gastrointestinais (BONFERONI et al., 2008; VALENTA 2005; BALOGLU et al., 2009).

Porém, o ambiente hostil da mucosa reduz o tempo de residência de fármacos quando estes são administrados (YEN CU et al., 2011), por haver uma descarga vaginal que envolve fluidos endometriais, secreções das glândulas bortholinas e transudatos através do epitélio, os quais contribuem para a remoção da formulação a partir do local de aplicação. Essa descarga vaginal, muitas vezes conhecida como muco, desempenha um papel importante na capacidade de absorção de fármacos. A composição do muco, o volume e suas propriedades reológicas são afetados com a idade da mulher, fase do ciclo menstrual e com a relação sexual, influenciando assim a liberação do fármaco quando administrado dentro da vagina (VALENTA 2005, VANIC et al., 2013). Tais variações de volume e viscosidade do muco podem afetar a eficácia dos fármacos quando são administrados por essa via. Além disso, a vagina apresenta um pH em entre 3,5 e 4,5 que é mantido pelos lactobacilos que convertem o glicogênio do epitélio em ácido lático (VALENTA et al., 2005; BOSKEY et al., 2001). Alterações do pH do fluido vaginal são fatores limitantes para a administração de fármacos. Por fim, cabe ressaltar que, devido a ação da descarga vaginal (ação de auto-

limpeza da via), o tempo de residência das diferentes formas farmacêuticas de administração é reduzido, a menos que se utilize estratégias para que a formulação seja mantida por um período de tempo prolongado como por exemplo, óvulos, géis, anéis vaginais, comprimidos mucoadesivos, entre outros. Portanto, formulações contendo fármacos para serem aplicados nesta via devem ser capazes de contornar todas essas dificuldades, somando-se à necessidade de uma baixa propensão para causar irritação genital e toxicidade sistêmica (VALENTA 2005, VANIC et al., 2013).

A nanotecnologia pode ser uma estratégia para contornar esse problema, uma vez que o fármaco, quando incorporado em nanoestruturas, pode apresentar uma menor degradação e também uma diminuição dos efeitos adversos (SHAFFAZICK e GUTERRES, 2003; CONTRI et al., 2014). As nanoestruturas, quando incorporadas em polímeros mucoadesivos que aumentam o tempo de permanência do fármaco no local da aplicação, podem auxiliar a liberação controlada ou sustentada do fármaco, além de aumentarem sua absorção (HUSSAIN e AHSAN, 2005; VALENTA, 2005 e RICHARDSON e ILLUM, 1992). No entanto, as partículas podem causar uma ruptura considerável da microestrutura do muco que protege a vagina, e isso consequentemente permite que partículas estranhas, tais como agentes patogênicos e outros nanomateriais potencialmente tóxicos penetrem através da barreira do muco mais facilmente (MCGILL e SMYTH, 2010; WANG et al., 2011). Por esse motivo, aspectos relativos à mucoadesividade desejada ou indesejada têm sido destacados e alvo de pesquisas nos últimos anos.

3.2. Aplicação de fármacos na via vaginal

O interesse pela administração de fármacos através da via vaginal vem crescendo por esta apresentar interessantes propriedades já citadas anteriormente. Esta via pode oferecer uma alternativa favorável à via parenteral para fármacos como bromocriptina e propranolol (VERMESH et al., 1988; JOSONNI et al., 1991; PATEL 1984) e, ainda, pode servir como uma rota adequada para o fornecimento de contraceptivos hormonais, devido à falta de interações medicamentosas observado no trato gastrointestinal (VALENTA 2005). No entanto, apesar de todas essas vantagens, esta via não tem sido extensamente explorada para entrega sistêmica por ser uma via

somente de administração feminina e também por sofrer muitas alterações cíclicas e fisiológicas (VALENTA 2005; PERIOLI et al., 2008). Tradicionalmente, a cavidade vaginal tem sido utilizada apenas para entrega de fármacos com ação local, tais como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, antivirais, agentes espermicidas e esteroides (PERIOLI et al., 2008).

Dois trabalhos de revisão da literatura merecem destaque. Um deles é o trabalho de Cutler e Justman (2008) que realizaram uma revisão da literatura apontando os principais fármacos utilizados nos tratamentos de patologias da via vaginal. De igual forma merece destaque o trabalho de das Neves e colaboradores (2010) que realizaram um levantamento da literatura com todos os sistemas já publicados baseados em nanotecnologia para prevenção e tratamento do HIV.

Como fora explicado anteriormente, na Seção 3.1, o ambiente hostil da mucosa reduz o tempo de residência de fármacos quando estes são administrados (YEN CU et al., 2011). Uma alternativa para aumentar o tempo de contato entre o fármaco e a mucosa vaginal é o desenvolvimento de formulações que apresentem uma maior mucoadesividade tais como géis, filmes e comprimidos. Nesse sentido, trabalhos como os de Valenta e colaboradores (2001) Perioli e colaboradores (2008 e 2009), Fetherston e colaboradores (2013), Villena e colaboradores (2013) abordaram questões relativas a mucoadesividade na via vaginal. Estes trabalhos são detalhados a seguir.

O trabalho de Valenta e colaboradores (2001) descreve uma nova matriz para entrega vaginal de progesterona, produzida através de uma ligação covalente de L-cisteína com um Carbopol comercialmente disponível. Os autores demonstraram uma melhor mucoadesividade desse novo sistema, além de uma liberação controlada do fármaco em comparação com os comprimidos que não possuíam esta matriz proposta.

No trabalho de Perioli e colaboradores (2008) foram produzidos géis de hidroxietilcelulose, combinado com quitosana e com seu derivado 5-metilpirrolidinona. Nesses géis foi incorporado o metronidazol, um fármaco utilizado no tratamento da vaginose bacteriana, e foi comparado com um gel comercial. Os autores observaram que todos os géis contendo quitosana apresentaram melhor desempenho do que o gel comercial. Nesse estudo, concluiu-se que os géis produzidos em combinação com a quitosana apresentaram melhores características em relação a

reologia, mucoadesividade e liberação do fármaco, sugerindo a adequabilidade do uso da quitosana em formulações para via vaginal.

Em outro trabalho também desenvolvido por Perioli e colaboradores (2009), foram desenvolvidos comprimidos vaginais contendo metronidazol. Os comprimidos foram preparados utilizando uma combinação de polímeros mucoadesivos (quitosana, polivinilpirrolidona e policarbofil). Esse trabalho demonstrou que a mistura dos polímeros (quitosana e polivinilpirrolidona) em proporções adequadas (1:1) favorece a compressão dos mesmos e também representa uma alternativa para administração de fármacos por essa via, podendo levar a uma melhor adesão ao tratamento por parte das pacientes.

Fetherston e colaboradores (2013) desenvolveram um anel vaginal de elastomero de silicone do tipo matriz com o objetivo de controlar a liberação de dois anti-retrovirais com diferentes mecanismos de ação na tentativa de aumentar a amplitude de proteção contra o vírus do HIV e limitar o surgimento de cepas resistentes. Diferentes concentrações de dapivirine e maraviroc foram incorporadas nos anéis vaginais e estudos de estabilidade e liberação foram realizados. O anel vaginal contendo 25 mg de dapivirine e 100 mg de maraviroc foi o que demonstrou melhores resultados. O sistema contendo esses fármacos apresentou uma liberação controlada durante 29 dias e também estabilidade frente a variações de umidade e calor durante 2 anos. Esse anel vaginal já se encontra em estudos clínicos de fase I e parece ser promissor na prevenção do HIV.

Por fim, o trabalho de Villena e colaboradores (2013) propôs três diferentes tipos de micropartículas contendo o fármaco nistatina utilizando três polímeros diferentes (quitosana, alginato e Poloxamer 407) para administração vaginal no tratamento da candidíase genital. As micropartículas apresentaram liberação controlada do fármaco e boa mucoadesividade em vagina de porcas. Os autores também demonstraram que esses sistemas apresentaram efeito antifúngico sem apresentarem toxicidade.

3.3 Modelos para o estudo da via vaginal

Alguns modelos animais vem sendo propostos para analisar a absorção de fármacos através da via vaginal (WU e ROBINSON, 1996). Já foram estudados modelos animais utilizando coelhas, cadelas, macacas, ratas e ovelhas. Em muitos desses modelos, o grau de absorção de fármacos variou como consequência da fisiologia e anatomia da vagina e também em virtude das alterações durante o ciclo menstrual. Essas modificações cíclicas na histologia e fisiologia da vagina podem afetar a absorção de fármacos tanto em mulheres como em modelos animais utilizados para estudos de absorção (RICHARDSON e ILLUM, 1992). Poucos estudos comparam as diferentes espécies entre si. HUSSAIN e RITSCHER (1989) estudou a biodisponibilidade do fosfonofato em cães e coelhos. A biodisponibilidade após administração vaginal foi de 14% e 34%, respectivamente, Considerando que a biodisponibilidade após administração tópica foi de 3% e 12%, respectivamente, este resultado pode ser uma indicação de que também as taxas de absorção em mulheres e animais possam ser diferentes.

Contudo, muitos pesquisadores tem utilizado o modelo vaginal suíno para simular a mucoadesividade, penetração e absorção de fármacos através da via vaginal (SANDRI et al., 2004; BONFERONI et al., 2008; PERIOLI et al., 2008; VILLENA 2013). Com base nisso, nesse estudo, foram utilizados modelos suínos para a realização de todos os experimentos.

3.4 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal

Os sistemas de liberação de fármacos vêm recebendo grande atenção devido à necessidade de aperfeiçoar a ação de fármacos no organismo. Dentre esses sistemas destacam-se as micropartículas e os sistemas nanoestruturados, que têm por objetivo controlar a liberação do ativo no organismo e diminuir a incidência de efeitos adversos (COUVREUR et al., 2002). As micropartículas são estruturas de tamanho micrométrico obtidas por microencapsulação do ativo. Estas podem ser divididas em dois tipos: partículas poliméricas esféricas (microesferas) ou reservatórios (microcápsulas), as quais diferem entre si pela composição química. Por outro lado, as

nanopartículas são sistemas carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetro inferior a 1 μm e são utilizadas como vetores para carrear substâncias minimizando os efeitos adversos e a possível toxicidade que substâncias bioativas podem apresentar em tecidos ou órgãos saudáveis (SCHAFFAZICH e GUTERRES 2003 e CONTRI et al., 2014). Ainda, é possível controlar a liberação dessas substâncias e sua disponibilidade para agir, quando associadas às nanopartículas (SOPPIMATH et al., 2001). As nanopartículas por apresentarem um tamanho menor que as micropartículas tem uma maior facilidade de transporem às barreiras e penetrarem mais facilmente em tecidos (TORCHELIN 2000).

O termo nanopartícula inclui as nanoemulsões e também nanopartículas poliméricas e lipídicas. As nanopartículas constituem um sistema de entrega de fármaco versátil, devido à sua capacidade de superar as barreiras fisiológicas e direcionar o fármaco para as células específicas ou para compartimentos intracelulares por diferentes mecanismos (MALLIPEDDI e ROHAN 2010). Dentre as nanopartículas de caráter lipídico encontram-se as nanopartículas lipídicas que são nanoestruturas capazes de veicular substâncias ativas, tendo sua maior aplicação em formulações de uso tópico (FANG et al., 2008). Há a presença de um lipídio sólido ao invés de um óleo em sua composição química com o objetivo de diminuir a mobilidade do ativo no lipídio, aumentando assim o controle de liberação do mesmo. Além disso, esse tipo de estrutura apresenta uma matriz polimérica constituída por lipídios fisiológicos, o que diminui o risco de toxicidade dos mesmos (MEHNERT e MÄDER, 2001).

As nanopartículas poliméricas são representadas pelas nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, que pode adsorver ou reter o fármaco. Elas não apresentam núcleo oleoso em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica. As nanocápsulas, por sua vez, são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo a substância ativa estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica. Neste caso, é fundamental que tanto o óleo quanto a água sejam não solventes para o polímero. (SCHAFFAZICH et al, 2003). Quando a substância ativa é associada às nanopartículas é possível controlar sua liberação e a disponibilidade para exercer sua ação

(SOPPIMATH et al., 2001) assim podendo apresentar uma maior eficácia terapêutica. Um dos principais objetivos desse tipo de formulação é manter a concentração do fármaco acima da dose subterapêutica e abaixo da concentração tóxica, por um tempo prolongado (TEDESCO et. al., 2007).

Por ser uma via ainda pouco explorada para administração de fármacos no que diz respeito à pesquisa, os artigos que estudam a via vaginal e o uso da nanotecnologia na mesma são poucos e recentes. Alguns tipos de nanopartículas foram pesquisadas como veículos para melhorar a entrega de fármacos na via vaginal. Estas nanopartículas podem ser geralmente classificadas como poliméricas (sintéticas e naturais), inorgânicas ou nanopartículas lipídicas sólidas (VANIC et al., 2013). Dentre as nanopartículas poliméricas já desenvolvidas para aplicação vaginal, destaca-se, por exemplo, o trabalho de das Neves e colaboradores (2012) que desenvolveram nanopartículas de poly(ϵ -caprolactona) e encapsularam o antiretroviral dapivirine. Os resultados demonstraram a potencialidade dessas nanopartículas de entregarem o fármaco em um local específico, além do controle da liberação do mesmo. Por sua vez, Ham e colaboradores (2009) desenvolveram uma formulação de nanopartículas de ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) contendo o PCS-RANTES (um modulador que reduz a expressão de CCR5 na superfície da célula), como um método para prevenir a transmissão sexual de HIV-1. Nesse estudo, as nanopartículas produzidas não apresentaram efeito tóxico e aumentaram a entrega de PCR-RANTES para os tecidos de forma controlada.

O trabalho de Cu e colaboradores (2011) demonstraram que nanopartículas com superfície modificada tem uma melhor capacidade de transpor as barreiras de muco e entregarem mais facilmente fármacos dentro da mucosa vaginal. Os veículos propostos podem facilitar a entrada de siRNA e plasmídeo de DNA dentro das células. Recentemente, Santos e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas contendo o fármaco clotrimazol utilizando como polímero o Eudragit[®] RS100. Os autores mostraram através de um estudo microbiológico que as nanocápsulas mantiveram atividade antifúngica do clotrimazol contra espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol e mostraram a potencialidade das nanocápsulas para entrega de fármacos em candidíase vulvovaginal.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) foram propostas como uma alternativa às nanopartículas poliméricas. Elas são partículas de tamanho nanométrico, esféricas e são constituídas de lípideos sólidos e emulsionantes. Essas nanopartículas também tem potencial para transportarem fármacos para via vaginal como demonstra o trabalho de Alukda e colaboradores (2011) que incorporaram tenofovir em SLN para ser administrado na via vaginal como uso tópico. Os autores observaram o potencial das SLN de melhorar a absorção celular de tenofovir e, assim, impossibilitando a propagação do vírus durante o processo de infecção por HIV, possivelmente levando a uma prevenção mais eficaz da transmissão da doença.

Niossomas são vesículas que não contém fosfolipídeos, são compostos por tensoativos não iônicos como por exemplo polioxietileno glicóis. Embora sua morfologia seja semelhante a dos lipossomas, estruturalmente são diferentes. Os niossomas também tem sido alvo de pesquisas como veículo para entrega de fármacos na via vaginal objetivando uma liberação sustentada e direcionada do fármaco (SANKHYAN e PAWAR, 2012). Ning e colaboradores (2005) relataram a incorporação de clotrimazol em um gel niosomal e observaram liberação prolongada do fármaco e adequada atividade antifúngica. Niossomas também foram relatados como promissores para aplicação tópica vaginal em um gel contendo o fármaco tenofovir que demonstrou não ser irritante em mucosa vaginal de ratas (PATEL e PATEL, 2011).

As nanoemulsões apresentam características interessantes para entrega de fármacos na via vaginal. Elas podem ser obtidas de forma simples (emulsificação), apresentam estabilidade por um longo período e são capazes de solubilizar diversos fármacos destinados a via vaginal (TADROS et al., 2004). Embora muitas vezes descritas como microemulsões na literatura, parece ser mais apropriado se referir a esses sistemas como nanoemulsões porque o tamanho das partículas normalmente é inferior a 200 nm (VANIC et al., 2013). Um estudo realizado por Bachhav e Patravale (2009) comparou nanoemulsões contendo o fármaco antifúngico clotrimazol com um gel comercial contendo o mesmo fármaco. Os autores demonstraram que o gel contendo a nanoemulsão apresentou maior atividade antifúngica do que o gel comercial. Outros autores também desenvolveram um gel contendo microemulsão com nonoxinol-9 no

contexto contraceptivo e compararam com uma formulação disponível no mercado. O gel desenvolvido pelos autores se mostrou mais eficaz que o gel comercial e, além disso, não causou irritação nem toxicidade local ou sistêmica, demonstrando ser seguro (D'CRUZ et al., 2001).

Adicionalmente, as vantagens fornecidas pela nanotecnologia vem sendo alvo de pesquisas para entrega de fármacos na via vaginal e vem demonstrando ser promissora como demonstra os trabalhos de diversos autores (CU et al., 2011; SANTOS et al., 2013; VANIC et al., 2013; VILLENA et al., 2013).

3.5 Quitosana

Há um grande e crescente interesse por parte dos pesquisadores, sobretudo da área farmacêutica, em relação à quitosana (Figura 2). Trata-se do único polímero pseudonatural catiônico, que consiste de glucosamina e unidades de N-acetilglucosamina. É, sobretudo, obtido por desacetilação de quitina derivada do exoesqueleto de crustáceos, tais como camarão e lagosta (NASTI et al., 2009). Esse polímero é considerado um biomaterial atóxico, apresentando biocompatibilidade, biodegradabilidade (SINGLA e CHAWLA 2001). Além disso, apresenta propriedades físico-químicas e biológicas como formação de filme sobre pele e mucosas, boas propriedades de fluxo, bioadesividade, inocuidade e atividade antibacteriana (ALEMDAROGLU et al., 2006; HAMIDI et al., 2008; ZHANG e KAWAKAMI, 2010).

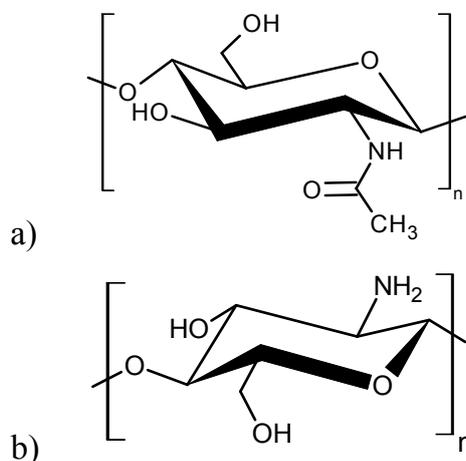


Figura 2 Estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b)

Como um adjuvante farmacêutico, a quitosana tem sido utilizada em diferentes formulações, como pós, comprimidos, emulsões e géis. Além disso, a quitosana garante uma liberação controlada de fármacos (ILLUM 1998; DODANE e VILIVALAM 1998). Esse polímero também apresenta propriedades mucoadesivas e atividade antimicrobiana (LUEBEN et al., 1996; KIM et al., 2003) o que o torna uma alternativa interessante para aplicação de formulações na via vaginal. Por ser de origem natural, a quitosana também apresenta biocompatibilidade e segurança comprovada. A presença de grupamentos OH e NH em sua estrutura pode dar origem a ligação de hidrogênio e garantir uma boa mucoadesividade em formulações (PEPPAS e BURY 1995; ROBINSON e MLYNEK 1995).

Hidrogéis de quitosana são obtidos através da interligação entre as cadeias desse biopolímero. Estes apresentam diversas aplicações na área farmacêutica para diferentes vias de administração, como liberação controlada de fármacos através da via oral e aplicação de fármacos sobre a pele e mucosas (RINAUDO, 2006; BERGER et al., 2004a, BERGER et al.; 2004b). Quando aplicada em tecidos e mucosas, a quitosana é capaz de permanecer mais tempo no local em contato com o ferimento, uma vez que esta possui propriedade mucoadesiva (PERIOLI et al., 2008).

Nanopartículas lipídicas sólidas (SOUTO et al., 2004), lipossomas (RUÉLGARIÉPY et al., 2002), niossomas (LAKSHMI et al., 2007) e nanocápsulas poliméricas (CONTRI et al., 2010) já foram incorporados em hidrogéis de quitosana. A incorporação de sistemas nanoestruturados em hidrogel de quitosana é promissora, pois representa a união de dois sistemas diferentes com características específicas e complementares para a veiculação de fármacos, como previamente descrito por Contrí et al., (2010). O hidrogel de quitosana apresenta biocompatibilidade com a pele e mucosas, biodegradabilidade e mucoadesividade, além de formação de filme que permite uma liberação homogênea do fármaco, evitando perda do mesmo. Por sua vez, as nanocápsulas garantem uma liberação controlada e prolongada e também proteção do fármaco frente à degradação (SHAFFAZICK e GUTERRES, 2003; VALENTA e AUNER, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial do uso da quitosana como um veículo para entrega de fármacos na via vaginal. Por exemplo o estudo realizado por

El-Kamel e colaboradores (2002) demonstraram a possibilidade do uso da quitosana em misturas de diferentes proporções com polímeros aniônicos para a preparação de comprimidos mucoadesivos a serem usados como sistema de liberação vaginal para metronidazol.

Um estudo realizado por Sandri e colaboradores (2004) demonstrou que alguns derivados de quitosana possuem diferentes propriedades de mucoadesividade e penetração. O aciclovir foi utilizado como fármaco para realização dos estudos *in vitro*, em mucosa vaginal e mucosa bucal de suínos. Os autores concluíram que dentre os quatro derivados de quitosana testados, o derivado metilpirrolidona apresenta melhores propriedades mucoadesivas e melhores propriedades de penetração em ambas as mucosas. Por sua vez, o trabalho de Kast e colaboradores (2002) demonstrou que a quitosana modificada com ácido tioglicólico (TGA) tem uma melhor adesividade do que somente a quitosana. Bonferoni e colaboradores (2008) avaliaram gel de quitosana de concentração de 3% como um veículo alternativo para administração de fármacos através da via vaginal. No trabalho de Tugcu-Demoroz e colaboradores (2013) os autores prepararam géis com os polímeros hidroxietilcelulose, poloxamer 407 e quitosana com o fármaco oxibutinina a fim de melhorar a mucoadesividade e o tempo de ação de comprimidos já existentes no mercado. Porém o gel que mostrou melhores propriedades de viscosidade, mucoadesividade e permeabilidade foi o composto com hidroxietilcelulose. Estudos de biodisponibilidade relativa foram realizados em coelhas e mostraram que valores mais elevados de AUC foram obtidos para o gel de hidroxietilcelulose. Resumindo, todos os trabalhos citados acima demonstram o potencial uso da quitosana para entrega de fármacos na via vaginal, sobretudo os trabalhos enfocam a boa adesividade que esse polímero apresenta quando em contato com a mucosa.

Abruzzo e colaboradores (2013) prepararam complexos de quitosana e alginato em diferentes proporções a fim de serem avaliados para entrega de clorexidina. Testes de absorção de água, mucoadesividade, bem como testes microbiológicos com microorganismos patogênicos vaginais foram realizados. Os resultados mostraram que a seleção do complexo quitosana/alginato com a proporção adequada (1:9) apresentou capacidade de hidratação, adesão à mucosa e liberação de clorexidina. O complexo

também apresentou boa atividade antimicrobiana para patógenos de *Candida albicans* e *Escherichia coli*.

O desempenho da maioria dos fármacos poderia ser melhorado utilizando transportadores bioadesivos que fornecem prolongado tempo de contato entre o sistema polimérico e a camada superficial da mucosa (BALOGLU et al., 2009), assim como uma liberação controlada de fármacos. Nesse sentido, a nanoencapsulação de um modelo de fármaco lipofílico como o vermelho do nilo, bem como sua posterior incorporação em um hidrogel de quitosana, poderia levar a uma liberação controlada do fármaco, uma diminuição dos efeitos secundários provocados por algumas formulações comerciais e, ainda, aumento do tempo de contato entre a formulação e a mucosa.

Considerando as características acima expostas, destaca-se a relevância e inovação dos objetivos propostos no presente trabalho, uma vez que se propõe desenvolver uma nova formulação contendo um marcador fluorimétrico utilizando a nanotecnologia, sendo incorporado no hidrogel de quitosana a fim de melhorar o seu desempenho. Além disso, outra contribuição deste trabalho é a avaliação da aplicação da formulação proposta em uma área específica, isto é na via vaginal e avaliar se há influência da carga de superfície do nanocarreador sobre as respostas avaliadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Na presente seção, são apresentados os materiais e métodos utilizados para atender ao objetivo principal deste trabalho, o qual consiste em desenvolver suspensões de nanocápsulas com polímeros catiônico ou aniônico contendo o vermelho do nilo como modelo de fármaco lipofílico, para sua incorporação em hidrogéis de quitosana visando a aplicação na via vaginal. Estudos de reologia dos diferentes hidrogéis, mucoadesividade, lavabilidade e penetração foram desenvolvidos utilizando mucosa vaginal suína visando avaliar a aplicabilidade da formulação proposta.

4.1 Materiais

A quitosana de peso médio molecular (1136 kDa) e 92% desacetilada, o ácido láctico 90%, o marcador fluorimétrico Vermelho do Nilo, o polissorbato 80, o monoestearato de sorbitano 60 e a acetona (grau analítico) foram obtidos da Sigma Aldrich (Milan, Italy). Os triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Miglyol 812) e os Eudragit® (S100 e RS100) foram cedidos pela Sasol (Milan, Italy) e Evonik (Essen, Germany), respectivamente. O acetato isopentila foi obtido de Carlo Erba (Milan, Italy).

4.2 Produção das nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado proposto por Fessi e colaboradores (1989) utilizando o Eudragit® RS 100 ou Eudragit® S 100 como polímeros, triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico como núcleo oleoso, polissorbato 80 como estabilizador e vermelho do Nilo como modelo de fármaco lipofílico. Foi utilizado monoestearato de sorbitano para a produção das nanocápsulas composta pelo polímero Eudragit® S 100 na fase orgânica. As nanocápsulas produzidas com os diferentes polímeros contendo o vermelho do nilo foram nomeadas NC-RS-NR (preparadas com Eudragit®RS 100) e NC-S-NR (preparadas com Eudragit®S100). Da mesma forma, as suspensões de nanocápsulas sem o marcador fluorescente foram produzidas como controles e nomeadas como NC-RS e NC-S. A Tabela 1 apresenta a composição química das nanocápsulas produzidas nesse trabalho.

Tabela 1 Composição química das nanocápsulas poliméricas.

FASE ORGÂNICA		FASE AQUOSA	
Monoestearato de sorbitano**	76 mg	Polissorbato 80	76 mg
Triglicerídeo ác. cáprico/caprílico	330µg	Água*	53,0 mL
Vermelho do nilo	0.825 mg		
Eudragit RS [®] 100 ou S [®] 100	100 mg		
Acetona*	27,0 mL		

*Volumes utilizados para uma formulação de volume final de 10 mL

** Utilizado somente para a formulação composta com o polímero Eudragit S[®] 100

4.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas poliméricas

4.3.1 Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão das formulações

As formulações foram analisadas quanto ao seu diâmetro e índice de polidispersão (PDI), determinados através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em água filtrada em filtro 0,45 µm Millipore. Os resultados representam a média dos diâmetros das formulações realizados em triplicata.

4.3.2 Tamanho de partícula e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula também foram determinados através da técnica de difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern). Para essa determinação, foi utilizado como parâmetro o índice de refração do Eudragit RS[®] 100 (1,38) ou do Eudragit[®] S 100 (1,39) e um espectro de leitura compreendido entre 0,02 – 2000 µm. O diâmetro médio baseado no número ($d_{4,3}$) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho das partículas. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 50% da distribuição acumulada ($d_{0,5}$) também foram realizadas. Também foi determinado o *span*, para essas formulações, definido como uma medida da dispersão granulométrica que relaciona valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10%, 50% e 90% respectivamente, da distribuição acumulada para uma amostra, sendo estes valores calculados pela Equação 1 (CHEN e DAVIS, 2002):

$$span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (1)$$

4.3.3 Determinação do diâmetro por rastreamento de nanopartículas

As formulações também foram analisadas em relação ao seu diâmetro pela técnica de rastreamento de partículas em Nanosight (Nanosight[®] LM10–NanoSight – Amesbury, Reino Unido). Para essa técnica, a amostra foi diluída 10.000 vezes em água ultrapura e, então, se procedeu à leitura.

4.3.4 Potencial zeta das partículas

O potencial zeta das formulações foi obtido através da medida da mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm Millipore. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

4.3.5 pH das suspensões das nanocápsulas poliméricas

A análise de pH das suspensões foi realizada utilizando-se potenciômetro previamente calibrado com tampão 4,0 e 7,0. A medida foi realizada diretamente nas suspensões. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

4.4 Produção dos hidrogéis de quitosana e estudo da concentração ótima de quitosana

Primeiramente foram preparadas diferentes formulações com diferentes concentrações de quitosana (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% p/p), a fim de determinar qual apresentava melhores características para aplicação vaginal. Os hidrogéis foram preparados pelo método manual, homogeneizando a quitosana com água ultrapura ou diretamente com a suspensão de nanocápsulas (10 mL) com ou sem vermelho do Nilo e posterior adição do ácido láctico (115 µL) para a produção de 10 gramas do hidrogel. As formulações foram nomeadas por CH-RS (hidrogel de quitosana contendo suspensão de nanocápsulas com o polímero Eugradit[®] RS 100), CH-S (hidrogel de quitosana contendo suspensão de nanocápsulas com o polímero Eugradit[®]S 100), e CH (hidrogel de quitosana preparado com água ultrapura).

Após análise visual, análise de pH e análise da reologia de todos os hidrogéis, elegeu-se o que apresentou melhores características sobretudo reológicas para aplicação em mucosa vaginal, a saber o de concentração 2.5% e, então, nesse hidrogel foram incorporadas nanocápsulas contendo vermelho do nilo. Os hidrogéis foram nomeados como CH-RS-NR (hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 incorporadas com vermelho do nilo) e CH-S-NR (hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas de Eudragit[®] S100 incorporadas com vermelho do nilo). Para o hidrogel obtido com água (CH-NR) sem a presença de nanocápsulas, foram adicionados 330 µL de uma solução estoque de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (2.5 mg/mL) durante a produção dessa formulação para uma quantidade final de 10 g de formulação. Portanto, todos os hidrogéis possuíam a mesma concentração de vermelho do Nilo (0.0825 mg/g). A Tabela 2 mostra todos os hidrogéis produzidos e suas composições.

Tabela 2 Hidrogéis de quitosana obtidos.

Hidrogéis de quitosana	Quitosana	Ácido Lático	Suspensão de Nanocapsulas (Eudragit RS100 [®])	Suspensão de Nanocapsulas (Eudragit S100 [®])	Água ultrapura	Vermelho do Nilo
CH	X	X			X	
CH-RS	X	X	X			
CH-S	X	X		X		
CH-NR	X	X			X	X
CH-RS-NR	X	X	X			X
CH-S-NR	X	X		X		X

4.5 Caracterização dos hidrogéis de quitosana

Os hidrogéis com concentrações crescentes de quitosana (1,5 a 3,0%, p/p) foram avaliados em termos de pH e propriedades reológicas a fim de eleger o que apresentava características mais adequadas à aplicação na via vaginal. O valor de pH foi medido em potenciômetro (B474, Micronal) após diluição da formulação em água ultrapura (1:10 p/v).

Cada formulação foi analisada em um reometro rotacional (Rheostress 600, Haake, Enco, Spinea, I) a 25°C e a 37°C utilizando-se como sistema de medição uma combinação placa cone (C35/1:35 mm de diâmetro e 1° de ângulo). As medidas reológicas foram realizadas após um tempo de 3 minutos em que a formulação esteve

em contato com o cone. A viscosidade aparente foi determinada a 200 s^{-1} . Análises da reologia oscilatória também foram determinadas a 25°C e as respostas viscoelásticas dos hidrogéis foram registradas e expressas pelo G' módulo elástico e G'' módulo viscoso. G' e G'' foram avaliados a uma frequência de 10 Hz e então foi determinada a tangente ($\text{tg}\delta$).

4.6 Estudos *in vitro* com mucosa vaginal de suínos

Após a escolha da melhor formulação, os hidrogéis contendo nanocápsulas com vermelho do Nilo ou nanocápsulas brancas foram analisados em termos de mucoadesão, lavabilidade e penetração em mucosa vaginal. Para estes estudos, foi utilizado como modelo de aplicação a mucosa vaginal de suínos, obtida de um frigorífico da região de Pavia, Itália. Para o experimento de mucoadesividade foram utilizadas mucosas vaginais que foram previamente congeladas a -20°C durante 24 h antes do experimento, conforme protocolo do laboratório di Scienze del Farmaco. Para as análises de lavabilidade e penetração foram utilizadas mucosas frescas recém obtidas do frigorífico afim de manter as propriedades e viabilidade do tecido.

4.6.1 Análise da mucoadesão

As formulações (CH, CH-RS e CH-S) foram utilizadas para análise da mucoadesão através do equipamento (TA.XTplus Texture Analyzer, Stable Microsystem, Godalming, UK) que mede a tensão de tração das formulações. Esse equipamento foi equipado com uma célula de 1 kg juntamente com um sistema de medição A/MUC. Esse sistema consiste de uma sonda e um suporte, ambos feitos de teflon. O suporte consiste em dois cilindros: a parte inferior serve como uma base para o substrato biológico, enquanto que a parte superior apresenta um orifício circular no centro ($\text{Ø} 14 \text{ mm}$), o que permite o movimento no interior da sonda.

Cada uma das amostras de mucosa foi previamente umedecida com $40 \mu\text{l}$ de tampão de acetato de pH 4,5 para simular o meio vaginal. Uma massa de 100 mg de cada formulação foi pesada sobre um disco de papel de filtro bioadesivo ($\text{Ø} 10 \text{ mm}$) e fixada em uma sonda cilíndrica. Posteriormente, a sonda cilíndrica foi colocada em contato com a mucosa mediante a aplicação de uma força determinada de 2500 mN

durante um tempo de 3 min. Em seguida, a sonda foi levantada a uma velocidade de 2,5 mm/min até a separação completa da formulação com a mucosa.

Os parâmetros experimentais foram escolhidos de modo a permitir resultados precisos e reprodutíveis, bem como uma melhor diferenciação entre as formulações. Em virtude disso, a escolha foi realizada com base em ensaios preliminares, utilizando-se diferentes valores de taxa de desprendimento e de força de deslocamento. A força de descolamento (mN) e a força de desprendimento como uma função da distância de separação percorrida até alcançar o desprendimento [trabalho da adesão (mN.mm)] foram determinadas para todas as formulações.

4.6.2 *Análise da lavabilidade*

As formulações (CH-NR, CH-RS-NR e CH-S-NR) foram analisadas para o ensaio de lavabilidade através de uma célula de Franz modificada (Permeager, Bethlehem, PA, USA) conforme descrito por Bonferoni e colaboradores (1999) e Rossi e colaboradores (1999). Na câmara doadora, uma corrente de solução tampão (pH 4,5) foi passada entre dois orifícios. O fluxo foi fixado em 0,2 ml/min, utilizando uma bomba de HPLC (Mod. 420, Kontron Instruments, Milão, I). A solução tampão foi coletada de um erlenmeyer que era mantido sob agitação constante a 37°C. A mucosa vaginal foi fixada em uma membrana e coberta com parafilme (impermeável a líquidos) e dividida pelo compartimento doador e receptor de uma célula de Franz. Cada formulação (100 mg) foi espalhada sobre a mucosa vaginal; a solução tampão pH 4,5 foi utilizada como meio de lavagem a 37°C durante o experimento para simular a ação de remoção do fluido vaginal. A solução tampão da câmara doadora foi coletada em diferentes recipientes a cada hora durante 6 horas de experimento. Os recipientes foram congelados e o conteúdo foi liofilizado durante 24 horas (Heto Secar, Analytical De Mori, Milão, Itália). Depois disso, cada sedimento foi resuspenso em 500 µl de acetona para solubilizar os polímeros Eudragit® RS 100 e S100. As amostras foram, em seguida, diluídas com acetato de amila a uma concentração apropriada. Cada amostra contendo o marcador vermelho do nilo foi analisado pelo método de fluorescência. Comprimentos de onda de excitação e emissão foram

aplicados 517 nm e 587 nm, respectivamente. O método se mostrou linear na faixa de 6,25-100 ng/ml com R^2 superiores a 0,9995.

Após os ensaios de lavabilidade, os tecidos vaginais foram lavados duas vezes em solução salina para eliminar os resíduos de amostras e foram congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram processadas para avaliar o valor de NR penetrado no tecido, como uma função da profundidade do tecido.

4.7 Penetração do vermelho do Nilo em mucosa vaginal

Um criostato (Leica CM1510, Leica Microsystem S.p.A., Milan, I) foi utilizado para cortar as fatias horizontais de 50 μm de espessura. Quatro fatias foram coletadas em microtubos Eppendorf. A quantidade de NR que havia penetrado nas diferentes fatias foi extraída pela adição de 300 μl de acetato de isoamilo e 50 μl de acetona. As amostras foram mantidas sob agitação durante 15 minutos a temperatura ambiente e submetida a centrifugação para separar os resíduos de tecido a partir do sobrenadante. Uma curva de linearidade foi elaborada no processamento das amostras, como mencionado anteriormente. O método foi linear na faixa de 6,25-100 ng/ml com R^2 sempre superiores a 0,9995.

4.7.1 Microscopia confocal (CLSM): análise da penetração do vermelho do Nilo em mucosa vaginal

Tecidos da mucosa vaginal, submetidos ao experimento de lavabilidade foram submetidos duas vezes à lavagem com solução salina e congelados em nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram armazenadas a -80°C durante 48 horas até a análise.

O vermelho do Nilo internalizado nos tecidos vaginais foi analisado por meio de um microscópio confocal. Cada amostra da vagina congelada foi cortada perpendicularmente à superfície da mucosa, em fatias de 25 μm de espessuras utilizando o criostato (temperatura de trabalho à -20°C). Após a deposição em lâmina de microscópio cada fatia foi desidratada durante 12h e mergulhadas em acetona para a fixação. Os núcleos presentes nas fatias de tecido foram corados utilizando DAPI (Sigma) a uma diluição de 1:100.000. As lâminas de microscópio que continham as

fatias de tecido foram mergulhadas em solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato), durante 2 minutos e lavadas em tampão fosfato a pH 7,4 para eliminar o excesso de coloração que não reagiu com o DNA.

Após a secagem das fatias de tecido à temperatura ambiente durante 12 horas, o álcool de PVA-DABCO foi espalhado em lâmina de microscópio e uma tampa de vidro foi aplicado. A análise foi realizada por CLSM utilizando $\lambda_{ex} = 549$ nm e $\lambda_{em} = 628$ nm para a visualização de vermelho do nilo e $\lambda_{ex} = 340$ nm e $\lambda_{em} = 488$ nm para a visualização de DAPI. As imagens obtidas foram processadas por meio de um software específico (Leica Microsystem[®]).

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos nos diversos experimentos foram analisados estatisticamente por meio do teste de análise de variância (ANOVA), que permite identificar a existência (ou não) de diferenças significativas entre as médias dos valores observados em um conjunto de amostra. O nível de significância utilizado foi $\alpha=0.05$. Quando identificadas diferenças significativas ($\alpha \leq 0.05$) para as análises experimentais realizadas, aplicou-se a comparação múltipla de médias para identificar quais os grupos de médias que diferem estatisticamente dos demais. Para tanto, foi utilizado o teste *pos-hoc* de Tuckey ($\alpha = 0.05$). Todas as análises estatísticas foram efetuadas com ajuda do software SPSS 17.0[®].

4.9 Gerenciamento de resíduos

Todos os resíduos químicos gerados durante a preparação e caracterização das nanopartículas poliméricas foram devidamente armazenados em bombonas plásticas e/ou frascos de vidro âmbar com bocal largo. Os mesmos foram identificados e acondicionados de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As páginas a seguir (p.51-63) foram suprimidas em virtude dos resultados terem sido aceitos para publicação no International Journal of Nanomedicine, atendendo a Resolução nº 002/2011 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, visando preservar os direitos de publicação das editoras de periódicos científicos.

6 CONCLUSÕES

As suspensões de nanocápsulas poliméricas catiônicas e aniônicas encapsulando o vermelho do Nilo, como modelo de fármaco lipofílico, desenvolvidas no presente trabalho, apresentaram valores de diâmetro de partícula, span, índice de polidispersão, potencial zeta e pH de acordo com as características de um sistema nanométrico.

Hidrogéis de quitosana de diferentes concentrações foram desenvolvidos e o hidrogel de concentração 2,5% (p/p) foi o que se mostrou mais adequado para entrega do vermelho do Nilo em mucosa vaginal. O hidrogel com nanocápsulas apresentou uma maior adesão à mucosa vaginal, o que está relacionado a uma maior contribuição da propriedade viscosa sobre as propriedades elásticas.

Em relação à penetração das formulações em mucosa vaginal, os resultados indicaram que uma maior quantidade de vermelho do Nilo penetra na mucosa quando é esse é nanoencapsulado, especialmente quando as nanocápsulas apresentam carga positiva na sua superfície, o que provavelmente leva a uma interação eletrostática com o tecido vaginal carregado negativamente.

Como contribuição, destaca-se que este trabalho mostra a aplicabilidade da formulação proposta, composta de hidrogel de quitosana e nanocápsulas poliméricas, para a administração na via vaginal, o que permite aumentar a quantidade de fármacos lipofílicos que penetram no tecido, o que poderia acarretar em um maior efeito do mesmo. Assim sendo, este trabalho além de comprovar a potencialidade do sistema inovador desenvolvido, abre possibilidades interessantes de continuidade. Especificamente, destaca-se a necessidade de avançar em futuras pesquisas com estudos relacionados à forma como as nanocápsulas penetram na mucosa vaginal, a avaliação do tipo de interação que ocorre entre as nanocápsulas e a mucosa vaginal, bem como na aplicabilidade terapêutica, através da encapsulação de fármaco específico para terapia pela via vaginal.

REFERÊNCIAS

ABRUZZO A., BIGUCCI F., CERCHIARA T., SALADINI B., GALLUCCI M. C., CRUCIANI F., VITALI B., LUPPI B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. **Carbohydrate Polymers** v.91, p.651–658, 2013.

ALUKDA, D., STURGIS, T., YOUAN, B.-B.C. Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. **J. Pharm. Sci.** v.100, p. 3345–3356, 2011.

BACHHAV, Y.G., PATRAVALE, V.B. Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, in vitro evaluation and stability studies. **AAPS Pharm Sci Tech.** v.10, p.476–481, 2009.

BALOGLU E., SENYGIT Z. A., KARAVANA S. Y., SCHURCH A. B. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems. **Journal Pharmaceutical Sciences** v.12, p.312-336, 2009

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.57, p.19-34, 2004a.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.57, p.35-52, 2004b.

BONFERONI M. C., ROSSI S., FERRARI F., CARAMELLA C. A modified Franz diffusion cell for simultaneous assessment of drug release and washability of mucoadhesive gels. **Pharm Dev Technol.** v.1, p.45-53, 1999.

BONFERONI M. C., SANDRI G., ROSSI S., FERRARI F., GIBIN S., CARAMELLA C. Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery Evaluation of penetration

enhancement and peptidase inhibition properties. **Pharmaceutical sciences** v.33 p.166-176, 2008.

BOSKEY E. R., CONE R. A., WHALEY K. J., MOENCH D. R. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Hum. Reprod.** v. 16 p.1809– 1813, 2001.

CONTRI, R. V., FRANK, L. A., KAISER, M., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine (Online)**, v.9 p.951-962, 2014.

CONTRI R. V., KAISER M., POLETTI F. S., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v.11, p.2398-2406, 2011.

CONTRI R. V., KATZER T., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery. **Soft Matter** v.8, p.370-385, 2010.

CONTRI R. V., SOARES R. M. D., SILVEIRA N. P., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. Development of chitosan hydrogels containing nanocapsules and characterization by oscillatory rheology. **Proceedings of the XII International Macromolecular Colloquium**, SeteSeptember 07-10; Gramado, Brazil, 2010.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems.** v.19, p.99–134, 2002.

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

CU Y., SALTZMAN M. W. Stealth particles give mucus the slip. **Nature materials** v.8 p. 11-13, 2009.

CUTLER, B., JUSTMAN, J. Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. **Lancet Infect. Dis.** v.8 p.685–697, 2008.

DAS NEVES, J. das, AMIJI, M.M., BAHIA, M.F., SARMENTO, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.62 p.458–477, 2010.

DAS NEVES, J., MICHIELS, J., ARIËN, K.K., VANHAM, G., AMIJI, M., BAHIA, M.F., SARMENTO, B. Polymeric nanoparticles affect the intracellular delivery, antiretroviral activity and cytotoxicity of the microbicide drug candidate dapivirine. **Pharm. Res.** v.29 p.1468–1484, 2012.

D'CRUZ, O.J., UCKUN, F.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception** v. 64, p.113–123, 2001.

DODANE V., VILIVALAM V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharm. Sci. Technol. Today** v.1, p.246–253, 1998.

FANG, J.Y.; FANG, C.L.; LIU, C.H.; SU, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.70, p.633-640, 2008.

FESSI H., PUISILUX F., DEVISSAGUET J. P., AMMOURY N., BENTA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of pharmaceutics** v.55, p.R1-R4, 1989.

FETHERSTON S. M., BOYD P., MCCOY C. F., MCBRIDE M. C., EDWARDS K. L., AMPOFO S., MALCOLM R. K. A Silicone elastomer vaginal ring for HIV prevention containing two microbicides with different mechanisms of action. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.48, p.406–415, 2013.

HAM A. S., COST M. R., SASSI A. B., DEZZUTTI C. S., LISA ROHAN C. Targeted Delivery of PSC-RANTES for HIV-1 Prevention using Biodegradable Nanoparticles. **Pharmaceutical Research** v. 26 (3) p.502-511, 2009.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEL, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v.60 (15), p.1638-49, 2008.

HIN, T.S. Engineering Materials for Biomedical Applications. **Singapore: World Scientific Publishing Company**. p 352. 2004.

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

ILLUM L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharm. Res.** v.15, n.9, p.1326-1331, 1998.

JASONNI V. M., RAFFELLI R., MARCH A., FRANK G., FLAMIGNI C., Vaginal bromocriptine in hyperprolactinemic patients and puerperal women, **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** p. 493-495, 1991.

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

LAKSHIMI, P.K.; DEVI, G.S.; BHASKARAN, S.; SACCHIDANAND, S. Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: phase I and phase II studies. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.** v.3, p.157-161, 2007.

LARA H. H., NUÑEZ N.V., TURRENT L I., PADILLA, C. R. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **J. Nanobiotechnol.** v.8, n.1, p.2-10, 2010.

LIN, C-C. ; METTERS, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.58, p.1379-1408, 2006.

MALLIPEDDI R., ROHAN L. C. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. **Expert Opin. Drug Deliv.** 7(1) p.37-48, 2010.

MCGILL, S.L., SMYTH, H.D.C. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol. Pharm.* v.7, p.2280–2288, 2010.

MEHNERT, W.; MÄDER, K.; Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p. 165-196, 2001.

NASTI, A., ZAKI, N.M., de LEONARDIS, P., UNGPHAIBOON, S., SANSONGSAK, P., RIMOLI, M.G., TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharm Res.** 26, p. 1918–1930, 2009.

NING, M., GUO, Y., PAN, H., CHEN, X., GU, Z., Preparation, in vitro and in vivo evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.31, p.375–383, 2005.

RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers** v.46(1) p.1-27, 2000.

RUEL-GARIÉPY, E.; LECLAIRB, G.; HILDGENB, P.; GUPTAC, A.; LEROUX, J-C.; Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. **Journal of Controlled Release** v.82, p.373-383, 2002.

SANTOS S. S., LORENZONI A., FERREIRA L. M., MATTIAZZI J., ADAMS A. I. H., DENARDI B., ALVES S. H., SCHAFFAZICK S. R., CRUZ L. Clotrimazole-loaded Eudragit RS 100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C** v.33, p.1389-1394, 2013.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation in hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.58, p.83-90, 2004.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKANI, A R.; RUDZINSKI, W.E.

Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release** v.70, p.1-20, 2001

PATEL, L. G. Propanolol concentration in plasma after insertion into the vagina. **Br. Med. J.** v.287, p.1247–1248, 1984.

PATEL, G.M., PATEL, P.V. Novel vaginal anti-HIV drug delivery system of tenofovir disoproxil fumarate. **Am. J. PharmTech Res.** v. 1, p.366–383, 2011.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; VENEZIA, L.; PAGANO, C.; RICCI, M.; ROSSI, C. Chitosan and amodified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. **Colloids and surfaces, B: Biointerfaces** v. 66, n. 1, p. 141-5, 2008.

PERIOLI L., AMBROGI V., PAGANO C., SCUOTA S., ROSSI C. FG90 chitosan as a new polymer for metronidazole mucoadhesive tablets for vaginal administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.377 p. 120-127, 2009.

PEPPAS .N.A., BURY P. A. Surface interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. **J. Control. Release.** v.2, p.257–275, 1985.

RICHARDSON J. L., ILLUM L., Routes of delivery: case studies, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.8 p.341– 366, 1992.

RINAUDO M. Chitin and chitosan: properties and applications., **Progress in Polymer Science** v. 31, p.603-632, 2006.

ROBINSON J. R., MLYNEK G. M. Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.16, p.45–50, 1995.

ROSSI S., BONFERONI M.C., FERRARI F., CARAMELLA C. Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. **Pharm Dev Technol.** v.4, p.55-63, 1999.

SANDRI S., ROSSI S., FERRARI F., BONFERONI M. C., MUZZARELLI C., CAMELLA C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. **European Journal of Pharmaceutical Science** v.21, p.351-359, 2004.

SANKHYAN, A., PAWAR, P. Recent trends in niosomes as vesicular drug delivery system. **J. Appl. Pharm. Sci.** v. 2, 20–32, 2012.

SCHAFFAZICK S. R., GUTERRES S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** v.0, p.1-12, 2003

SAYIN B., SOMAVARAPU S., LI X. W., SESARDIC D., SENEL S., ALPAR O. H. TMC-MCC (N-trimethyl chitosan-mono-N-carboxymethyl chitosan nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. **European journal of pharmaceutical sciences** v.38, p.362-9, 2009

SINGLA A. K., CHAWALA M., Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. **J. Pharm. Pharmacol.** v.53 p.1047– 1167, 2001.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.** v.108, p.303–318, 2004.

TEDESCO, A. C.; SIMONI, A. R.; PRIMO, F. L. Introdução à nanotecnologia. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas: células-tronco, terapia genética e nanotecnologia aplicada à saúde.** São Paulo: Atheneu, 2007.

TUGCU-DEMİRÖZ F., ACARTÜRK F., ERDOĞAN D. Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. **International Journal of Pharmaceutics** v.457, p.25–39, 2013.

VALENTA C., KAST C. E., HARICH I., SCHNURCH A. B. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. **Journal of Controlled Release** v.77, p.323–332, 2001.

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

VANIC E., BASNET N. S. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver? **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.50 p. 29–41, 2013.

VÅRUM, K.M.; SMIDSRØD, O. Structure-Property Relationship in Chitosans. **In: Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**, 2. ed., New York: Dekker, p. 625-642, 2005.

VERMESH M., FOSSUM G. T., KLETZKY O.A. Vaginal bromocriptine: pharmacology and effect on serum prolactin in normal women. **Obstet. Gynecol.** v.72 p.693–698, 1988

VILLENA M. J. M., CAMPOS F.F., CAMPMANY A. C. C., FEBRER A.B.N, MARTÍNEZ M.A.R., NAVEROS B. C. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers** v.94, p.1–11, 2013.

WANG, Y.-Y., LAI, S.K., SO, C., SCHNEIDER, C., CONE, R., HANES, J. Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure. 2011.

ZHANG S., KAWAKAMI K. One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. **International journal of pharmaceutics** v.397, p.211-217, 2010.

ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo redigido e aceito na revista International Journal of Nanomedicine (JCR=3.463)

Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery

Luiza A. Frank¹, Francesca D’Autilia², Renata V. Contri¹, Giuseppina Sandri², Maria Cristina Bonferoni², Carla Caramella², Alejandro G. Frank³, Adriana R. Pohlmann¹, Silvia S. Guterres^{1*}

¹ Pharmaceutical Science Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Drug Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy

³ Department of Industrial Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: Prof. Dr. Silvia S. Guterres, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752/405 CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: 55 51 33085500 Fax: 55 51 33085247; E-mail: silvia.guterres@ufrgs.br

ABSTRACT

The vaginal route of administration is an alternative for several treatments for either local or systemic pharmacological effects. However, the permanence of a drug in this route represents a challenge for formulation development that can be overcome by using nanoencapsulation and chitosan gel. Thus, this work aimed to evaluate the performance of chitosan hydrogels containing cationic (NC-RS) and anionic (NC-S) acrylic-based nanocapsules (Eudragit RS 100[®] and S100[®]), with Nile red (RN) as a model of lipophilic substance in the vaginal route of administration, as measured by increases in the residence time and the penetration of these formulations. Several formulations were prepared with increasing chitosan concentrations and analyzed in terms of pH and rheological behavior to select the most suitable formulation. The enhancement of the adhesion (tensile stress test and washability profile) and penetration [Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)] and extraction followed by quantification) properties of the formulations, when applied to porcine vaginal mucosa, were evaluated. The nanocapsule suspensions produced presented adequate properties [*ie*, size approximately 200 nm (PDI \leq 0.2), zeta potential around +10 mV for the cationic formulation and -10 mV for the anionic formulation and pH values of 6.1 \pm 0.1 (NC-RS), 5.3 \pm 0.2 (NC-S), 6.2 \pm 0.1 (NC-RS-NR) and 5.1 \pm 0.1 (NC-S-NR)]. The chitosan formulation presented suitable viscosity for vaginal application and acidic pH (approximately 4.5). The tensile stress test showed that both formulations containing polymeric nanocapsules presented higher mucoadhesion when compared with the formulation without nanocapsules. In the washability experiment, no significant differences were found between formulations. Confocal microscopy and the quantification after extraction of the fluorescence from the mucosa showed higher penetration of Nile red when it was nanoencapsulated, particularly in cationic nanocapsules. The formulations developed based on chitosan gel vehicle at 2.5% w/w containing polymeric nanocapsules, especially the cationic nanocapsules, demonstrated applicability for the vaginal delivery of hydrophobic substances.

KEYWORDS: chitosan, nanocapsule, vaginal route, Eudragit RS100[®], Eudragit S100[®]