



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PREPARO E AVALIAÇÃO DE NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA
DE NISINA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS
GINECOLÓGICAS

LETÍCIA COLI LOUVISSE DE ABREU

Rio de Janeiro
2014

LETÍCIA COLI LOUVISSE DE ABREU

PREPARO E AVALIAÇÃO DE NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA
DE NISINA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS
GINECOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Rio de Janeiro
2014

A162p

Abreu, Letícia Coli Louvise de.

Preparo e avaliação de nanossistemas de liberação modificada de Nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas/ Letícia Coli Louvise de Abreu; orientador Lucio Mendes Cabral. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2014.

98f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Candida albicans. 3. Nisina. 4. Antifúngico.
I. Cabral, Lucio Mendes. II. Título.

CDD 615.19

LETÍCIA COLI LOUVISSE DE ABREU

PREPARO E AVALIAÇÃO DE NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA
DE NISINA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS
GINECOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 24 de Janeiro de 2014

Orientador:

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ednildo de Alcântara Machado

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Prof. Dr. Eduardo Ricci Junior

Faculdade de Farmácia – UFRJ

Profa. Dra Flávia Almada do Carmo

Faculdade de Farmácia - UFRJ

Aos meus Pais, Nilta e José Luiz

Ao meu esposo Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a razão da minha existência, que esteve presente em todos os momentos dessa trajetória.

Aos meus pais José Luiz e Nilta por terem investido e acreditado em mim, mesmo nos momentos de dificuldade. Vocês fizeram um excelente trabalho!

As minhas queridas irmãs Ana Paula e Renata por sempre estarem comigo em todos os momentos, seja de alegria ou de tristeza.

As minhas tias Márcia e Marcela, se não fosse por vocês eu não seria nem metade do que eu sou hoje. Muito obrigada por terem cuidado de mim e se hoje eu estou aqui muita coisa eu devo a vocês! Amo vocês duas de coração!

Ao meu grande amor Rodrigo por todo carinho, amor, paciência e por ter me ajudado em todos os momentos em que eu precisei! Obrigada por todo apoio e suporte emocional. Obrigada por todas as correções feitas e por ter assistido a minhas apresentações milhões de vezes! Você é mais que especial para mim! Te amo para Sempre!

A toda minha família por sempre me apoiarem. Amo vocês!

Aos meus amigos, vocês são presentes de Deus na minha vida! Amo muito vocês! Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado!

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho. Muito obrigada

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral pela orientação no trabalho realizado. Obrigada por todos os ensinamentos, sugestões, confiança, apoio. Agradeço pela oportunidade ímpar que você me concedeu.

As professoras da banca de acompanhamento, Prof^a Dr^a Flávia Almada do Carmo e Prof^a Dr^a Carla Holandino, pelas sugestões e correções dadas durante a realização deste trabalho.

A professora Helena Keiko pelo auxílio e conversas nos testes de atividade antifúngica.

Aos alunos e professores do LabTIF, sem vocês tudo ficaria mais difícil. Muito obrigada por todo carinho e paciência, em especial aos professores Flavinha, Aline e Lula, e aos alunos Luisa, Jaque, Vale, Gil, Luiz, Lilian, Samantha, Plínio, Carol Correa, Escudinho, Paloma, Pedro.

A Carol, Arídio e Marina por todas as gargalhadas, comilanças e pela amizade de vocês.

A Cléo por todas as risadas e ensinamentos sobre a vida! Adorei trabalhar esse tempo contigo! Aprendi muitas coisas com você!! Muito obrigada por toda conversa e companhia até tarde no lab.

Aos funcionários da Farmácia Universitária por todo apoio e companheirismo.

A Banca examinadora por ter aceitado o convite de participar da defesa desta dissertação.

*“E sabemos que todas as coisas contribuem
juntamente para o bem daqueles
que amam a Deus, daqueles que são
chamados segundo o seu propósito”*

Romanos 8:28

RESUMO

Abreu, Letícia Coli Louvise de. **Preparo e avaliação nanossistemas de liberação modificada de nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014

A candidíase é uma infecção fúngica causada pelo gênero *Candida sp.* A nisina (NIS) é uma bacteriocina consagrada comercialmente há mais de 50 anos como antimicrobiano de uso alimentar com potencial atividade antifúngica. Atualmente, a nanotecnologia tem se destacado no desenvolvimento de novos sistemas e tecnologias, principalmente visando à exploração de propriedades e características de funcionalidades únicas obtidas nesta escala de comprimento. Dentre as alternativas disponíveis no âmbito nanotecnológico destacam-se as nanopartículas (NP), devido ao efetivo controle de liberação de moléculas, redução da dose administrada, além da redução de efeitos adversos devido ao acúmulo preferencial em locais específicos. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de nisina e a evidenciação de sua potencial atividade antifúngica. As NP-NIS foram preparadas pelo método de dupla emulsificação e evaporação do solvente. As amostras foram caracterizadas através das técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial Zeta, Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Difractometria de Raios-X (DRX), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise termogravimétrica (TGA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Atividade Antifúngica foi analisada mediante o método de *pour plate* e contagem de células, utilizando cepas de *Candida albicans* e o perfil de liberação *in vitro* foi determinado utilizando tampão acetato pH 4,0 como meio receptor. Os resultados encontrados revelaram que a metodologia adotada para obtenção de Np PCI-NIS demonstrou-se apropriada. Sendo assim, os resultados sugerem a promissora aplicação das nanopartículas de nisina como um agente profilático de candidíase vaginal recorrente.

Palavras Chave: antifúngico, *Candida albicans*, nanopartículas, nisina

ABSTRACT

Abreu, Letícia Coli Louvise de. **Preparo e avaliação nanossistemas de liberação modificada de nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014

Candidiasis is a fungal infection caused by *Candida* sp. Nisin (NIS) is a bacteriocin established commercially for over 50 years as antimicrobial food preservation with potential antifungal activity. Nowadays, nanotechnology has excelled in the development of new systems and technology, mainly targeting the exploitation of properties and characteristics of unique features obtained on this nanometric scale. Among the alternatives available in nanotechnological context we highlight the nanoparticles (Np) due to effective control of release of molecules, reducing the dose, besides the reduction of adverse effects due to preferential accumulation in specific locations. The main objective of this work is the development and characterization of nanoparticles of nisin and disclosure its potential antifungal activity. The NIS-NP was prepared by double emulsification and solvent evaporation method. The samples were characterized by the dynamic light scattering (DLS) , Zeta Potential, Fourier transform infra-red (FTIR) , X- ray Diffraction (XRD) , Differential Scanning Calorimetry (DSC) and thermal gravimetric analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM). The encapsulation efficiency of the NIS was evaluated by indirect quantification. Antifungal activity was analyzed by the pour plate method and counting of cells through the use of strains of *Candida albicans*, the in vitro release profile was determined using acetate buffer pH 4.0 as receptor medium. Results found revealed that the methodology used to obtain Np PCL-NIS has shown to be appropriate. These results suggest promising application of the nisin nanoparticles as a prophylactic agent in recurrent vaginal candidosis.

Keywords: Antifungal, *Candida albicans*, nanoparticles, nisin

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 01 Diferentes morfologias de <i>Candida albicans</i> .	23
Figura 02 Representação esquemática da estrutura secundária da Nisina.	27
Figura 03 Anatomia da Vagina	30
Figura 04 Desenho esquemático da histologia vaginal	31
Figura 05 Curvas hipotéticas de níveis plasmático <i>versus</i> tempo.	34
Figura 06 Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	39
Figura 07 Formula estrutural da PCL.	40
Figura 08 Esquema representativo do preparo das nanopartículas através da técnica de dupla emulsificação.	46
Figura 09 Esquema representativo do preparo das placas para o teste de atividade antifúngica.	53
Figura 10 Representação da Liberação <i>in vitro</i>	54
Figura 11 Curva de Calibração da Nisina.	58

Figura 12	Curva de Calibração da Albumina.	59
Figura 13	Padrão de IV-TF da Nisina, MF, Np PCL e Np Nisina.	65
Figura 14	Curvas de DSC da Nisina, MF, Np PCL e Np Nisina.	68
Figura 15	Termogramas da Nisina, MF, Np PCL e Np Nisina.	70
Figura 16	Padrão de difração da Nisina, MF, Np PCL e Np Nisina.	72
Figura 17	Fotomicrografia das Nanopartículas de PCL.	74
Figura 18	Fotomicrografia das Np de PCL contendo Nisina.	75
Figura 19	Gráfico de contagem de colônias viáveis nos sistemas recém-preparados.	77
Figura 20	Gráfico de contagem de colônias viáveis em cada preparação nos tempos 24h, 48h e 72h após a preparação/solubilização do sistema nanométrico/nisina isolada.	78
Figura 21	Perfil de Liberação da Nisina em Np de PCL	80
Figura 22	Cinética de liberação da nisina encapsulada, segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Infecções causada por Candida em seres humanos.	24
Quadro 2	Características de um sistema ideal de liberação intravaginal.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Espectro de ação da Nisina.	28
Tabela 02	Vantagens das formas farmacêuticas de liberação prolongada sobre as formas convencionais.	33
Tabela 03	Condição de Preparo das Np.	55
Tabela 04	Resultados do rendimento e da eficiência de encapsulação da Nisina	57
Tabela 05	Modo de preparo da curva de calibração	58
Tabela 06	Tamanho de Partículas da Np vazia e da Np NIS	61
Tabela 07	Tamanho de Partículas após aplicação de energia ultrassônica.	62
Tabela 08	Resultados de pH e potencial zeta.	63
Tabela 09	Atribuições das bandas características da PCL.	66
Tabela 10	Atribuições das bandas características da Nisina	66
Tabela 11	Temperatura de fusão observada no DSC.	68
Tabela 12	Resultados das temperaturas de degradação e percentual de perda de massa.	70

Tabela 13	Percentual de colônias viáveis no controle, Np e Nisina nos tempos 24h, 48h e 72h após a preparação/solubilização do sistema nanométrico/nisina isolada.	78
Tabela 14	Concentração e percentual liberado de nisina por unidade de tempo	81
Tabela 15	Resultados da cinética de Liberação	84
Tabela 16	Valores de fluxo e <i>lag time</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG	Análise Termogravimétrica
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	Ácido Bicinconinico
BDA	Batata Dextrose Ágar
CME	Concentração mínima eficaz
CMT	Concentração mínima tóxica
CV	Candidíase vaginal
CVR	Candidíase vaginal recorrente
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
DIU	Dispositivo intra-uterino
DP	Diâmetro da Partícula
DRX	Difratometro de Raios-x
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DST	Doença sexualmente transmissível
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HPyCD	Hidroxipropil- γ -ciclodextrina
IP	Índice de Polidispersão

IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
LACMAC	Laboratório de Controle Microbiológico de Medicamentos e Cosméticos
MDEES	Método de dupla emulsificação e evaporação do solvente
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
NIS	Nisina
nm	Nanômetro
Np	Nanopartícula
Npp	Nanopartícula polimérica
PCA	Poli (ciano acrilato)
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Acido polilático
PLGA	Acido lático-co-ácido-glicólico
PVA	Álcool Polivinílico
rpm	Rotações por minuto
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV-VIS	Ultravioleta-visível
ZnPc	Zinco (II) ftalocianina

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 INFECÇÕES FUNGICAS	21
1.1.1 <i>CANDIDA SP.</i>	22
1.1.2 CANDIDÍASE	24
1.2 NISINA	26
1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	26
1.2.2 MECANISMO DE AÇÃO	29
1.3. ANATOMO-FISIOLOGIA DA VAGINA	30
1.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	32
1.4.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO INTRAVAGINAL	34
1.4.1.1 MUCOADESÃO	37
1.5. SISTEMAS NANOPARTÍCULADOS	38
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL	44
4.1.1 MATÉRIA-PRIMA, SOLUÇÕES E REAGENTES	44
4.1.2 EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS	44
4.2 MÉTODOS	46
4.2.1 PREPRO DAS NANOPARTÍCULAS	46
4.2.2 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS NPS	47

4.2.3 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DA NISINA	47
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA NANOPARTICULADO	49
4.2.4.1 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS	49
4.2.4.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA	50
4.2.4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)	50
4.2.4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (ATG)	50
4.2.4.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	51
4.2.4.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	51
4.2.4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	51
4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	52
4.4 TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	53
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 ESTUDO DO PREPARO DAS NP DE NISINA	55
5.2 CÁLCULO DE RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	57
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	60
5.3.1 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO	60
5.3.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA	62
5.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	65
5.3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	67
5.3.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	69
5.3.6. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	71
5.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	73
5.4 ATIVIDADE ANTIFUNGICA	76

5.5 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	79
6 CONCLUSÕES	87
7 PERSPECTIVAS	88
8 REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções Fúngicas

Fungos são organismos eucarióticos mononucleados, como as leveduras, ou polinucleados, como os fungos filamentosos e bolores. São constituídos por uma parede celular rígida e membrana citoplasmática formada por dupla camada lipídica e inúmeros esteróis. O esterol presente predominantemente nas membranas fúngicas e que constitui seu principal componente é o ergosterol. Tais organismos podem ser encontrados na natureza tanto na forma de microorganismos como, por exemplo, leveduras ou hifas, ou sob a forma de seres multicelulares, como os basiomicetos (MURRAY, 2006).

O reino Fungi é extremamente diversificado, apresentando uma estimativa de 1,5 milhões de espécies, porém, apenas cerca de 400 espécies de fungos oferecem patogenicidade ao homem (BROWN, HAYNES & QUINN, 2009).

Micoses invasivas são causadas por um grupo pequeno de fungos que incluem *Candida*, *Cryptococcus*, espécies de *Pneumocystis*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, a maioria dos estudos sobre as respostas de stress nitrosativo e oxidativo tem sido limitada a espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (BROWN, HAYNES & QUINN, 2009).

As micoses de maior relevância no âmbito medicinal podem ser divididas em 4 grupos: superficiais, subcutâneas, oportunistas e sistêmicas. As micoses superficiais causam lesões na pele e nos apêndices cutâneos. As dermafitoses são as manifestações clínicas mais comuns dos fungos superficiais. Os patógenos subcutâneos podem causar infecção através da pele, seguido por difusão via subcutânea, disseminação linfática ou ainda por ambos os processos. Os fungos oportunistas são encontrados no meio ambiente ou na flora normal e, ocasionalmente, podem acometer hospedeiros imunocomprometidos. A candidíase é uma das doenças causadas por fungos oportunistas. Os fungos sistêmicos são os mais virulentos e podem causar doença sistêmica progressiva e grave em indivíduos previamente saudáveis. Tais patógenos não constituem a microbiota natural humana

e embora sejam caracterizados pela produção de profundas infecções viscerais e disseminação sistêmica (micoses sistêmicas), também podem se manifestar a partir de infecções superficiais, como parte do espectro da doença ou como evento inicial (MURRAY, 2006).

As infecções fúngicas constituem um importante problema de saúde pública, pois os índices de morbidade e mortalidade associados à estas infecções adquiridas em ambientes hospitalares vêm aumentando gradativamente nos últimos anos. Dentre as infecções fúngicas mais comuns, destacam-se as aspergilose e candidíase, cujas espécies envolvidas mais frequentemente são *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, respectivamente (ALANGADEN, 2011).

1.1.1. *Candida sp.*

O gênero *Candida* apresenta mais de 200 espécies descritas na literatura. Algumas dessas espécies fazem parte da microbiota natural humana e, dentre estas, apenas 10% apresentam patogenicidade (EGGIMANN, 2003). As espécies de *Candida sp.* são consideradas importantes patógenos oportunistas devido ao aumento da frequência de infecções que acometem pacientes imunocomprometidos tais como aqueles submetidos ao tratamento quimioterápico, indivíduos que fazem uso de antibióticos de amplo espectro ou infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (JIN *et al.*, 2004).

A espécie *Candida albicans* é o principal microorganismo causador de candidíase, porém outras espécies também são patógenas ao homem, tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, e *C. guilliermondi*. Normalmente, está presente na mucosa dos tratos gastrointestinal e urinário, em equilíbrio com a flora microbiana e o sistema imune do hospedeiro (FARAH, ASHMAN & CHALLACOMBE, 2000; BARBOSA, 2011).

A *Candida albicans* apresenta uma extraordinária flexibilidade metabólica que permite a utilização de nutrientes que se encontram disponíveis em diferentes nichos hospedeiros. Somado a isso, sua versatilidade morfológica, que possibilita a

transição da forma de levedura, sua fase inócua, para as fases de crescimento, incluindo as hifas filamentosas verdadeira e pseudohifas, está relacionada à invasão de tecidos (Figura 1). A essa característica de existir sob duas diferentes formas dá-se o nome de dimorfismo. A capacidade de adotar morfotipos reversíveis contribui para sua alta capacidade de colonizar e infectar praticamente todos os locais do organismo (FARAH, ASHMAN & CHALLACOMBE, 2000).

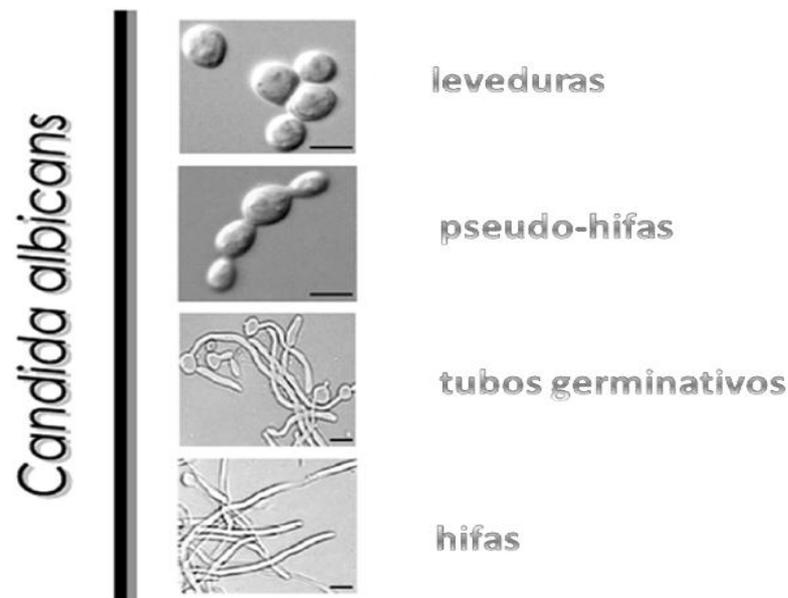


Figura 1. Diferentes morfologias de *Candida albicans* (Barras: 1 μm) (Adaptado de BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011).

A parede celular fúngica é responsável pelo desempenho de funções primordiais como, por exemplo, manutenção da forma das células e mediação de sua comunicação com o meio ambiente, principalmente no que tange à nutrição e à capacidade de atuar como barreira seletiva, conferindo proteção ao microrganismo contra danos físicos e osmóticos. Na membrana plasmática da *C. albicans* se encontra o ergosterol, principal esteroide presente na membrana de fungos e ausente em células de mamíferos. Nesse sentido, a parede celular constitui um alvo importante e seletivo para o desenvolvimento de novos fármacos (AHMAD *et al.*, 2010; BARBOSA, 2011).

1.1.2. Candidíase

As infecções causadas por microorganismos fúngicos do gênero *Candida sp.* são denominadas Candidíase ou Candidoses. A principal espécie causadora dessa patologia é a *Candida albicans* (FARAH, ASHMAN & CHALLACOMBE, 2000).

A candidíase pode desencadear um quadro agudo, subagudo ou crônico, sendo ainda superficial ou profunda. Os processos patológicos compreendem inflamação, formação de pus e resposta granulomatosa. Dentre os locais mais afetados, destacam-se as mucosas orofaríngea e vaginal, pele e anexos, brônquios, pulmões e trato gastrointestinal, conforme disposto no Quadro 1 (EGGIMANN, GARBINO & PITTET, 2003; AGUIAR, 2010).

Quadro 1: Infecções por *Candida* em seres humanos (adaptado de EGGIMANN, 2003)

Infecções Hematológicas	Infecções Superficiais	Outras desordens
Endoftalmites	Candidíase orofaríngea	Bronquite
Artrite	Candidíase Vaginal	Candidíase esofágica
Candidemia	Candidíase Cutânea	Candidíase Intestinal
Candidíase hepatosplênica		Cistites
Candidíase Pulmonar		Perionites
Espondilodiscites		
Infecção do Acesso vascular		
Meningites		
Osteomielites		
Pielonefrites		
Tromboflebitas sépticas		

Candidíase vaginal (CV) é uma infecção que afeta tanto mulheres saudáveis como imunocomprometidas e de todos os estratos da sociedade. Existem alguns fatores predisponentes, no entanto, que aumentam a sua incidência, como gravidez,

diabete mellitus, imunossupressão e terapia antibiótica (MCCATHIE, 2006). A espécie *Candida albicans* é responsável por aproximadamente 80-90% dos casos de CV (FERRER, 2000)

A CV ocupa o segundo lugar entre as vaginites. Cerca de 75% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de candidíase vaginal durante a vida adulta. Apesar de sua alta frequência, existem outras doenças vulvovaginais que mimetizam a CV, dificultando o diagnóstico e introduzindo a tratamentos inadequados. Tal infecção, não é considerada uma doença sexualmente transmissível (DST) e tratamento do parceiro masculino não é considerado necessário, porém é benéfico em termos de uma redução de recidivas em mulheres (LINHARES *et al.*, 2005; MCCATHIE, 2006).

A CV se caracteriza clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar intenso, leucorréia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal, sendo prurido o sintoma mais importante quando a CV é comparada a vulvovaginites de outra etiologia. Em alguns casos, é possível observar a presença de lesões satélites vulvares, como escoriações. A ausência de sintomas parece apresentar uma associação importante com espécies emergentes de não *C. albicans* (HOLANDA *et al.*, 2007).

Quando há o aparecimento de três ou mais episódios da infecção em um período de 12 meses, a infecção passa a ser definida como candidíase vaginal recorrente (CVR). Em inúmeros casos a CV é diagnosticada erroneamente, já que alguns médicos diagnosticam as pacientes, apenas, baseados em testes clínicos. Sendo assim ocorre em muitos casos a prescrição de medicamentos sem a real necessidade (LINHARES *et al.*, 2005).

Muitos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos para tratamento da candidíase, entre eles estão: Anfotericina B, Cetoconazol, Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol, Nistatina (NEVILLE *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2009). A Nistatina e a Anfotericina B são largamente utilizadas, há mais de 50 anos, para tratamento local e sistêmico, sendo considerados importantes fármacos para o controle de patologias da cavidade bucal (HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006).

Um importante alvo para os antifúngicos é o ergosterol e sua biossíntese. As classes terapêuticas que apresentam mecanismo de ação relacionado ao ergosterol são: os polienos, os azóis e as alilaminas. Os polienos se complexam com o ergosterol na membrana celular do fungo e comprometem sua integridade. Os azóis atuam na inibição de uma enzima do citocromo P450 na via de biossíntese do ergosterol gerando a ruptura da membrana celular. As alilaminas também atuam sobre uma enzima relativa à biossíntese do ergosterol. Todas as três classes apresentam ação fungicida e amplo espectro de ação. (COWEN, ANDERSON & KOHN, 2002)

Com o passar do tempo, observa-se que alguns antifúngicos não são mais eficientes a determinadas espécies de fungos. A falha na resposta a terapia antifúngica pode estar relacionada à resistência observada *in vitro*, devido à resistência intrínseca da cepa ou adquirida durante o tratamento, ou tal resistência pode ainda ser desenvolvida durante o tratamento, e estar relacionada ao hospedeiro (ESPINEL-INGROFF, 2008). O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos (CANUTO & RODERO, 2002; MENEZES, MENDES E CUNHA, 2009).

1.2. NISINA

1.2.1. Características Gerais

A nisina (NIS) é uma bacteriocina descoberta em 1928 pelos pesquisadores ingleses Rogers e Whittier (ARAUZ *et al.*, 2009). Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas que apresentam atividade bactericida e bacteriostática, produzidas a partir de microorganismos gram positivos (NASCIMENTO *et al.*, 2008). A NIS é um polipeptídeo composto de 34 aminoácidos, com massa molar de 3500 Da (Figura 2), produzido por cepas de *Lactobacillus lactis*. Por se tratar de uma cadeia de aminoácidos apresenta características catiônicas e hidrofóbicas (PROMBUTARA, 2012)

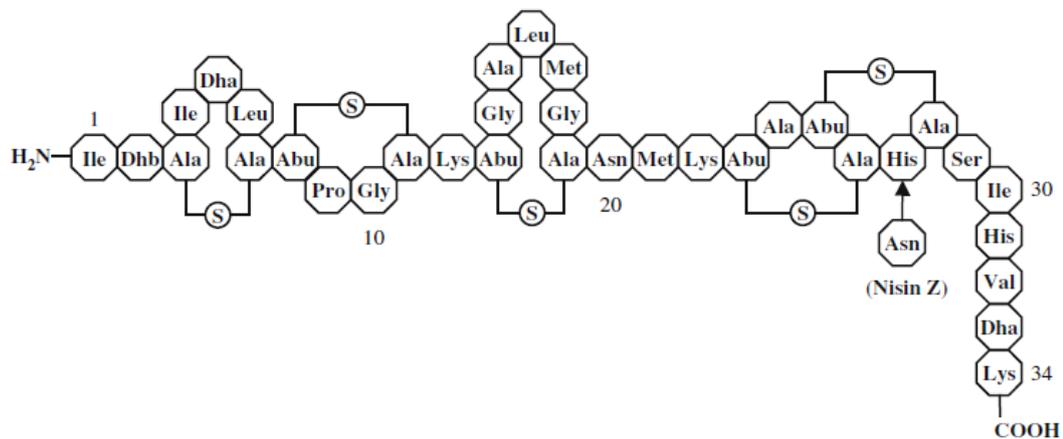


Figura 2. Representação esquemática da estrutural da NIS A e Z (Extraído de CHEIGH & PYUN, 2005)

A NIS pertence a família dos Lantibióticos. Os Lantibióticos são pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos) termoestáveis que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina e metilantionina (NASCIMENTO *et al.*, 2008). É possível que esses aminoácidos sejam responsáveis por algumas importantes propriedades funcionais da NIS, como tolerância ácida, termoestabilidade, resistência a baixos valores de pH (ARAUZ, 2009). A classe dos Lantibióticos é subdividida em duas subclasses. A Subclasse 1a é composta por peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana e tem a sua estrutura mais flexível quando comparada com os peptídeos da classe 1b. A Subclasse 1b é composta por peptídeos globulares com carga neutra ou positiva, como a mersacidina. A NIS faz parte da classe 1a (MELO, SOARES & GONÇALVES, 2005).

A NIS pode se apresentar em duas formas distintas, NIS A e NIS Z que se diferem apenas no aminoácido presente na posição 27 da cadeia peptídica. A NIS A apresenta o aminoácido histidina e a NIS Z aspartina, como observado na Figura 2. Tal modificação estrutural não afeta a atividade antimicrobiana da NIS, porém a NIS Z apresenta solubilidade elevada quando comparada a NIS A (DE VOS *et al.*, 1993; LARIDI *et al.*, 2003; PROMBUTARA, 2012).

Devido a sua natureza ácida, a NIS é completamente estável em soluções com pH baixo, podendo ser estocada por longo período em temperaturas de 2 a 7°C (NASCIMENTO *et al.*, 2008) e autoclavada a 121°C por 15 minutos sem sofrer inativação (ARAUZ, *et al.*, 2009).

NIS é um efetivo bactericida contra bactérias gram positivas, esporos e fungos conforme a tabela 1.

Tabela 1. Espectro de ação da NIS (LE LAY, 2008; ARAUZ *et al.*, 2009)

Bacteria Gram +	Esporos Gram +	Fungos
<i>Lactococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Candida oleophila</i>
<i>Staphylococcus</i>		
<i>Micrococcus</i>		
<i>Pediococcus</i>		
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Listeria</i>		
<i>Mycobacterium</i>		

Algumas bactérias gram+ apresentam resistência a NIS, devido a capacidade que possuem de sintetizar a NISse, uma enzima capaz de inativar a NIS (ABEE, KROCKEL & HILL, 1995; ARAUZ, *et al.*, 2009). Bactérias gram negativas apresentam resistência a NIS devido à composição lipopolissacarídica de suas camadas que funcionam como barreira, não deixando a NIS alcançar a parede citoplasmática (ARAUZ *et al.*, 2009).

A NIS é utilizada há mais de 50 anos como antimicrobiano de uso alimentar, apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro e é utilizada na indústria de alimentos e laticínios como conservante seguro e não tóxica, sua DL₅₀ é semelhante a do cloreto de sódio, 3.330.000 UI.Kg⁻¹ (NASCIMENTO *et al.*, 2008) É uma substância natural e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) que lhe concedeu o título de GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”) (CLEVELAN *et al.*, 2001; O’SULLIVAN *et al.*, 2002; MELO, SOARES & GONÇALVES, 2005). É

comercialmente conhecida como Nisaplin[®] e sua maior utilização é em laticínios e em embutidos.

Em 2008, Le Lay e colaboradores, demonstraram que a NIS apresenta atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, sendo considerado um importante avanço na medicina.

1.2.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação principal dos lantibioticos está relacionado à formação de poros na membrana da bactéria. A formação de poros gera um aumento da permeabilidade de íons, ocasionando a perda de ATP e aminoácidos, levando a uma perda ou dissipação do potencial da membrana bacteriana. (SAHL & BIERBAUM, 1998; JOZALA, 2005).

Com relação aos esporos e células vegetativas, existem inúmeras abordagens indicando o mecanismo de ação. A ação da NIS contra esporos pode estar relacionada com a afinidade da bacteriocina por grupamentos de resíduos de proteínas com grupamentos sulfidrílicos (JOZALA, 2005).

Ainda não é sabido o mecanismo de ação da NIS em fungos, porém há estudos que indicam que a atividade da NIS ocorre na fase estacionária de crescimento microbiano, não permitindo a divisão e proliferação celular (LE LAY *et al.*, 2008).

A NIS apresenta tempo de meia-vida reduzido, sendo inativado rapidamente, o que não ocorre caso ela esteja envolta em algum biomaterial polimérico, liberando lentamente o antimicrobiano em uma quantidade suficiente para eliminar o microorganismo (Faria-Tischer & Tischer, 2012).

1.3. Anatomofisiologia da Vagina

A vagina é um órgão tubular, fibromuscular que se estende desde o colo do útero até o vestíbulo vaginal medindo cerca de 9 cm de comprimento. É um importante órgão do trato reprodutivo, apresenta características únicas em termos de pH da secreção e microflora (VERMANI & GARG, 2000). A anatomia da vagina encontra-se apresentada na figura 3.



Figura 3. Anatomia da vagina (MeLuna, 2013)

Em termos histológicos, a vagina é constituída por quatro camadas distintas. A camada mais superficial é o epitélio escamoso estratificado não secretor. A próxima é a lâmina, ou túnica, composta de colágeno e elastina, que contém uma grande quantidade de canais vasculares e linfáticos. A terceira camada é a muscular, composta por fibras musculares lisas em ambas as direções, circulares e longitudinais. A última camada, adventícia, é constituída de tecido conjuntivo areolar e um grande plexo de vasos sanguíneos (Figura 4). Tecido vaginal não contém adipócitos, glândulas ou folículos pilosos. Secreções da parede vaginal são transudadas na natureza e são produzidos pelo inchaço do plexo vascular que inclui a

vagina (Alexander *et al.*, 2004)

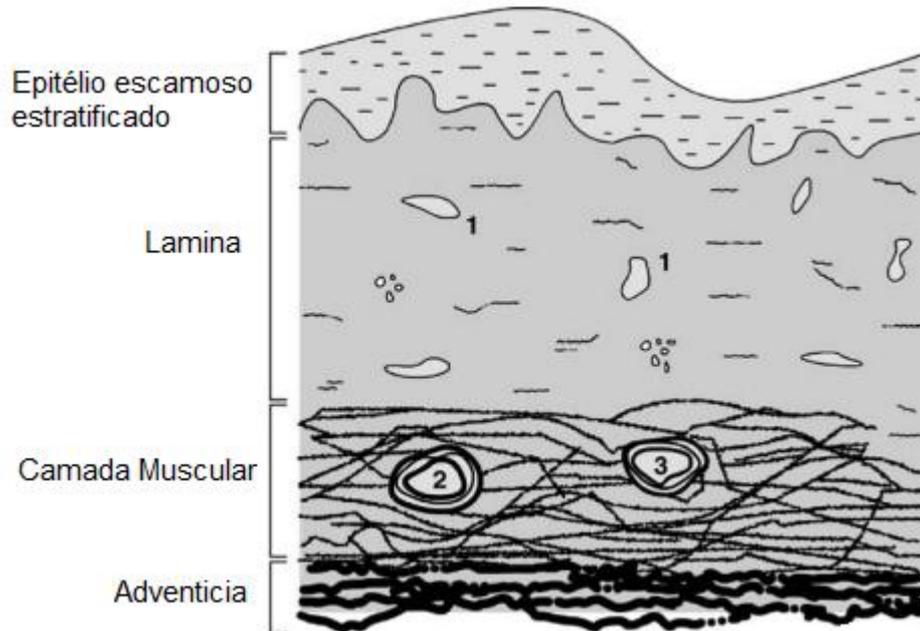


Figura 4. Desenho esquemático da histologia vaginal. 1-são os vasos capilares, 2-as artérias e 3-as veias (Adaptado de DAS NEVES & BAHIA, 2006)

A vagina apresenta uma excelente elasticidade, devido à presença de fibras elásticas no revestimento muscular. O tecido conjuntivo frouxo presente na túnica adventícia aumenta ainda mais a elasticidade deste órgão (HUSSAIN & AHSAN, 2004).

Embora a vagina não apresente nenhuma glândula, secreta uma grande quantidade de fluido. Tal fluido é composto basicamente de secreção do colo do útero e transudação dos vasos sanguíneos com células vaginais descamadas e leucócitos. Secreções do endométrio e das trompas de Falópio também podem contribuir para a formação do fluido vaginal. Assim como a espessura do epitélio vaginal, a quantidade e composição do fluido vaginal também são alteradas ao longo do ciclo menstrual (HUSSAIN & AHSAN, 2004).

Em mulheres saudáveis, com idade reprodutiva, o pH normal da vagina varia de

3,8 a 4,2. Esse pH ácido é mantido devido a produção de ácido lático pela flora vaginal. O pH vaginal pode ser alcalinizado na presença de sêmen (pH 7,0 a 8,0). Produtos de higiene feminina podem prejudicar uma variedade de defesas vaginais, além de promover a colonização de bactérias, podendo ainda alterar o pH favorecendo a proliferação de fungos e bactérias patogênicas (ALEXANDER *et al.*, 2004).

O pH vaginal é um parâmetro importante a respeito da eficácia dos sistemas liberação de fármacos. As mulheres na pós-menopausa sofrem alterações importantes na fisiologia vaginal, tais como a atrofia progressiva do epitélio vaginal, aumento do pH vaginal (6,0-7,5), e uma diminuição na quantidade de secreções vaginais. Esses recursos podem alterar significativamente o desempenho dos sistemas de liberação de fármacos nesse ambiente (DAS NEVES & BAHIA, 2006).

1.4. Sistemas de Liberação Modificada de Fármacos

Diversos avanços tecnológicos foram realizados recentemente no desenvolvimento de novas técnicas para a obtenção de sistemas de liberação de fármacos. Essas técnicas são capazes de regular a taxa de liberação dos fármacos, promover a duração sustentada da ação terapêutica, e/ou a vetorização em um tecido específico (DAS & DAS, 2003; PUPE, 2013).

Os sistemas de liberação modificada constituem uma abordagem terapêutica alternativa para regular tanto a duração quanto a localização de agentes terapêuticos (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007). Na liberação controlada, o fármaco é combinado com excipientes capazes de modular a liberação, sendo os polímeros os mais utilizados na produção desses sistemas (ANSEL, 2007).

O FDA define forma farmacêutica de liberação prolongada como aquela que permite a redução na frequência de administração que seria necessária no caso de uma forma farmacêutica convencional. As vantagens e explicações relacionadas às formas farmacêuticas de liberação prolongada são encontradas na tabela 2.

Tabela 2. Vantagens das formas farmacêuticas de liberação prolongada sobre as formas convencionais (ANSEL, 2007).

Vantagem	Explicação
Menor flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco	A velocidade de liberação controlada elimina os picos e os vales dos níveis sanguíneos.
Redução da frequência de administração	Produtos de liberação prolongada frequentemente liberam mais do que uma única dose e, portanto, podem ser administrados com menor frequência que a forma convencional.
Maior conveniência e adesão do paciente ao tratamento	Com menor frequência de administração, o paciente está menos suscetível a esquecimento de uma dose; também há maior conveniência em relação à administração diurna ou noturna.
Redução dos efeitos colaterais	Devido à redução do aparecimento de picos de concentração sanguínea acima dos níveis terapêuticos e em níveis tóxicos, os efeitos colaterais são menos frequentes.
Redução nos custos globais com a saúde	Embora o custo inicial das formas farmacêuticas de liberação prolongada possa ser maior do que o das formas convencionais, o custo global do tratamento pode ser menor devido à melhoria da eficácia terapêutica, redução dos efeitos colaterais e redução do tempo requerido para dispensação e administração do medicamento e monitoração do paciente.

Um melhor entendimento com a comparação de formas farmacêuticas de liberação convencional e prolongada pode ser encontrado na Figura 5. Onde é possível observar a variação plasmática em função do tempo, levando em consideração a concentração mínima tóxica (CMT) e a concentração mínima eficaz (CME).

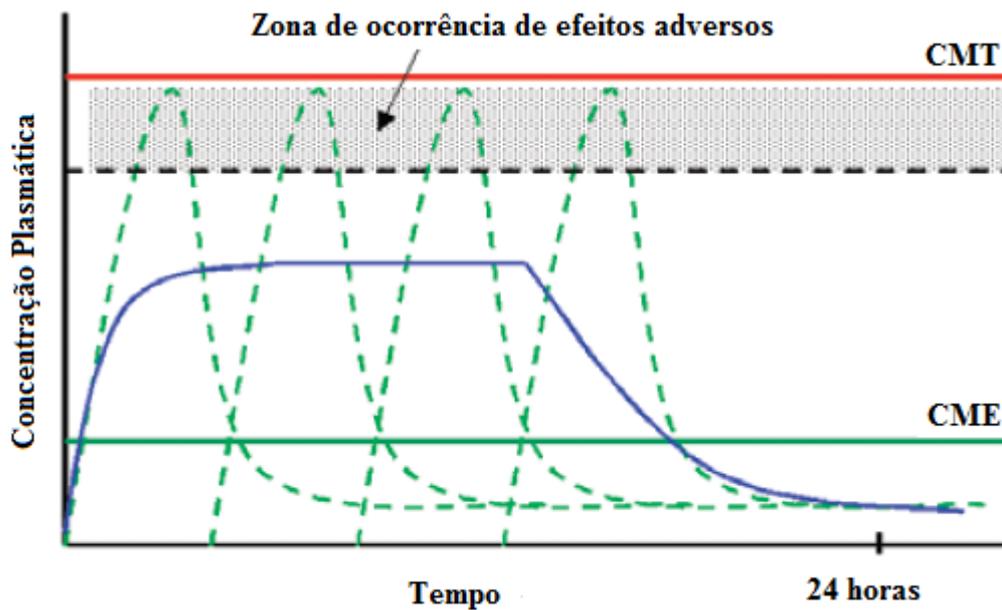


Figura 5. Curvas hipotéticas de níveis plasmático *versus* tempo, em que (---) é relativo a liberação convencional e (—) a liberação prolongada. (Adaptado de DAS & DAS, 2003)

Existem algumas tecnologias disponíveis para sustentar a liberação de fármacos, dentre elas destacam-se os sistemas matriciais, reservatórios ou osmóticos. Os sistemas matriciais são constituídos basicamente de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, geralmente polímeros. Nos sistemas matriciais, a liberação do fármaco envolve processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Nos sistemas reservatório, um núcleo contendo o fármaco é revestido por uma membrana polimérica. O fármaco é liberado por difusão através da membrana de revestimento, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Os sistemas de bombas osmóticas são sistemas que utilizam pressão osmótica para liberar o fármaco (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007).

1.4.1. Sistemas de Liberação Intravaginal

Os sistemas de liberação intravaginal incluem uma série de formas farmacêuticas, dentre elas, preparações semisólidas, comprimidos, cápsulas, óvulos, preparações líquidas, filmes vaginais, anéis vaginais, espumas e tampões (VERMANI

& GARG, 2000; DAS NEVES & BAHIA, 2006).

Medicamentos comumente utilizados na terapia de antifúngica costumam ser tóxicos quando administrados pela via oral. Neste caso, ocorre uma ligação com o colesterol, ligação esta um pouco mais fraca quando comparada à ligação ao ergosterol. O colesterol é o esteroide presente nas células de mamíferos e o esteroide presente nas células fúngicas (AGUIAR, 2010). Sendo assim a via de administração intravaginal é a mais adequada para esses casos, porque se evita a absorção sistêmica e os efeitos adversos relacionados aos antifúngicos convencionais.

Existem diversos medicamentos destinados à terapia antifúngica vaginal, dentre eles podem-se citar a nistatina, Nitrato de Iconazol, Miconazol, Tioconazol, Terconazol, Clotrimazol disponíveis na forma de cremes vaginais ou óvulos (AGUIAR, 2010)

Um sistema ideal de liberação intravaginal para efeito tópico é aquele que apresenta as características mostradas no quadro 2.

Quadro 2. Características de um sistema ideal de liberação intravaginal (Adaptado de ALEXANDER *et al.*, 2004)

Características de um sistema ideal de liberação vaginal	
Fácil aplicabilidade	Não interfira, diretamente, no cotidiano do paciente
Indolor ao paciente	Alta biodisponibilidade e pouca variabilidade
Não requeira nenhuma intervenção médica	Não apresente nenhuma interferência a outros medicamentos
Discreto	Distribuição uniforme por toda cavidade vaginal
Reversível	

Uma das maiores vantagens da administração vaginal é que os fármacos absorvidos a partir da vagina não sofrem metabolismo de primeira passagem, pois o sangue ao sair da vagina entra na circulação periférica através de um plexo venoso

rico, que esvazia principalmente nas veias íliacas internas (HUSSAIN & AHSAN, 2004).

A utilização de formas farmacêuticas de liberação intravaginal não só minimizam a toxicidade sistêmica como também permitem a utilização de mecanismos de liberação prolongada, liberação contínua, e liberação de baixas doses diárias (ALEXANDER *et al.*, 2004).

Intervalos mais longos entre as doses são geralmente bem recebidos pelos pacientes como uma alternativa mais conveniente para consumo diário. Os esforços para desenvolver sistemas alternativos de liberação prolongada estão em andamento e incluem injetáveis, implantes, dispositivos intra-uterinos (DIU), sistema transdérmico semanal e o anel vaginal mensal para a contracepção (VANIC & SKALKO-BASNET, 2013).

Dellenbach e colaboradores (2000) desenvolveram óvulos vaginais de liberação controlada para o tratamento de candidíase vaginal utilizando cetoconazol e econazol e concluíram que após 1 semana da aplicação cerca de 70% das mulheres tratadas apresentaram cultura negativa e 64% não apresentaram mais sintomas relativas a candidíase vaginal.

Han e colaboradores (2008) desenvolveram anéis vaginais de liberação sustentada de hormônios contraceptivos utilizando copolímeros mucoadesivos e verificaram que após os 28 dias eles mantiveram uma concentração de liberação constante de cerca de 3 mg/ml. Dois anéis foram desenvolvidos, um contendo látex com acácia e hidrogel de P(HEMA-co-SMA).

Kim e colaboradores (2010), ao desenvolverem gel vaginal contendo HPyCD e Anfotericina B para tratamento de candidíase vaginal, verificaram que o gel formado demorou cerca de 6 semanas para ser completamente degradado, confirmando que esse gel pode ser utilizado para prolongar a permanência de fármacos durante longos períodos de tempo na cavidade vaginal.

As formulações vaginais bioadesivas que são capazes de liberar o agente ativo durante um período prolongado, a uma taxa previsível, têm sido desenvolvidas e estudadas recentemente. Algumas formulações bioadesivas foram desenvolvidas

para reduzir o tempo de tratamento convencional de infecções fúngicas em pelo menos 25%. Estudos vêm sendo conduzidos a fim de selecionar polímeros em um ambiente vaginal (VERMANI & GARG, 2000; VANIC & SKALKO-BASNET, 2013).

1.4.1.1. Mucoadesão

Mucoadesão pode ser definida, como um estado, quando dois materiais, em que pelo menos um deles é de origem biológica, neste caso um revestimento de muco, são mantidos em contato por longos períodos de tempo (DAS NEVES & BAHIA, 2006).

A principal vantagem dos sistemas mucoadesivos é a possibilidade de aumentar o tempo de residência de um fármaco no local de aplicação, reduzindo assim o número de administrações. Idealmente, a formulação será retida na superfície biológica e a substância será liberada próximo a membrana de absorção, com uma consequente melhoria da biodisponibilidade (DAS NEVES & BAHIA, 2006).

A terapia baseada na utilização de nanopartículas *in vivo* pode ser limitada devido ao tempo de residência destas partículas no interior da vagina. Para superar essa limitação, um contato prolongado e íntimo dos nanocarreadores com a mucosa vaginal é necessária. Tal contato pode ser alcançado com sucesso utilizando polímeros mucoadesivos (VANIC & SKALKO-BASNET, 2013).

Durante as duas últimas décadas, sistemas mucoadesivos farmacêuticos têm sido extensivamente investigados como um meio de melhorar a liberação de fármacos em diferentes tecidos das mucosas, incluindo a vagina. Sistemas de distribuição de substâncias mucoadesivas funcionam através da atração entre o muco e transportadores de substâncias poliméricos (VANIC & SKALKO-BASNET, 2013).

1.5. Sistemas Nanoparticulados

A nanotecnologia farmacêutica voltada para o delineamento de sistemas de liberação de fármacos apresenta grande interesse para pesquisa, já que cerca de 95% dos novos fármacos produzidos possuem algum tipo de propriedade farmacocinética ou biofarmacêutica que necessita de aprimoramento (KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005; MATTOS JUNIOR, 2010).

A Nanotecnologia Farmacêutica baseia-se na liberação direcionada de IFA a partir de nanopartículas (Np) em órgãos alvo (SCHEU *et al.*, 2006). Como vantagens proporcionadas por esses nanomateriais, pode-se citar o aumento da biodisponibilidade, a redução da toxicidade devido ao acúmulo preferencial em determinados órgãos e tecidos alvos, a redução do volume de distribuição do fármaco, redução da dose de administração, aumento da estabilidade de alguns agentes terapêuticos, como pequenas moléculas hidrofóbicas, peptídeos e oligonucleotídeos o aumento da solubilidade de fármacos hidrofóbicos, diminuição do impacto ambiental, dentre outras (KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005; FAROKHZAD & LANGER, 2009).

Existe uma variedade de sistemas de liberação nanométricos, dentre eles pode-se destacar os lipossomas, as ciclodextrinas, os silicatos lamelares, os dendrímeros, as nanoemulsões, os nanogéis, as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas poliméricas (KOO, RUBINSTEIN & ONYUKSEL, 2005; AGUZZI *et al.*, 2007).

As nanopartículas poliméricas (Npp) são materiais particulados que apresentam tamanho na faixa nanométrica, entre 100 e 1000 nm e podem ser formadas por polímero natural ou sintético. O fármaco pode estar incorporado, encapsulado, adsorvido ou aderido às (Np) (MOHANRAJ & CHEN, 2006). As Npp podem se apresentar em duas formas distintas, as nanocápsulas e as nanoesferas. A primeira caracteriza Np ocas, com o núcleo da partícula revestido pelo polímero, delimitando de forma bem definida o material encapsulado, onde o fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido à parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas não apresentam núcleo em sua estrutura, ou seja, define-se como uma partícula esférica e sólida no interior, com uma matriz constituída por polímero contendo o material a ser

incorporado disperso por toda a esfera ou adsorvido (figura 6) (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; RAO & GECKELER, 2011).

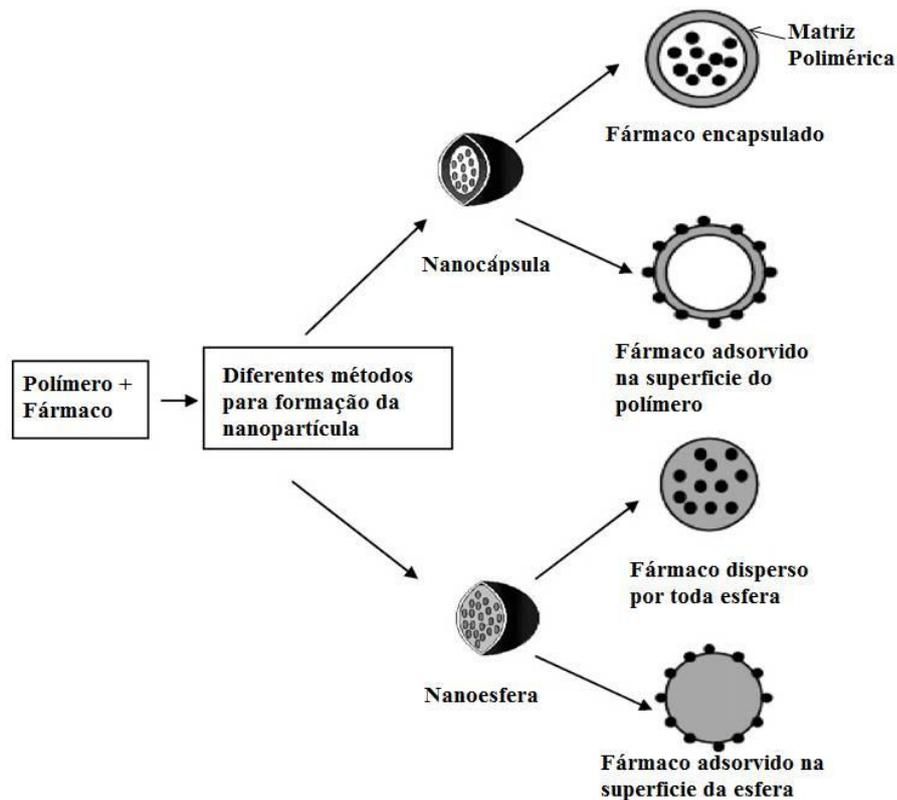


Figura 6. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas (Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010)

As Np podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais como proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos. A seleção desse material é dependente de muitos fatores tais como: o tamanho desejado das partículas, as características inerentes ao fármaco, (solubilidade e estabilidade), as características de superfície (permeabilidade e carga), o grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade, o perfil de liberação do fármaco, o método utilizado para produção das Np. Mais frequentemente, as Np são preparadas por 3 métodos distintos: dispersão de polímeros pré formados, polimerização de monômeros e

gelificação iônica ou de coacervação de polímeros hidrofílicos (MOHANRAJ & CHEN, 2006). A escolha do método de preparação é feita com base em diversos parâmetros, tais como o tipo de sistema polimérico, a destinação da Np, área de aplicação, o tamanho desejado, entre outros. (RAO & GECKELER, 2011)

O método de dispersão de polímeros pré-formados envolve diferentes técnicas de preparação de Np biodegradáveis, dentre as quais pode-se destacar o método de dupla emulsificação e evaporação do solvente. Nesse método, inicialmente ocorre a formação da primeira emulsão, um fármaco hidrofílico é solubilizado em um solvente aquoso e o polímero é solubilizado em um solvente orgânico, formando a primeira emulsão A/O. Essa primeira emulsão é adicionada a uma solução aquosa contendo um agente emulsificante formando uma emulsão A/O/A que é levada a evaporação à baixa pressão e agitação para a remoção do solvente (GARTI & BISPERINK, 1998; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Inúmeros polímeros podem ser utilizados na formação das nanopartículas, dentre eles: Ácido polilático (PLA); Ácido lático-co-ácido-glicólico (PLGA), poli (ciano acrilato) (PCA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) (MOHANRAJ & CHEN, 2006). Dentre os diversos polímeros utilizados na preparação das partículas, pode-se destacar a (PCL) (Figura 7). A PCL é produzida por polimerização com a abertura do anel ϵ -caprolactona. Trata-se de um poliéster alifático que possui baixo ponto de fusão, cerca de 60° C, e tem sido utilizado no desenvolvimento de diversos sistemas de liberação de fármacos. (CHAWLA, 2002; YUAN *et al.*, 2006; Rosa, *et al.*, 2002).

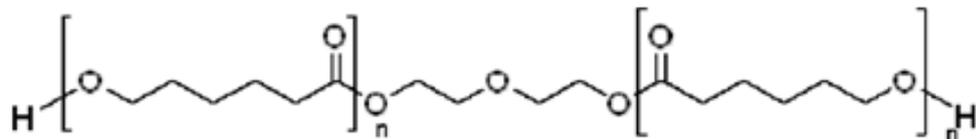


Figura 7. Fórmula estrutural da PCL

PCL é um poliéster biodegradável, biocompatível e insolúvel em água, sendo adequado para a liberação controlada de fármacos, devido a uma elevada permeabilidade para muitos fármacos e, ao mesmo tempo, apresenta baixa

toxicidade. Tem a capacidade de formar misturas compatíveis com outros polímeros (SINHA *et al.*, 2002).

Em condições fisiológicas, a PCL é degradada por hidrólise das suas ligações éster. Tal polímero tem recebido bastante atenção devido a sua degradação mais lenta quando comparados a outros polímeros, como PLA, sendo muito utilizado para preparação de dispositivos implantáveis de liberação prolongada de fármacos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

A liberação de fármaco a partir de sistemas nanoparticulados é controlada por uma série de fatores como: desorção do fármaco adsorvido na superfície da partícula; difusão do fármaco através dos poros e canais da matriz polimérica; difusão do fármaco pela parede polimérica, no caso de nanocápsulas; erosão da matriz polimérica provocando desprendimentos de fragmentos de polímero formando poros e canais e erosão combinada com difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001; CAMPOS, 2008).

Existem diversos métodos utilizados para o estudo da liberação *in vitro* de sistemas nanoparticulados, dentre eles pode-se citar: (1) células de difusão vertical com membranas artificiais ou biológicas, (2) técnicas de difusão utilizando saco de diálise, (3) técnica do saco de diálise reversa, (4) Ultracentrifugação, (5) Ultrafiltração. Apesar de contínuo interesse acerca da cinética de liberação a partir de Npp, ainda existem algumas dificuldades técnicas para estudar a liberação do fármaco *in vitro* a partir de nanopartículas. Tais dificuldades costumam estar relacionadas à separação das Np dos meios de dissolução (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Os perfis de liberação dos fármacos a partir de NPs dependerão da natureza do sistema de liberação. No caso de um dispositivo de matriz, o fármaco é distribuído uniformemente ou dissolvido na matriz e a liberação ocorre por difusão ou erosão da matriz. Se a difusão do fármaco é mais rápida do que a degradação da matriz, o mecanismo de liberação ocorre principalmente por difusão. Quando há uma liberação inicial rápida, tal fato pode ser atribuído à fração do fármaco que está adsorvido ou fracamente ligado à superfície das Np (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Os sistemas de liberação prolongada de antifúngicos vaginais são baseados na forma farmacêutica desenvolvida. A maioria dos antifúngicos disponíveis está na forma de pomadas, cremes, gel, comprimidos vaginais e óvulos. A liberação prolongada nesses casos é devido a presença de agentes retardantes e mucoadesivos como o poloxamer, ciclodextrinas, quitosana(ALEXANDER *et al.*, 2004; DAS NEVES & BAHIA, 2006; VANIC &SKALKO-BASNET, 2013

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a NIS apresenta elevada solubilidade em água, uma importante atividade antibacteriana e uma atividade antifúngica ainda pouco estudada. Entretanto, uma das suas maiores restrições se relaciona a baixa estabilidade frente a condições de temperatura e pH extremas. Desta forma, a obtenção de nanopartículas de liberação controlada deste fármaco poderia aumentar sua estabilidade, e dependendo do material polimérico utilizado na sua preparação, levar a uma penetração no muco vaginal, consequência do tamanho do sistema e sua bioadesão, determinando sua fixação em camadas mais profundas do epitélio, prolongando por várias dias a ação antifúngica da NIS servindo este sistema como agente de prevenção da candidíase vaginal. Logo, a produção de Np de NIS com PCL proporcionaria uma formulação inovadora com liberação controlada e com atividade antifúngica e antibacteriana no tratamento de patologias ginecológicas de origem fúngica diversas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo consistiu no desenvolvimento e caracterização de um sistema polimérico nanoestruturado de liberação prolongada de NIS para o tratamento e profilaxia da candidíase vaginal.

3.2. Objetivos Específicos

Como objetivos específicos foram considerados os seguintes aspectos:

- Desenvolvimento e caracterização de Np de NIS com o polímero poli- ϵ -caprolactona pelo método de dupla emulsificação;
- Avaliação do método espectrofotométrico para a quantificação da NIS nas nanopartículas preparadas;
- Caracterização do sistema através das medidas de potencial zeta, morfologia das Np através da técnica de Microscopia Eletrônica de varredura;
- Avaliação da atividade antifúngica das nanopartículas de NIS;
- Estudo do perfil de liberação *in vitro* das NPs obtidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias-primas, Soluções e Reagentes

As seguintes matérias-primas foram utilizadas, conforme adquiridas, sendo todas de grau analítico e pureza previamente definida.

Álcool Polivinílico (PVA) - SIGMA®

Água Peptonada

Diclorometano - TEDIA®

Meio de cultura BDA - DIFCO®

NIS 2,5% - SIGMA®

Pierce® Kit de detecção de proteínas - THERMO SCIENTIFIC®

Policaprolcatona – SIGMA®

A água utilizada em todos os experimentos foi obtida por osmose reversa e utilizada na preparação de meios de cultura, soluções e tampões.

As cepas de *Candida albicans* utilizadas eram ATCC 10231 – Número de passagens = 1

4.1.2. Equipamentos e Utensílios

Analisador de Potencial Zeta – Zeta master, MALVERN®

Analisador de tamanho de partículas – Zeta sizer S90, MALVERN®

Analisador Termogravimétrico – TGA 60, SHIMADZU®

Autoclave - FABBE®

Balança Analítica - SARTORIUS®

Banho de Ultrassom - UNIQUE®

Banho termostático - CIENTEC®

Calorímetro de Varredura Diferencial – DSC 50, Shimadzu®

Capela de Fluxo Laminar -PACHANE

Espectrofotômetro Infravermelho - IR Prestige-21 SHIMADZU®

Espectrofotômetro UV/VIS – Lambda 35, PERKIN ELMER®

Gotejador Automático - COLE-PARMER®

Liofilizador – LIOTOP

Microscópio Eletrônico de Varredura - JEOL

Pipetas Automáticas - EPPENDORF®

Placa de agitação magnética - IKA® C-MAG HS7.

Potenciômetro - QUIMIS

Rotaevaporador - IKA® HB10 Basic

Saco de Diálise – SIGMA MW (12105) 33mm

Ultracentrífuga Refrigerada – HITACHI

Ultrassonicador – HIELSCHER UP100H

Vidraria - PYREX®

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das Np

As Np foram preparadas pelo método de dupla emulsificação e evaporação de solvente (MDEES). Uma primeira emulsificação foi obtida gotejando uma solução de NIS (1 mg/ml) em uma solução de policaprolactona (PCL) (2,5% m/v) em diclorometano com auxílio de agitação magnética e aplicação de energia ultrassônica (100% de amplitude) em banho de gelo. A segunda emulsificação foi obtida gotejando a primeira emulsão em uma solução aquosa de PVA (0,1%) nas mesmas condições da primeira emulsificação (Figura 8). O gotejamento foi realizado com o auxílio de um gotejador automático, a um fluxo controlado de 12 ml/h e 20 ml/h respectivamente para a primeira e segunda emulsificação. Após o término do gotejamento, o preparado foi deixado sob aplicação de energia ultrassônica (100% de amplitude) por mais 5 min. As Npp formadas foram concentradas e o solvente orgânico foi eliminado com o auxílio de evaporador rotatório a pressão reduzida.

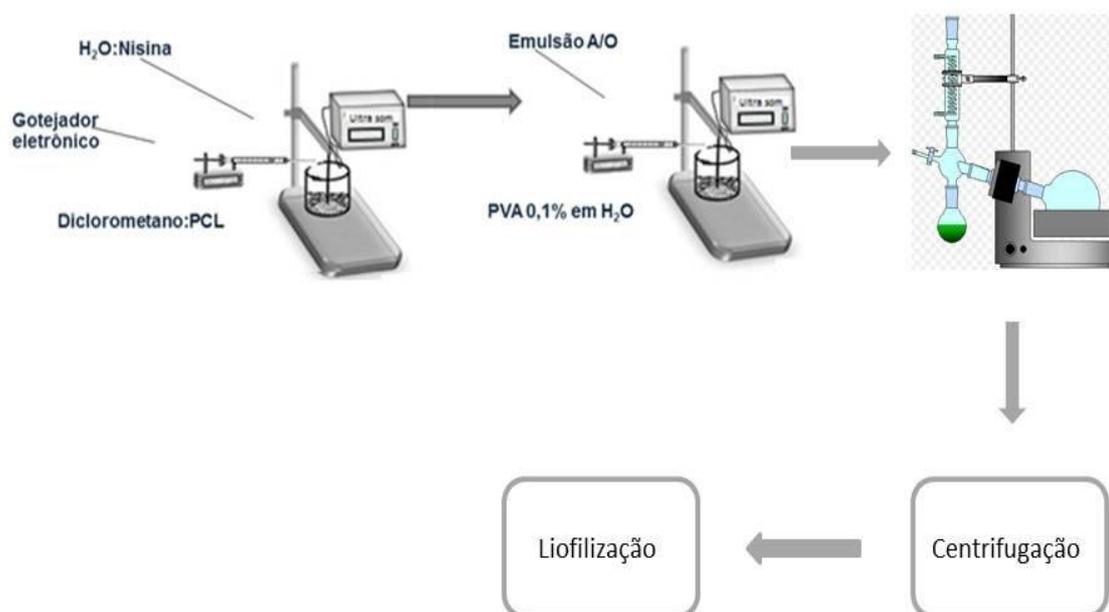


Figura 8. Esquema representativo do preparo das Np através da técnica de dupla emulsificação.

A emulsão final foi submetida à centrifugação a 20.000 rpm durante 1 hora. O sobrenadante foi encaminhado para análise de eficiência de encapsulação e o *pellet* ressuspendido foi liofilizado para posterior caracterização. Para a realização da liofilização, as amostras foram submetidas ao congelamento instantâneo em nitrogênio líquido e acondicionadas no equipamento a -60°C e 80 µHg.

Tal método é uma adaptação do método proposto por Jelvhgari e colaboradores (2010).

4.2.2. Cálculo de Rendimento do Processo de Preparação de NPs

As Np foram liofilizadas e pesadas e comparadas com a massa inicial, a fim de calcular o rendimento do processo, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de Np após a liofilização} \times 100}{\text{Massa de Nis} + \text{Massa de PCL}}$$

4.2.3. Metodologia de Quantificação da NIS

Para a determinação da eficiência de encapsulação foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS e a detecção foi realizada com o auxílio de um kit de quantificação de proteínas. O ensaio de doseamento de proteínas pelo método Ácido Bicinconinico (BCA) combina uma redução conhecida de Cu^{2+} para Cu^{1+} por proteínas em meio alcalino, com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do cátion cuproso com ácido bicinconinico. O primeiro passo da reação é a quelação de cobre com a proteína em um meio alcalino formando um complexo azul claro. Nesta reação, conhecida como reação de biureto, os peptídeos que contêm três ou mais resíduos de aminoácidos formam um quelato colorido com íons cúpricos em um ambiente alcalino contendo tartarato de sódio e potássio. No segundo passo, a reação de desenvolvimento de cor, o BCA reage com o cátion reduzido (cuproso) que foi formado na primeira etapa. A quelação de duas

moléculas de BCA com íon cuproso leva a formação de um produto de coloração arroxeada. O complexo BCA/Cobre é solúvel em água e exibe uma absorvância intensa em 562 nm. A absorvância aumenta linearmente com o aumento da concentração de proteína (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

A reação que conduz à formação de cor BCA é fortemente influenciada por quatro resíduos de aminoácidos (cisteína ou cistina, tirosina e triptofano), na sequência de aminoácidos da proteína. No entanto, ao contrário dos métodos de ligação de corante de Coomassie, o esqueleto peptídico universal também contribui para a formação de cor, ajudando a minimizar a variabilidade provocada por diferenças na composição da proteína (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

Este método foi utilizado para determinar a eficiência de encapsulação relacionada a quantidade de fármaco que está no interior da partícula com a quantidade de fármaco adicionada no início do processo. Para determinação da eficiência de encapsulação, pode-se utilizar dois métodos de quantificação: o método direto e o indireto. Para a quantificação pelo método direto, é necessário romper a partícula e quantificar o quanto está incorporado nesta. Já para a quantificação indireta, é medido o quanto de nisina não está incorporada na partícula, sendo utilizado o sobrenadante. Para quantificar a NIS não encapsulada, a suspensão de Np foi submetida a ultra-centrifugação a rotação de 20000 rpm por 60 minutos. O sobrenadante (100 µl) foi coletado, adicionado com o reativo *Pierce*[®] *BCA protein assay kit* (2 ml), e incubado em banho ultra-termostável a uma temperatura de 37°C por 30 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda a 562 nm (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

Uma reta de calibração de nisina foi preparada nas concentrações de 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml. Foi preparado um branco contendo apenas solventes e outro contendo a Np vazia de forma a se avaliar a especificidade do método.

Para quantificar a NIS encapsulada, procedeu com a extração do fármaco, através do método direto. Resumidamente, 1 ml da suspensão de Np foi adicionado em uma solução composta por 20 ml de acetronitrila e 20 ml de água, para que

pudesse ocorrer tanto a solubilização do peptídeo quanto do polímero. Em seguida adicionou-se 25 µl de metanol, para forçar a precipitação do PCL, e procedeu a filtração em membrana de 0,45µm (FERRANTI *et al*, 1999; ZILI *et al*, 2005). O filtrado foi concentrado por meio de rotaevaporação a 50°C por 15 min e procedeu a quantificação pelo método de BCA. A quantificação de NIS foi efetuada utilizando a metodologia descrita. A concentração de NIS foi calculada a partir da intensidade de absorção. O calculo foi efetuado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de Encapsulação (\%)} = \frac{\text{Massa de Nis encontrada nas Np} \times 100}{\text{Massa de Nis adicionada na formulação}}$$

4.2.4. Caracterização do Sistema Nanoparticulado

As NP foram caracterizadas de acordo com a análise do seu diâmetro médio, análise do potencial zeta, Microscopia eletrônica de varredura, análise de Infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial e Difratomia de raios – X.

4.2.4.1. Determinação do Diâmetro Médio das Partículas

A análise do tamanho de partículas foi realizada a fim de verificar se as NP encontravam-se em tamanho nanométrico e seu índice de polidispersão condizia com uma amostra de partículas com diâmetros homogêneos. Para tal análise foi utilizado um equipamento de espalhamento de luz dinâmico (Malvern Zeta sizer S90). As amostras de Np após centrifugadas foram ressuspensas em 1 ml de água purificada e a leitura foi realizada em células de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Simultaneamente à análise de tamanho de partículas foram obtidos resultados dos índices de polidispersividade, que avalia homogeneidade dos tamanhos das partículas em suspensão.

4.2.4.2. Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta das amostras de Np vazia e com NIS obtidas foi medido utilizando-se um equipamento capaz de determinar a carga da nuvem elétrica acima da superfície da partícula, aferida através do software zeta sizer (SILVA, 2012). Para a análise, as suspensões de Np foram diluídas em água purificada (1:10) e uma quantidade suficiente de amostra foi transferida para uma cubeta, onde foi introduzida uma célula eletrolítica. As determinações foram adotadas como média de dez leituras para cada amostra, com pH e diâmetro médio de partículas previamente obtidos, para inclusão desses parâmetros no software do equipamento.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Weber do Professor Jerson Lima da Silva.

4.2.4.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

A análise de FTIR foi realizada para verificar a presença de bandas características da NIS na Np. Foram determinados espectros da NIS pura, da mistura física (MF) contendo a NIS e a NP vazia na mesma proporção utilizada para desenvolvimento da Np contendo NIS, da Np de PCL, da Np de PCL contendo NIS. Foram preparadas pastilhas com as amostras pulverizadas em KBr previamente dessecado a 1,0 % m/m. Os espectros de IV-TF foram obtidos na região entre 4000 e 400 cm^{-1} utilizando o Espectrofotômetro FT-IR SHIMADZU IR PRESTIGE-21.

4.2.4.4. Análise Termogravimétrica (ATG)

Na ATG, mede-se a variação de massa de uma determinada amostra em função da temperatura. Devido a essa variação é possível verificar a estabilidade térmica de determinado material (ALEXANDRE & DUBOIS, 2000). Para realização de tal análise, cerca de 4,0 mg de amostra foram corridas contra um padrão de alumina, em um fluxo de nitrogênio de 50 ml/min, com taxa de aquecimento de

10°C/min, na faixa de temperatura de 30 a 700°C. Foi realizada a ATG da NIS, da MF, da Np de PCL e da Np de PCL contendo NIS

4.2.4.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As amostras foram analisadas em um Calorímetro de Varredura Diferencial, Shimadzu DSC 50. Cerca de 2,0 mg de amostra foram analisadas contra um padrão de alumina em um fluxo de nitrogênio 50 ml/min, com taxa de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 30 a 500°C. Na técnica de DSC, as diferenças no fluxo de calor dentro de uma amostra e uma referência são medidas em função da temperatura da amostra, enquanto ambas são submetidas a um controle de temperatura (SKOOG, HOLLER & NIELMAN, 1998). Foi realizado o DSC da NIS, da MF, da Np de PCL e da Np de PCL contendo NIS.

4.2.4.6. Difratoimetria de Raios X (DRX)

Os nanossistemas poliméricos obtidos, substâncias isoladas e suas respectivas misturas físicas foram avaliados em difratômetro de raios-X, operado com potência no tubo de 40 kV e corrente a 30 mA. O ângulo de difração 2θ foi analisado entre 2 e 40°, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ como fonte de raios-X, e comprimento de onda de 1,5418 Å. A difração de raios-X é um dos métodos de caracterização da formação de Npp que permite avaliar a interação entre o fármaco e a matriz polimérica. É um método não destrutivo que objetiva verificar o padrão de cristalinidade das substâncias (KOO, 2006; ZABSKA *et al.*, 2011). Foi realizado a DRX da NIS, da MF, da Np de PCL e da Np de PCL contendo NIS

4.2.4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV é uma técnica capaz de produzir imagens de alta ampliação, de até 300.000 vezes e com excelente resolução. Uma pequena

quantidade de partículas foi adicionada a uma fita de carbono fixada em um porta-amostra. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd (ouro/chumbo) pelo processo de Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada – 10 nm – sobre a amostra, em seguida as amostras foram submetidas a uma tensão de aceleração de 3 kV. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol, utilizando-se uma tensão de aceleração de 3 kV e detectores de elétrons secundários e elétrons retroespalhados. Foram obtidas imagens da Np de PCL e da Np de PCL contendo Nisina.

O ensaio foi realizado no Centro Nacional de Bioimagens (Cenabio) da UFRJ sob a presidência do professor Adalberto Ramon Vieyra.

4.3. Determinação da Atividade Antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica dos nanossistemas formados foi realizado o teste de contagem de células. Foi escolhida a técnica de *pour plate* a fim de comprovar a atividade antifúngica do peptídeo. Na técnica de *pour plate* a inoculação do Agar é realizada antes da sua solidificação. Nesta técnica o meio de cultura arrefecido, mas ainda líquido, é misturado com inóculo de células, posteriormente vertido em placas de *petri* e incubado. Assim as colônias podem desenvolver-se igualmente em todo o meio. Primeiramente o sistema nanoparticulado e o peptídeo isolado foram solubilizados em água até uma concentração final de 180 µg/ml de NIS. O meio de cultura foi preparado dissolvendo 39 g do meio agar batata dextrose em 1000 ml de água destilada, aquecendo até total solubilização, posteriormente esterilizado pelo processo de autoclavação a 121°C por 15 min e mantido a uma temperatura de 45°C antes da utilização. As cepas foram cultivadas a 37°C por 24 horas. Uma diluição seriada das células foi realizada até a diluição de 10^{-4} células/ml. O teste foi realizado sob fluxo laminar em placas de *Petri* estéreis com auxílio de pipetas automáticas inoculando 1ml de amostra, 100 µl da suspensão de leveduras e 20 ml de meio na placa. Para obter a completa homogeneização realizaram-se movimentos circulares. A placa foi

incubada a 32°C por 48 h. Uma placa controle positivo (sem a amostra) e negativo (somente meio de cultura) também foi preparadas (Figura 9)

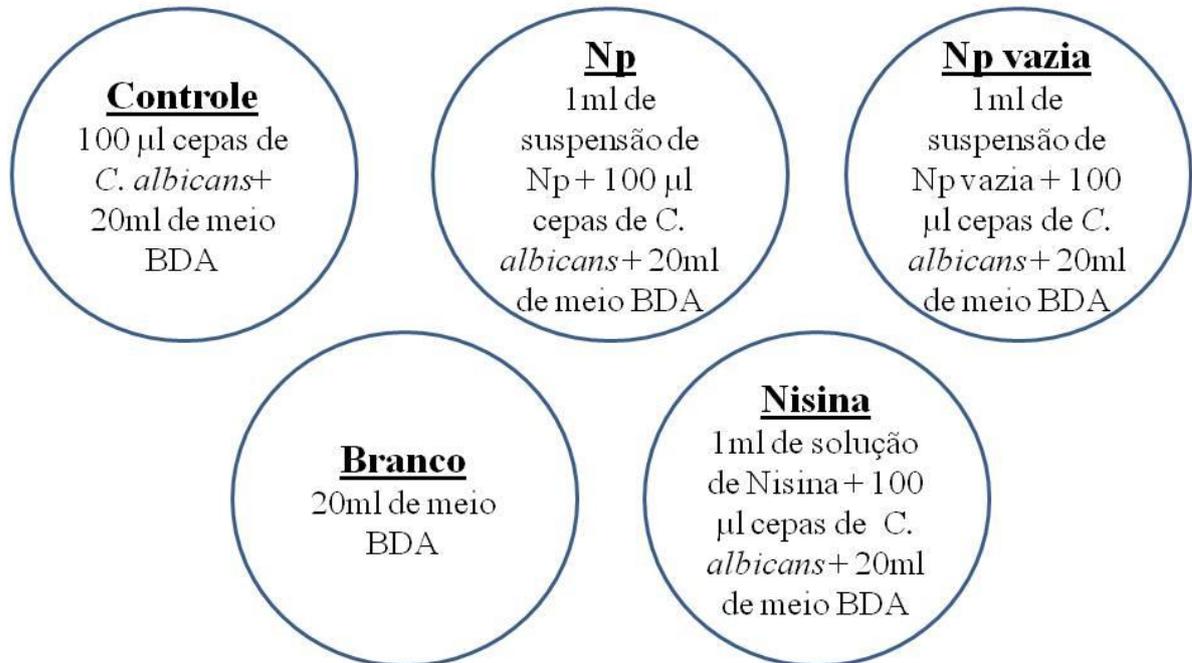


Figura 9. Esquema representativo do preparo das placas para o teste de atividade antifúngica.

O teste foi realizado no Laboratório de Controle Microbiológico de Medicamentos e Cosméticos (LACMAC) da Professora Helena Keiko Toma.

4.4. Teste de Liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação foi realizado com Np-NIS encapsulada e uma solução de NIS. Os experimentos foram conduzidos com utilização de sacos de diálise com cerca de 25 cm² de área. 10 ml da suspensão de Np foram acondicionadas dentro de um saco de diálise, previamente hidratado e devidamente fechado (Figura 10). O saco foi imerso em um tubo falcon de 50 ml contendo 30 ml de meio receptor, neste caso, tampão acetato pH 4,0, mantendo o saco

completamente submerso. Este tubo falcon foi colocado dentro de um banho maria a 37 °C contendo uma solução de nipagim 0,15%, para evitar a proliferação de fungos. O sistema foi submetido à agitação a 50 rpm. O experimento foi realizado em triplicata.

Alíquotas de 3 ml foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, com reposição de meio, e liofilizadas a fim de concentrar a amostra. Posteriormente procedeu-se com a quantificação por UV/VIS com o kit de detecção de proteínas . A partir das concentrações obtidas pôde-se construir um gráfico do perfil de liberação das partículas, calcular o fluxo e o *lag time*. Além desses resultados, foi possível determinar a cinética de liberação. A cinética de liberação, fluxo e *lag time* foram calculados utilizando a parte linear da reta.

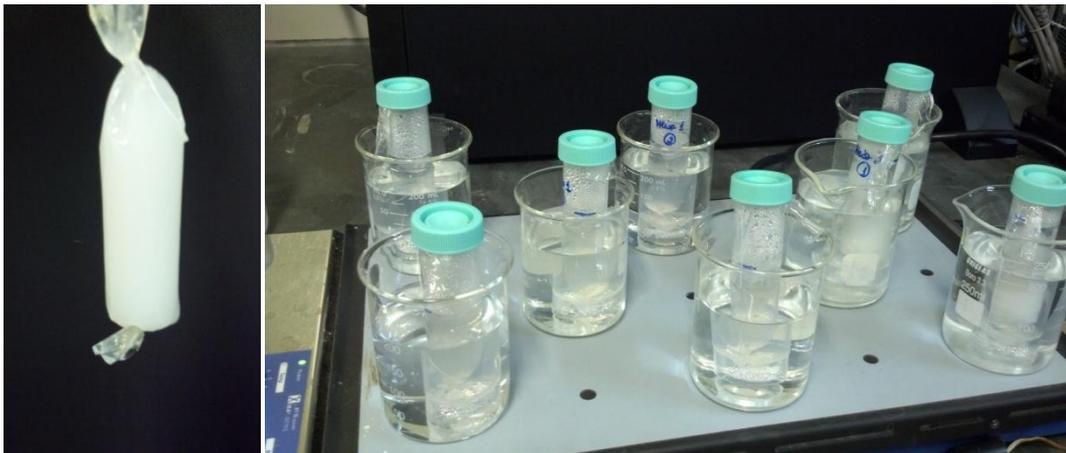


Figura 10. Representação da Liberação *in vitro* a) Saco de diálise com a suspensão de NP. b) Esquema de liberação das Np

4.5. Análise Estatística

As comparações entre grupos foi realizadas com análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* GraphPadPrism[®] 5 com intervalo de confiança de 0,05. Os valores de erros e desvios padrão das medidas experimentais produzidas foram calculados com o uso deste mesmo *software*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo do preparo das Np de Nisina

Para encapsular compostos de natureza hidrofílica, a metodologia mais utilizada é a técnica de emulsão múltipla ou método da dupla emulsificação e evaporação do solvente (MDEES) (HANS & LOWMAN, 2002). Isso se deve aos maiores rendimentos de encapsulação obtidos com este método, quando comparado ao uso de outras metodologias para a encapsulação de estruturas hidrofílicas. Npp de PCL possuem como uma de suas principais características, uma liberação bastante lenta dos ativos nelas incorporadas, podendo permanecer por dias liberando o mesmo. Todavia, no interior de microrganismos, como a *Candida albicans*, o aparato enzimático do fungo pode acelerar este processo, passando a se comportar estas Nps como sistemas de liberação próximos a imediata. Tal fato seria interessante pois poderia se obter um sistema ideal, apresentando liberação controlada fora do fungo e liberação imediata no interior do microorganismo.

Em uma avaliação de aspecto visual das dispersões de Np obtidas neste trabalho, observou-se que nenhuma delas apresentava aglomerados visíveis de partículas. Porém, em algumas preparações, era possível observar material polimérico em suspensão, podendo se especular haver um excesso de polímero no meio. As Np foram preparadas de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 3. Condição de Preparo das Np*

Amostra	NIS (mg/ml)	PCL (mg)	DCM (ml)	PVA 0,1% (ml)
A	1	125	6	40
B	----	125	6	40

*Onde A é a nanopartícula de PCL contendo NIS e B a Np de PCL vazia.

A técnica de dupla emulsificação é considerada uma técnica que apresenta um elevado potencial para produção de Np com a liberação controlada e modificada, principalmente de fármacos hidrossolúveis (GARTI & BISPERINK,1998). Emulsões A/O/A foram utilizadas para encapsular proteínas e peptídeos que são moléculas altamente solúveis em água, logo, são introduzidas na fase aquosa interna de emulsões múltiplas. Essa encapsulação resulta em partículas com maior eficiência de encapsulação em comparação com as partículas formadas pela emulsão simples (GARTI & BISPERINK,1998; SINHA *et al.* 2004).O MDEES é um método simples, porém apresenta dificuldade para a produção em larga escala, sendo essa uma desvantagem do método. Tal metodologia envolve uma homogeneização em alta velocidade e com aplicação de energia ultrassônica, sendo um excelente método para produção de Np em escala laboratorial (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006, SOARES, 2009).

A principal vantagem da preparação de Np com peptídeos e proteínas é a possibilidade de se criar sistemas de liberação modificada e diminuir possíveis efeitos colaterais. Por pertencerem à classe de moléculas naturais com funcionalidade e aplicações biológicas, as proteínas têm sido importante alvo de estudos em sistemas nanoparticulados. Nanomateriais derivados de proteínas tendem a ser biodegradáveis e biocompatíveis (JAHANSHAHI & BABAEI, 2008). Ao se considerar o uso de Npps como agente profilático da candidíase vaginal, a encapsulação da NIS com PCL determinará uma mucoadesão inicial nas Nps no epitélio vaginal, o que auxiliará no processo de penetração deste sistema no muco, possibilitando que o mesmo fique por dias no local de aplicação, podendo atuar como um agente controlador da multiplicação excessiva de *Candida* na vagina, atuando assim, na profilaxia das patologias derivadas (VANIC &SKALKO-BASNET, 2013). Portanto, o sistema aqui desenvolvido seria mais eficaz para o controle e para profilaxia desta determinada patologia, do que para o seu tratamento propriamente dito.

5.2. Cálculo de Rendimento do Processo e Eficiência de Encapsulação

Os resultados do cálculo do rendimento do processo de preparação de nanopartículas e da determinação da eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados do rendimento e da eficiência de encapsulação da NIS

Amostra	Rendimento (%)	Eficiência de Encapsulação
A1	59,38 ± 0,062945	93,88 ± 3,26

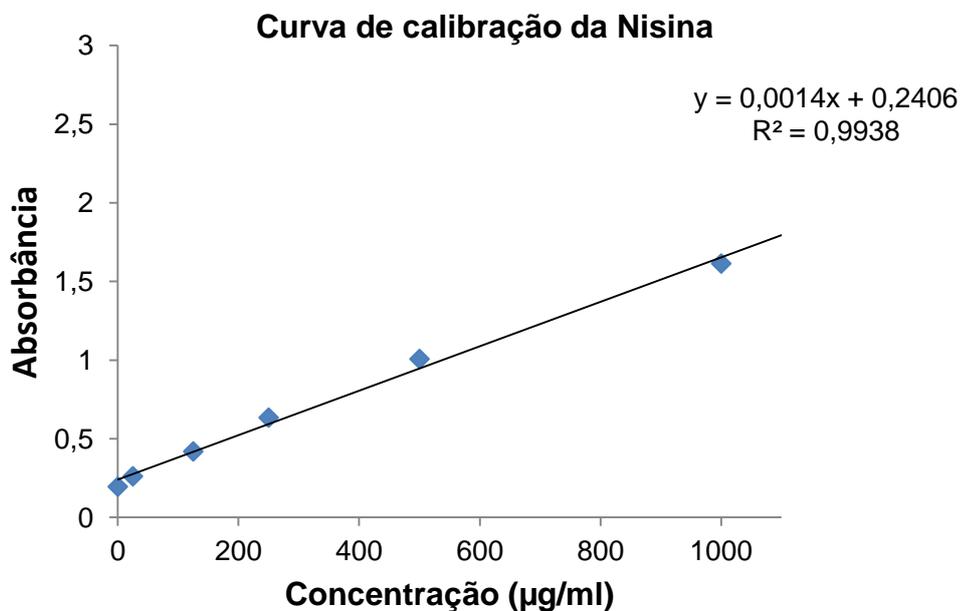
Na preparação de Np de NIS o rendimento do processo foi de $59,38 \pm 0,062\%$, ou seja, para cada 100 mg de polímero utilizado obteve-se uma massa seca de $59,38 \pm 0,062$ mg de partícula. O método de preparação das Np apresentou rendimento e eficiência de encapsulação satisfatórios. Soares (2009) ao preparar Np de PCL com ZnPc obteve rendimento de 63,86%, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Ossa e colaboradores (2012) desenvolveram Np de Canabinóide com PCL utilizando o método de emulsão simples e obteve rendimento 58,68% e eficiência de encapsulação de 98,3%. Eficiência superior à encontrada no trabalho, porém rendimento bastante semelhante.

Para determinação da Eficiência de encapsulação foi preparada uma curva de calibração com a NIS, utilizando os mesmos parâmetros preconizados pelo método do kit de detecção de proteínas PIERCE[®]. O kit fornece uma preparação padrão de albumina a 2 mg/ml. Uma solução de NIS a 2 mg/ml foi preparada e realizada uma curva com tal preparado. A curva de calibração de nisina foi preparada nas concentrações de 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml. A partir de diluições propostas no kit conforme a tabela 5.

Tabela 5. Modo de preparo da curva de calibração

Amostra	Volume de solução padrão	Volume de diluente	Concentração
A	1ml da solução mãe	1ml	1mg/ml
B	1 ml da solução A	1 ml	500 µg/ml
C	1ml da solução B	1 ml	250 µg/ml
D	1 ml da solução C	1 ml	125 µg/ml
E	250µl da solução D	1ml	25 µg/ml
F	0	1ml	0 = branco

Foi preparada uma curva de calibração da Albumina nas mesmas concentrações utilizadas para NIS e comparada com a curva da NIS. Pode-se observar que as duas curvas não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de coeficiente angular, linear e de correlação, quando se considera a comparação da triplicata de cada experimento. A partir da equação da reta gerada pela curva de calibração foi possível calcular a eficiência de encapsulação (Figuras 11 e 12).

**Figura 11.** Curva de Calibração da NIS

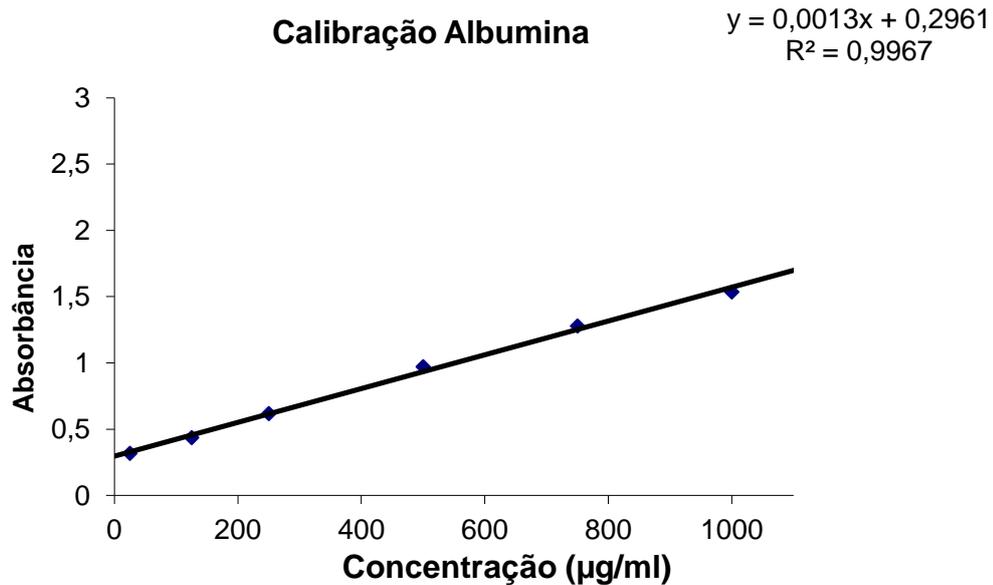


Figura 12. Curva de Calibração da Albumina

Foi realizada a leitura contendo apenas o solvente (PVA) e as Np vazias e foi comparada com a solução de nisina de concentração conhecida. Os valores obtidos foram de 0,001 Abs para o solvente e de 0,011 para as Np vazias. Os valores de absorbância próximos a zero após a reação com o kit, demonstraram ser o método específico para os aminoácidos da nisina, não reagindo nem com a PCL nem com o PVA.

A eficiência de encapsulação foi calculada para se obter a quantidade de NIS recuperada nas Np e o resultado obtido foi de 93,88% de recuperação do peptídeo. Esse resultado é necessário para poder quantificar a NIS em testes posteriores, como a liberação e o teste de atividade antifúngica. O método empregado apresentou excelente eficiência de encapsulação, já que praticamente todo peptídeo foi incorporado no sistema polimérico.

Salmaso e colaboradores (2004) prepararam Np de NIS com PLA e obtiveram eficiência de encapsulação de $94 \pm 3\%$, resultados estes semelhantes ao encontrado no presente estudo. Já Prombutara e colaboradores (2012) ao prepararem Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de NIS obtiveram eficiência de encapsulação máxima de $73,6 \pm 0,04\%$, resultado este inferior ao encontrado nesse estudo. Entretanto, cabe ressaltar que o menor custo da PCL, quando comparada

as NLS utilizado neste trabalho torna mais promissora a metodologia aqui desenvolvida.

Xiao & Zhong (2011) encapsularam NIS com Tween 20 e glicerol pela técnica de *spray drier* e obtiveram eficiência de encapsulação de 54% para a NIS tratada com Tween 20 e 43 % para a tratada com Glicerol, resultado este bastante inferior ao encontrado no presente trabalho, cerca de 50% a menos de encapsulamento da NIS. Sendo assim, o método proposto para desenvolvimento de Np de NIS apresenta resultados semelhantes ou superiores ao encontrado na literatura, podendo ser um indicio de que a metodologia desenvolvida pode ser considerada adequada para a encapsulação de NIS em Npp. Ainda pode se especular que o escalonamento da metodologia aqui desenvolvida por secagem em *spray drying* aponta para maior facilidade de adequar este processo em escala industrial em comparação aos anteriormente estudados .

5.3. Caracterização das Np

5.3.1. Determinação do diâmetro médio

A análise de tamanho de partículas está relacionada principalmente com a determinação da via de administração a ser utilizada. Np com tamanhos menores são menos suscetíveis a fagocitose mononuclear, permanecendo mais tempo na circulação e aumentando a eficácia de liberação de um ativo. Partículas de tamanhos muito pequenos (20-30 nm) são eliminadas por excreção renal (GAUMET *et al.*, 2008). A maioria dos poros na mucosa vaginal, incluindo muco cérvico-vaginal, variam de 50 a 1800 nm, com um tamanho médio de poro de 340 nm (LAI *et al.*, 2010), as nanopartículas com um tamanho de cerca de 300 nm, ou menor, podem penetrar através da mucosa membranas e superar as barreiras existentes com sucesso (YOO, GIRI & LEE, 2011)

A composição qualitativo-quantitativa e o método de preparação das Np são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A determinação do tamanho de partículas foi realizada

pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Tal técnica se baseia no fato de que as partículas em suspensão estão em movimento Browniano, e que as partículas da amostra se movem como consequência das colisões com as partículas do solvente, sendo assim, partículas menores se movem mais intensamente no meio e partículas maiores se movem de forma mais suave. Após o espalhamento da luz do laser pelas partículas, a intensidade da luz espalhada é convertida em pulsos eletromagnéticos, sendo processados pelo software fazendo a comparação direta da intensidade da luz espalhada em sucessivos intervalos. A intensidade de espalhamento detectado em um ângulo pré-estabelecido depende da velocidade de difusão, coeficiente de difusão D , das partículas no solvente (XU, 2008; LIMA, 2010)

Foram realizadas análises, em triplicada, através da técnica de espalhamento de luz dinâmico de três diferentes suspensões de Np, preparadas com as mesmas quantidades de polímero e peptídeo. Todas as partículas produzidas demonstraram diâmetro médio acima de 300 nm, e índice de polidispersividade em torno de 0,2. O Diâmetro médio e o Índice de polidispersividade das amostras encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Tamanho de Partículas da Np vazia e da Np NIS

Amostra (n = 3)	DP (nm)	IP
Np NIS	340,3 ± 4,51	0,257 ± 0,06
Np Vazia	300,3 ± 2,25	0,164 ± 0,01

Devido ao valor de diâmetro médio encontrado, fora da faixa para permeação pela mucosa vaginal, maiores que 300nm, realizou-se uma modificação no método, a fim de diminuir o tamanho das partículas. Após o término do gotejamento, a suspensão de Np continuou recebendo energia ultrassônica por mais 5 minutos (RIBEIRO *et al.*, 2013). Após esse tempo, procedeu-se com a metodologia proposta, gerando partículas de tamanhos menores, demonstrados na tabela 7.

Tabela 7. Tamanho de Partículas após aplicação de energia ultrassônica

Amostra (n = 3)	DP (nm)	IP
Np NIS	284,8 ± 5,40	0,138 ± 0,03
Np Vazia	234,9 ± 6,07	0,119 ± 0,05

Além do diâmetro médio das partículas, a análise forneceu o Índice de Polidispersividade (IP) das amostras. O cálculo do IP leva em consideração o tamanho médio das partículas, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição do equipamento e a variação da distribuição (GAUMET *et al.*, 2008).

Em uma escala de 0 a 1, quanto menor o IP, mais próximo a zero, diz-se que mais monodisperso encontra-se o sistema, logo há uma alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Já para valores elevados de PDI, mais próximos a 1, sugere-se uma ampla distribuição de tamanho ou mesmo uma amostra com várias populações. (GAUMET *et al.*, 2008). Todas as partículas produzidas demonstraram diâmetro médio abaixo de 300 nm e índice de polidispersividade em torno de 0,1 (YOO, GIRI & LEE, 2011). Logo com o tamanho encontrado nas Np desenvolvidas é possível inferir que as mesmas atravessarão as barreiras da mucosa vaginal podendo ocorrer acúmulo de NIS nas mucosas mais internas .

5.3.2. Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta é um parâmetro muito importante para caracterização de Npp. Para as partículas pequenas, em meio líquido, não existe uma técnica satisfatória para determinar a carga da superfície. A prática comum consiste em determinar o potencial elétrico da partícula num local longe da superfície, na camada difusa. Esta localização, relacionada ao movimento das partículas no estado líquido, é chamado de superfície de cisalhamento. O potencial medido neste plano é chamado potencial zeta. O seu valor está intimamente relacionado com a estabilidade da suspensão e da morfologia da superfície da partícula (XU, 2008).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) A determinação do potencial zeta está relacionada à determinação da estabilidade das Np e a resposta biológica do fármaco associado. Pode ser útil, também, na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às Np (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O pH e o potencial zeta das amostras encontram-se na tabela 8.

Tabela 8. Resultados de pH e potencial zeta

Amostra	pH	Potencial zeta (mV)
Np vazia	5,30 ± 1,32	-6,62 ± 0,42
Np NIS	5,37 ± 0,87	-1,96 ± 0,47

O pH das suspensões e das Np ressuspensas após a centrifugação foi determinado após a etapa de evaporação do solvente. É possível observar valores de pH em torno de 5,3 tanto para a Np vazia como para a Np contendo NIS. Essa faixa de pH pode estar relacionada à PCL. Soares (2009) preparou Np de ZnPc com PCL e obteve valores de pH igual a 5,46. Ourique e colaboradores (2008) prepararam nanocápsulas e nanoesferas de tretinoína com PCL e obtiveram valores de pH na faixa de pH de 5,9 a 6,9. Ribeiro e colaboradores (2013) obtiveram valores de pH igual a 5,0 ao preparar Np de *Uncaria tomentosa* com PCL. O potencial de Nps obtidas a partir de polímeros não carregados, no caso a PCL, depende de inúmeros fatores, incluindo a concentração de fármacos ou de tensoativos carregados na fase aquosa. A PCL apresenta valores de potencial zeta de cerca de -50 mV até valores menos expressivos em torno de -5 mV (RIBEIRO *et al.*, 2013). O potencial zeta das amostras com e sem o peptídeo foram analisados. É possível observar que tanto a Np vazia quanto a Np com NIS apresentaram potencial negativo. Tal fato também está relacionado à PCL, pois polímeros poliésteres conferem potencial negativo à superfície devido à presença de grupamentos carboxílicos (VERGER *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; Soares, 2009).

As Np vazias, sem a presença do peptídeo, apresentaram valores de potencial zeta em torno de -6 mV, devido às características intrínsecas do polímero utilizado. Já nas Np contendo o peptídeo é possível observar um ligeiro decréscimo do potencial medido, cerca de $-1,96$ mV. Essa diminuição é relativa ao peptídeo que devido a sua sequência de aminoácidos apresenta características catiônicas.

Np de PCL contendo Zinco(II)ftalocianina (ZnPC) foram preparadas por Soares (2009) pelo método de emulsão e evaporação do solvente, utilizando PVA como tensoativo. As Np apresentaram valores de potencial zeta de $-6,28$ mV, sendo bastante semelhante aos valores encontrados nesse estudo. Jelvehgari e colaboradores (2010) prepararam Np de PCL com teofilina utilizando as mesmas proporções de PCL e PVA utilizadas no estudo e ao realizarem a leitura do potencial zeta encontraram resultados próximos ao encontrado no presente trabalho, $-4,8$ mV.

Prombutara e colaboradores (2012) desenvolveram Np lipídicas sólidas contendo NIS e foi possível observar que quanto maior o percentual de NIS na Np maior o potencial zeta relacionado. Zou e colaboradores (2012) prepararam Np lipossomais contendo NIS e observaram que o potencial zeta da nanopartícula vazia era em torno de -13 mV e quando a NIS encontrava-se na NP esse potencial aumentava consideravelmente para $+17$ mV, tal fato é relacionado a carga positiva da NIS.

O potencial zeta das nanopartículas é um fator importante e está intimamente ligado a mucoadesão, NP com carga extremamente negativa apresentam maior absorção pelo tecido, sendo rapidamente permeada. Np com cargas ligeiramente negativas apresentam uma menor permeabilidade, fazendo com que a Np permaneça mais tempo aderida à mucosa vaginal. (HAM *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2013). De acordo com os resultados de potencial zeta obtidos, verifica-se que devido à presença de grupamentos catiônicos da NIS e com o conceito relacionado à mucoadesão, as Np aqui desenvolvidas seriam susceptíveis a permanecerem mais tempo aderida a superfície da mucosa vaginal.

5.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 13 mostra os espectros de infravermelho de NIS, mistura física (MF), Np de PCL e Np de PCL com NIS.

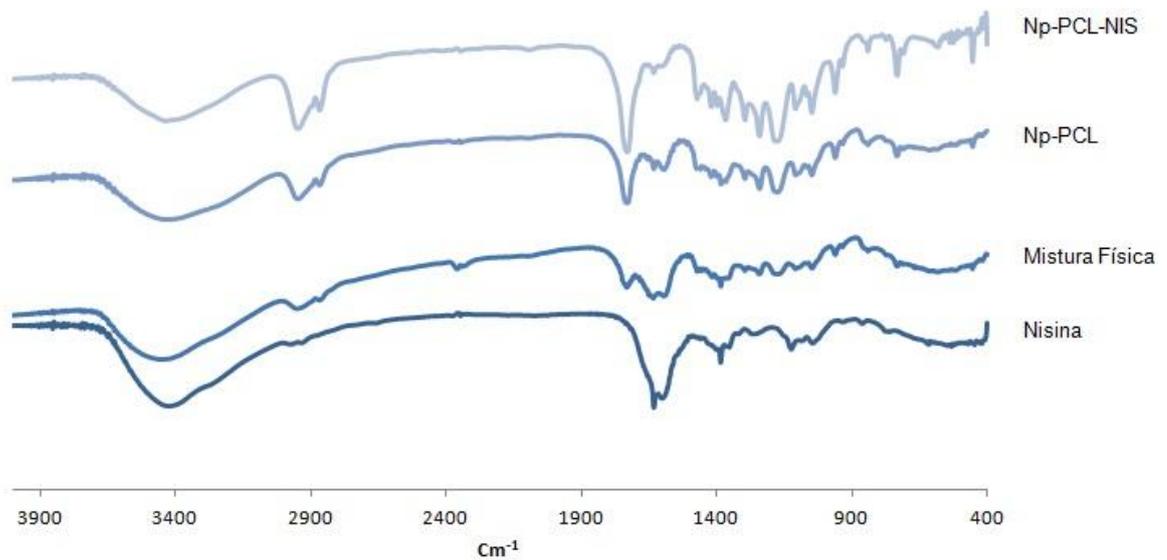


Figura 13. Espectros de IV-TF da NIS, MF, Np PCL e Np NIS

A NIS apresenta algumas bandas características relativas à estrutura de seus aminoácidos. De acordo com os padrões de IV (Figura 12), observam-se as bandas características da NIS, MF, Nanopartícula vazia e NP contendo NIS. Nas Tabelas 9 e 10 estão descritas as principais atribuições das bandas de absorção do PCL e da NIS, respectivamente.

Tabela 9. Atribuições das bandas características da PCL (ELZEIN *et al.*, 2004; ELZUBAIR *et al.*, 2006)

Número de Onda (cm⁻¹)	Modo Vibracional / Grupo Funcional
2929	Estiramento assimétrico de CH ₂
2854	Estiramento Simétrico de CH ₂
1720	Estiramento de Carbonila
1286	Estiramento de C=O e C=C na fase cristalina
1232	Estiramento Assimétrico de COC
1159	Estiramento de C-O e C-O na fase amorfa

Tabela 10. Atribuições das bandas características da NIS (XU *et al.*, 2009)

Número de Onda (cm⁻¹)	Modo Vibracional / Grupo Funcional
3414	Estiramento N--H
3248	Estiramento N--H
1627	Amida I - Estiramento C=O
1581	Amida II - Estiramento C—N, Deformação axial N--H

Analisando-se o padrão de IV-TF da NP de Nis, não se evidencia qualquer deslocamento significativo das principais bandas de absorção quando comparado aos perfis das substâncias isoladas. No entanto, observa-se a prevalência das bandas características da NIS e do polímero, confirmando que a NP apresenta os grupos funcionais de ambos os componentes, porém as bandas características da NIS apresentam uma intensidade menor quando comparadas ao peptídeo isolado.

A análise comparativa entre a mistura física e a NP demonstra um perfil de absorção similar sendo que na mistura física as intensidades de absorção estão em menor proporção. Entretanto, verifica-se que os picos referentes à NIS se encontram menos intensos no padrão da NP.

Na NP é possível observar as principais bandas características do peptídeo. A banda da Amida I (1600-1700 cm⁻¹) está relacionada ao estiramento C=O, característico de peptídeos em geral, encontra-se presente tanto na NIS isolada quanto no sistema nanoparticulado e não se faz presente na NP vazia. A Amida II (1500-1600 cm⁻¹) se relaciona com o estiramento de N-H e vibrações de N-C

também não é encontrado na NP de PCL. Pode-se dizer que a partir do IV-TF há um forte indicio de formação de um novo nanossistema, porém este resultado isolado não é suficiente para elucidação de um novo material. Logo faz-se necessário a comprovação de tal formação fazendo-se uso de outras técnicas complementares.

Xue e colaboradores (2009) demonstraram a presença das mesmas bandas características dos peptídeos ao encapsular Albumina em PCL. Mostra ainda que é possível elucidar a estrutura secundária das proteínas através do IV-TF, para isso é necessário desintegrar a banda da Amida I. A banda pode ser desintegrada em seus fragmentos por um método de ajuste de curva. A banda a 1654 cm^{-1} é atribuída a conformação α -hélice, e as bandas a 1628 e 1638 cm^{-1} são relacionadas a conformação folha- β , enquanto que as outras sub-bandas são estruturas secundárias desordenados. Sarmento e colaboradores (2006) demonstraram que a insulina também apresenta as bandas de absorção das Amidas I e II, bandas características dos peptídeos, após ser encapsulada em um complexo Alginato/Quitossana.

5.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial

A figura 14 apresenta os termogramas das amostras de NIS, Mistura Física de NIS com partículas de PCL vazias e de Np de PCL contendo NIS.

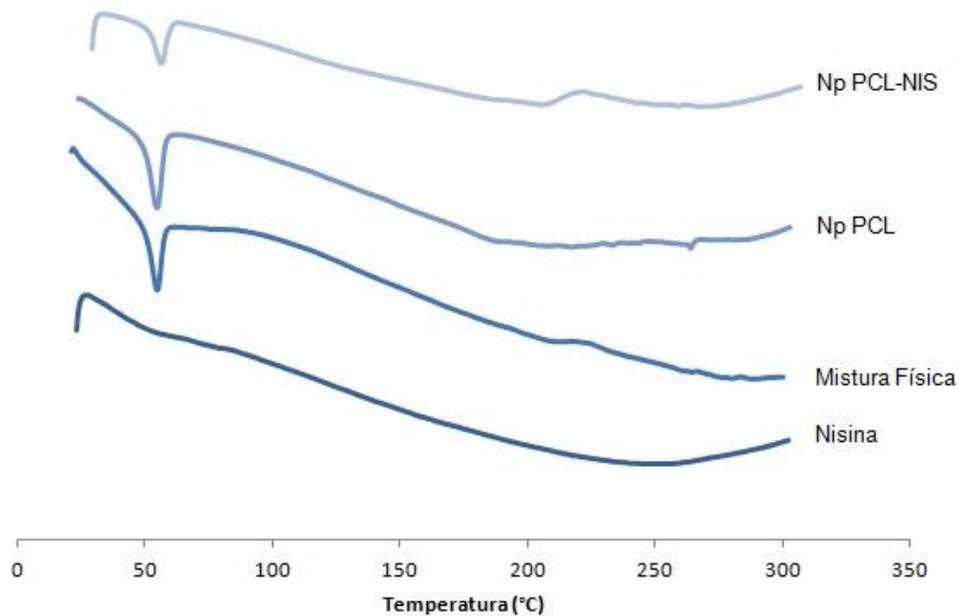


Figura 14. Curvas de DSC da NIS, MF, Np PCL e Np PCL-NIS

Os termogramas de DSC foram realizados numa tentativa de definir o estado físico do fármaco nestes carreadores e a possibilidade de interação entre o peptídeo e polímero dentro da nanopartícula (ESPUELAS *et al.*, 1997). A NIS não apresentou nenhuma mudança térmica dentro da faixa de temperatura utilizada. Já as demais amostras, que contém o polímero em sua composição, apresentaram um pico endotérmico em torno de 55°C que é correspondente a temperatura de fusão da PCL. A tabela 11 explicita as temperaturas de fusão encontradas.

Tabela 11. Temperatura de fusão observada no DSC

Amostra	Temperatura de fusão (°C)
NIS	-----
MF	54,80
Np PCL	54,82
Np PCL-NIS	56,65

O comportamento térmico da PCL está de acordo com resultados previamente descritos na literatura. O pico endotérmico em torno de 55°C, característico da fusão da PCL, também foi observado por Wan e colaboradores (2009), Soares (2009) e Monteiro (2013). Não há evidências, portanto, de interações entre a PCL e a NIS, o que indica ser o sistema nanoparticulado apto para manter a estabilidade do peptídeo no novo sistema terapêutico preparado. Em princípio, se dois componentes são misturados e completamente miscíveis entre si, somente uma Tg seria observada. Se tais componentes são parcialmente miscíveis, a mistura resultante geraria duas Tg, uma para cada componente, porém essa Tg pode ser afetada devido à interação entre os componentes, gerando uma Tg diferente das temperaturas dos componentes isolados (WAN *et al*, 2009), o que não se observa neste caso.

5.3.5. Análise Termogravimétrica

A ATG é uma técnica de análise térmica, na qual a variação de massa da amostra é determinada em função da temperatura, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada da temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a se decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão e decomposição (MONTEIRO, 2013).

A figura 15 apresenta os termogramas das amostras de NIS, MF, Np de PCL e de Np de PCL contendo NIS.

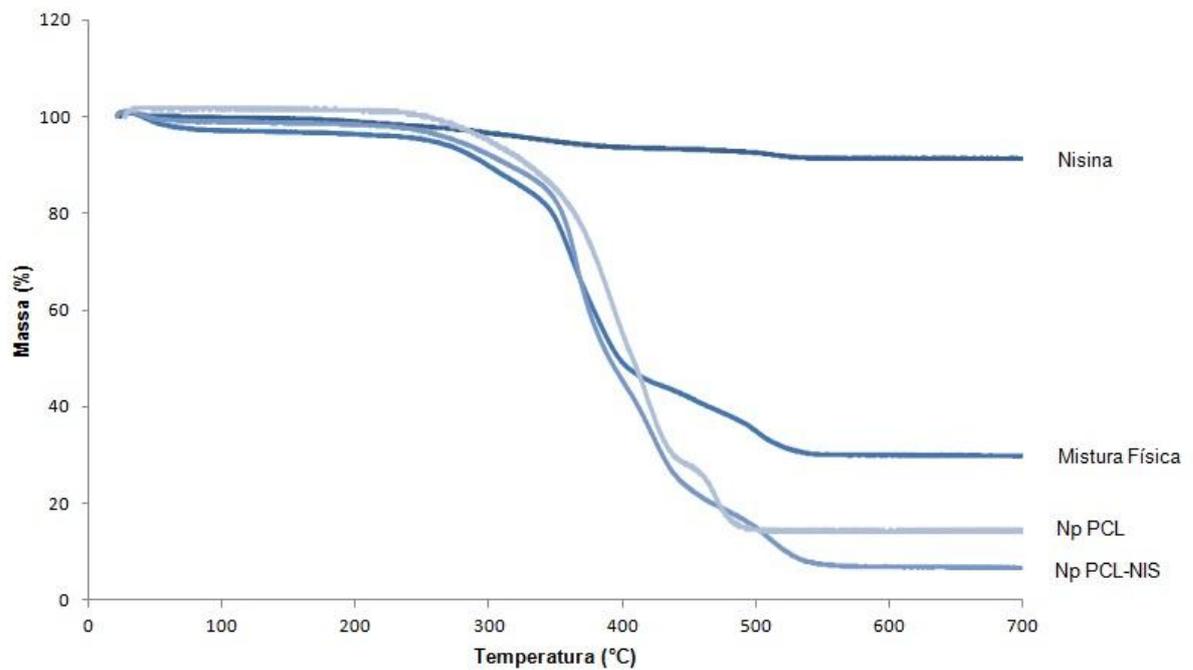


Figura 15. Termogramas da NIS, MF, Np PCL e Np PCL-NIS

Os padrões de degradação térmica, incluindo temperatura de degradação e percentuais de perda de massa são elucidados na tabela 12.

Tabela 12. Resultados das temperaturas de degradação e percentual de perda de massa

Amostra	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
NIS	423,08	3,61
Mistura Física	341,02	49,85
	494,61	10,86
Np PCL	344,05	49,04
	434,68	38,70
Np PCL-NIS	354,20	67,29
	509,66	19,33

A partir das curvas de degradação é possível observar que a NIS apresenta uma elevada estabilidade térmica, tendo apenas um evento térmico em 423,08°C que envolve uma perda de massa de 3,61%. A degradação da PCL começa em aproximadamente 260°C e a partir de 520°C quase todo polímero foi degradado. É possível observar que a perda de massa total é de cerca de 90%. Elzubair e colaboradores (2006) observaram que a degradação da PCL iniciava em cerca de 260°C e sua temperatura de degradação era em 350°C, corroborando com os resultados encontrados. A mistura física apresenta valores de temperatura de degradação semelhantes a da Np vazia, porém, apresenta uma segunda temperatura um pouco mais elevada, devido à presença do peptídeo, atuando este como uma impureza na amostra.

No caso do peptídeo encapsulado, é possível observar um ligeiro aumento da temperatura de degradação do PCL, cerca de 10°C a mais, porém com um percentual de perda de massa mais elevado. Já na temperatura de degradação relativa ao peptídeo é possível observar um aumento bastante significativo, cerca de 85°C. Logo o processo de encapsulação da NIS fornece um aumento da estabilidade térmica da mesma.

5.3.6. Difractometria de Raios-X

A figura 16 apresenta os padrões de difração de raios X das amostras de NIS, Mistura física, Np de PCL vazias e Np contendo NIS.

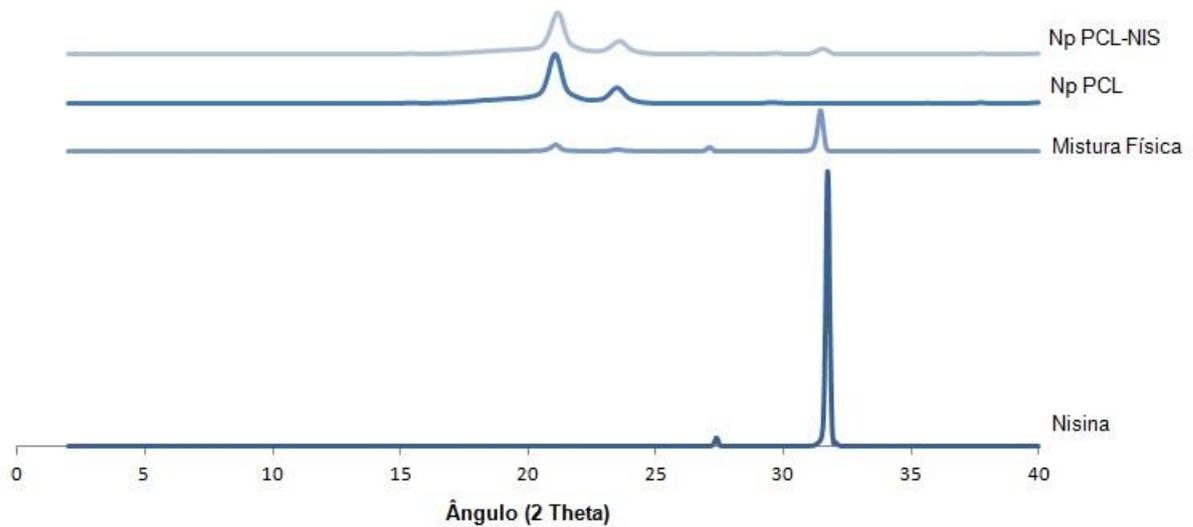


Figura 16. Padrão de difração da NIS, MF, Np PCL e NpPCL-NIS

A NIS mostrou um padrão de difração com picos bem definidos o que é uma característica de substâncias cristalinas. O difratograma das Np de PCL vazias apresentaram dois picos que se relacionam a estrutura semicristalina do polímero (PÉREZ *et al.*, 2000). O difratograma da MF apresentou padrões de difração referentes tanto à estrutura cristalina do peptídeo quanto a estrutura semicristalina da PCL. As amostras de Np contendo NIS apresentaram um padrão de difração semelhante à estrutura semicristalina da PCL. É possível observar um pico característico da NIS em 2 theta 32°, em uma intensidade bem reduzida, quando comparada a NIS livre, sendo um indício de que o peptídeo está encapsulado dentro da partícula na sua forma cristalizada, indicando um aumento na estabilidade do sistema e manutenção da da atividade da nisina.

Soares (2009), observou as que as Np de PCL contendo ZnPc apresentaram comportamento semelhante a nanopartícula vazia, sendo um grande indício de que o fármaco estaria completamente disperso na matriz polimérica na sua forma amorfa, já que não foi observado nenhum padrão de difração característico do fármaco. Jana e colaboradores (2013) ao desenvolverem Np de Alprazolam com quitosana observaram o mesmo feito observado por Soares e colaboradores, sendo um indicativo de que o fármaco encontra-se encapsulado em sua forma amorfa.

Kim & Kim (2003) observaram o mesmo resultado do presente trabalho ao prepararem Np de Acido retinóico com biotina poli (etileno-glicol) conjugado com o ácido lactobiónico contendo uma porção galactose (BEL) O padrão de difração referente ao ácido retinóico continuou presente após a encapsulação em partículas de BEL, porém em intensidade menor, sendo um indício de que o fármaco ao ser encapsulado não perdeu a sua estrutura cristalina.

5.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

As figuras 17 e 18 representam as imagens obtidas pela técnica de MEV das Npp sem o peptídeo e contendo o peptídeo, respectivamente.

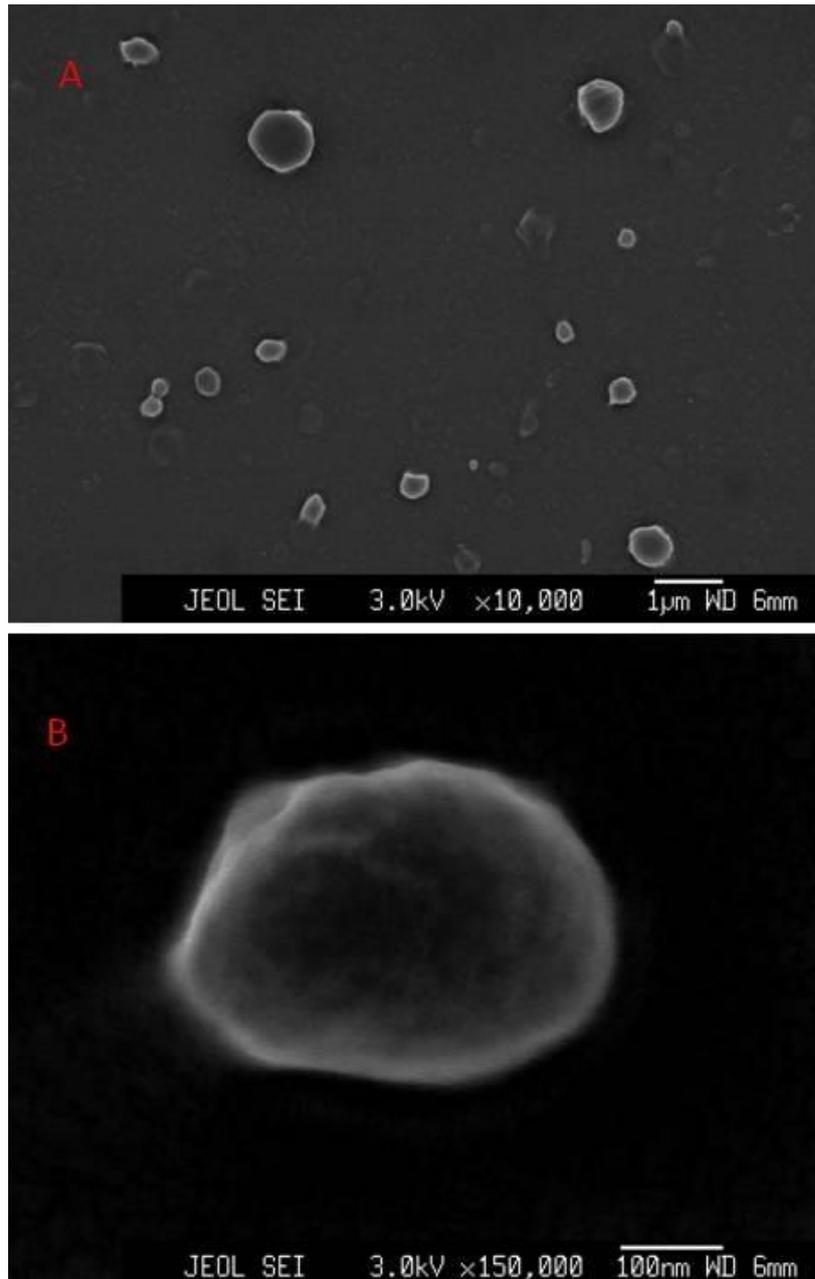


Figura 17. Fotomicrografia das Np de PCL. A) aumento de 10000 vezes. B) aumento de 150.000 vezes.

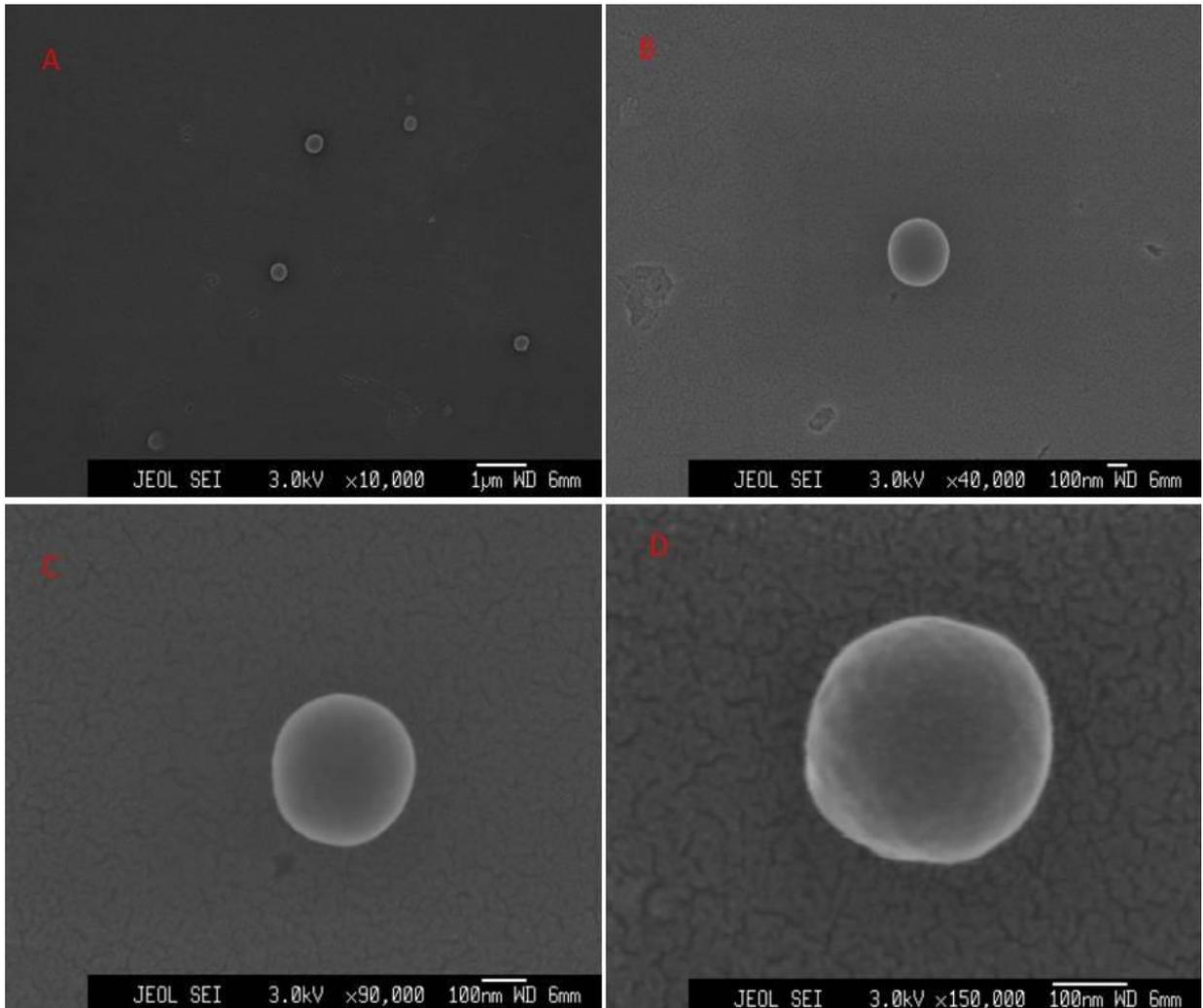


Figura 18. Fotomicrografia das Np de PCL contendo NIS. A) Aumento de 10.000vezes, B) Aumento de 40.000 vezes, C) aumento de 90.000 veses e D) Aumento de 150.000 vezes

Ao analisar as fotomicrografias é possível observar que as Np de PCL, sem o peptídeo, apresentam forma esférica, com bordas indefinidas e é possível verificar a presença de gotículas no interior da Np, confirmando o método de preparação utilizando devido à formação de sistemas A/O/A. As Np contendo NIS apresentaram um formato mais regular quando comparadas as Np sem o peptídeo. É possível ainda verificar que o tamanho das Np observado pela microscopia corrobora com os resultados obtidos pelo DLS. Em ambos os casos pode-se observar que não há presença de poros nas Np e nem de aglomerados poliméricos no sistema.

Mukerjee e colaboradores (2007) desenvolveram Np de PCL com albumina, também pelo método de dupla emulsificação, utilizando PVA como agente emulsificante, e observaram Np com formatos esféricos, porém com presença de poros o que não foi observado no presente estudo. Nas últimas décadas, avanços na área de nanotecnologia têm feito da Microscopia eletrônica uma ferramenta indispensável para a avaliação e preparo de nanossistemas. O desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados requer a caracterização por técnicas avançadas que permitam a captação de imagens de alta resolução, compreensão de nanoestruturas e incremento de estratégias de síntese (GAUMET *et al.*, 2008).

Existem diversos métodos disponíveis para caracterização de Np, principalmente em termos de tamanho, mas nenhuma delas é totalmente satisfatória. Portanto, torna-se necessário a combinação de mais de um método, dentre os quais um deles deve ser microscópico (GAUMET *et al.*, 2008).

Observou-se também que as dimensões medidas por MEV são compatíveis com aquelas obtidas por espalhamento de luz, confirmado desta maneira estes últimos resultados.

5.4. Atividade Antifúngica

O teste de Atividade antifúngica foi realizado a fim de verificar se a incorporação do peptídeo em um sistema polimérico afetaria a atividade por ele desempenhada. A técnica de *pour plate* com contagem de células foi escolhida para realização desse estudo. Os resultados de contagem de células estão elucidados na figura 19.

Atividade Antifúngica (Recém preparada)

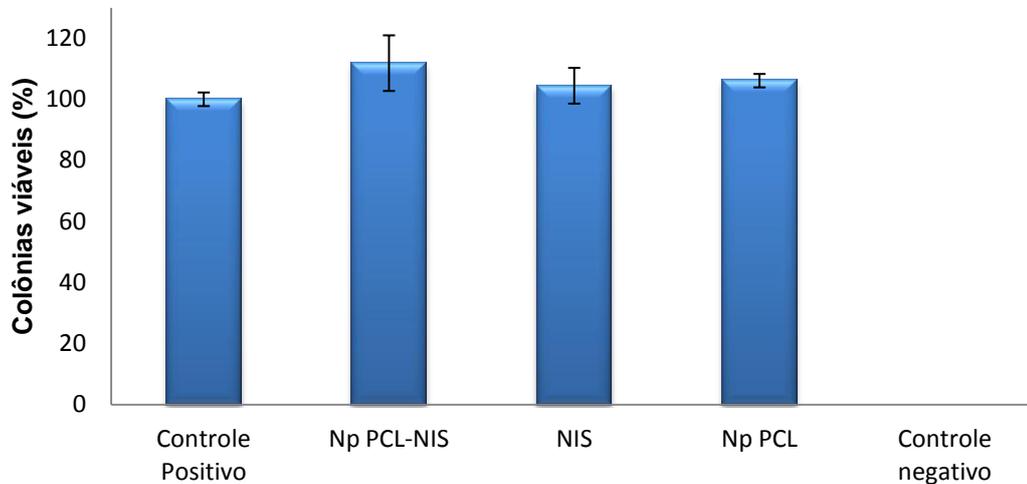


Figura 19. Gráfico de contagem de colônias viáveis nos sistemas recém-preparados

O peptídeo recém-diluído, a suspensão de Np de PCL e de Np PCL-NIS recém-preparada foram adicionados à placas de *petri* estéreis contendo o inoculo de células. Após 48h de incubação, observou-se o controle negativo, contendo apenas meio de cultura, não apresentou nenhum crescimento, o que já era esperado já que não havia inoculo de células nessa placa. Observou-se, também, que nem as Np nem o peptídeo isolado apresentaram atividade antifúngica. Concluiu-se então que a solubilidade da NIS poderia ser afetada devido à precipitação em formas de microcristais e sendo ressolubilizada com o passar do tempo. Sendo assim, foi realizada uma cinética de atividade. As Np PCL-NIS e a NIS isolada foram solubilizadas em água e retiradas alíquotas desse preparado nos 24h, 48h e 72h após a solubilização e incubadas por 48h a 32°C. Tais resultados encontram-se na figura 20 e tabela 13.

Atividade Antifúngica

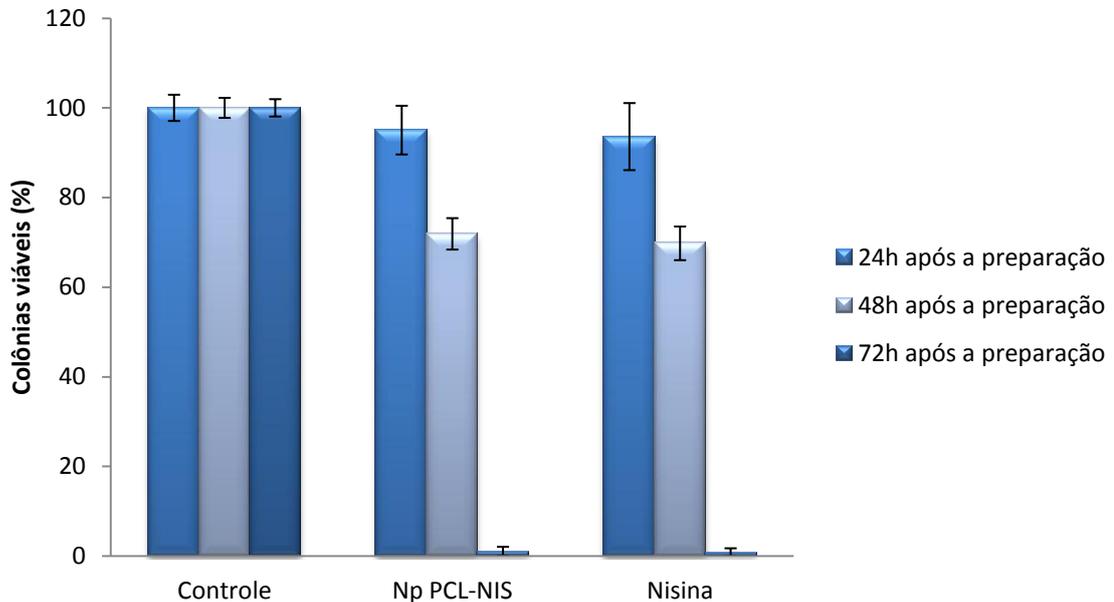


Figura 20. Gráfico de contagem de colônias viáveis em cada preparação nos tempos 24h, 48h e 72h após a preparação/solubilização do sistema nanométrico/nisina isolada.

Tabela 13. Percentual de colônias viáveis no controle, Np e NIS nos tempos 24h, 48h e 72h após a preparação/solubilização do sistema nanométrico/nisina isolada.

Amostra	% colônias viáveis 24h	% colônias viáveis 48h	% colônias viáveis 72h
Controle	100 ± 2,92	100 ± 2,23	100 ± 1,94
Np	95,03 ± 5,43	71,88 ± 3,51	1,05 ± 0,99
NIS	93,58 ± 7,48	69,77 ± 3,75	0,84 ± 0,88

De acordo com a análise estatística observou-se que os resultados das Np contendo NIS e do peptídeo isolado são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Em todos os tempos testados, o peptídeo isolado e a Np contendo NIS, não demonstraram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Logo é possível concluir que a atividade da NIS não é comprometida após a sua encapsulação em Np de PCL. Especula-se que tal resultado foi obtido devido à NIS utilizada não ser o peptídeo puro. Tal peptídeo

encontra-se comercialmente disponível apenas na concentração de 2,5%. Logo esse tempo de 72h pode ser o tempo necessário para que o peptídeo adquira sua conformação ideal para apresentar a atividade desejada.

Há diversos relatos na literatura explicitando a atividade antibacteriana da NIS, porém poucos relatando a sua atividade antifúngica. Alguns autores descrevem que esse peptídeo apresenta nenhuma ou pouca atividade contra bactérias gram negativas, fungos e vírus (ARAUZ, 2009; LOZALO, 2005). Le Lay e colaboradores (2008) determinaram a eficiência da NIS contra infecções causadas por *Candida*. Em 2009 Guta e colaboradores, investigaram o uso da NIS como contraceptivo vaginal, devido a sua atividade espermicida e propuseram uma possível avaliação da NIS como antimicrobiano para prevenção de infecções vaginais.

A patogenia da *Candida albicans* também pode ocorrer através da transição da forma de blastoconídeos para a forma de hifas. Le Lay e colaboradores (2008) observaram que a NIS Z diminuiu essa transição, embora a inibição não tenha sido total. Devido a tal afirmativa, Akerey e colaboradores (2009) realizaram testes para verificar a concentração mínima inibitória da NIS verificando a adesão celular e passagem das cepas das formas de blastoconídeos para formas de hifas. A transição foi inibida significativamente (50% de inibição) a partir de 25 ug/ml e este efeito era dependente da dose administrada. Esses resultados demonstraram pela primeira vez que a NIS, em concentrações não tóxicas para as células humanas, é ativa contra a passagem de *C. albicans*, sugerindo a utilização da NIS como agente antifúngico. Devido a tais resultados, tendo a eficácia antifúngica da NIS comprovada, pode-se verificar a viabilidade da utilização das nanopartícula para patologias causadas pela espécie *Candida albicans*.

5.5. Liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação *in vitro* foi realizado a fim de observar a quantidade de massa de NIS liberada por unidade de tempo. Esse ensaio constitui

uma etapa importante no desenvolvimento de formulações. As condições *in vitro* devem mimetizar ao máximo as condições *in vivo* (SOARES, 2009).

A membrana de acetato de celulose utilizada serve como suporte para separar a formulação do meio receptor. Essa membrana deve atender algumas prerrogativas, dentre elas: ser quimicamente inerte, para não reagir com a formulação ou com o meio receptor, não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação de fármacos(SOARES, 2009).

Durante todo o tempo de experimento as Np mantiveram-se em suspensão, não ocorrendo deposição da mesma e o meio receptor manteve-se transparente indicando que a integridade do saco de diálise foi mantida. O meio receptor utilizado foi o tampão acetato pH 4,0 devido ao fato de a NIS ser mais solúvel em pH baixos e este valor se aproximar mais ao pH da vagina (3,8 -4,2) (ALEXANDER *et al.*, 2004). Salmaso e colaboradores (2004) desenvolveram Np de NIS com PLA e concluíram que quanto menor o pH maior a porcentagem de NIS liberada.

O perfil de liberação da NIS nas Np de PCL estão demonstrados na figura 21 e na tabela 14.

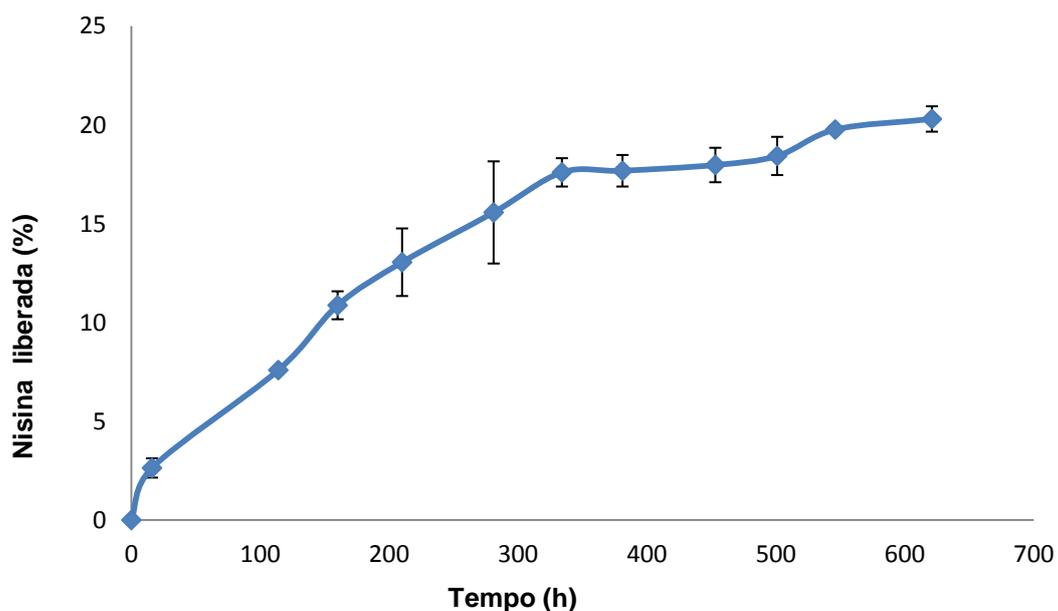


Figura 21. Perfil de liberação da NIS em Np de PCL

Tabela 14. Concentração e percentual liberado de NIS por unidade de tempo

Tempo (h)	Massa Liberada (μg)	% liberado
0	0	0
16	37,06 \pm 5,52	2,64 \pm 0,49
114	107,09 \pm 3,31	6,75 \pm 1,13
160	153,21 \pm 4,42	10,48 \pm 0,16
210	183,71 \pm 17,45	13,09 \pm 1,78
281	219,06 \pm 28,50	15,56 \pm 2,59
334	248,16 \pm 1,10	17,59 \pm 0,72
381	249,28 \pm 2,21	17,68 \pm 0,80
453	253,38 \pm 3,09	17,97 \pm 0,87
501	259,82 \pm 4,20	18,42 \pm 0,97
546	278,92 \pm 10,41	19,76 \pm 0,02
621	286,30 \pm 1,34	20,30 \pm 0,64

O ensaio mostrou a liberação da NIS de forma lenta e sustentada. Após 16 h de ensaio apenas 2% do peptídeo havia sido liberado. Após 114h (aproximadamente 5 dias) foram liberados cerca de 6%. Do dia 14 ao dia 20 Não houve um aumento significativo da concentração de peptídeo liberada. Somente após 621 h obteve-se uma liberação superior a 20% da massa total evidenciando o perfil de liberação prolongada que a formulação possui. Deve se considerar que uma vez internalizada na mucosa vaginal, ou quando internalizada pela *Candida albicans*, estas nanopartículas liberarão seu conteúdo de NIS mais rapidamente, podendo se especular na eficiência deste sistema para prevenção de candidíases e patologias associadas

A PCL é um polímero hidrofóbico, semicristalino e resistente a pH ácidos, logo a degradação do polímero nessas condições pode ser lenta, levando a formação de um sistema de liberação prolongada de fármacos (BENOIT, BARAS & GILLARD, 1999). Np de PCL podem ser utilizadas como sistemas de liberação prolongada, podendo levar até 1 ano para liberação completa do fármaco (SINHÁ *et al.*, 2004)

Os perfis de liberação dos fármacos a partir de NPs dependerão da natureza do sistema de liberação. Alguns fatores podem influenciar a liberação de fármacos

em sistemas nanoparticulados, dentre eles a desorção do fármaco adsorvido na superfície polimérica, a difusão do fármaco pela matriz polimérica, a erosão do polímero e os processos de erosão e difusão combinados (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Ma e colaboradores (2011) desenvolveram Np de PCL com docetaxel e obtiveram um perfil de liberação semelhante ao encontrado no presente estudo. Em que apenas 18,25% do fármaco foi liberado durante um período de 28 dias. Salmasso e colaboradores (2004) desenvolveram Np de NIS com PLA e obtiveram liberação de cerca de 25% da massa total de NIS ao final de 1000h. Eles puderam concluir que a grande parte do peptídeo ficava retido na matriz polimérica

Jameela e colaboradores (1996) demonstraram que a PCL apresenta boa permeabilidade a peptídeos e proteínas e ao contrário do PLA e PLGA, a PCL se degrada muito lentamente e não gera um ambiente ácido. Foram desenvolvidas NPs de PCL com Albumina pelo método de dupla emulsificação e demonstraram o perfil de liberação prolongada do sistema, em seis meses aproximadamente 60,5% da proteína havia sido liberada.

Além do perfil de liberação do fármaco, faz-se necessário o conhecimento do fluxo e do modelo de cinética de liberação, no qual, o sistema pertence. Tais resultados foram calculados utilizando a faixa mais linear do perfil de liberação apresentado. Existem algumas teorias e modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica. Os modelos de liberação mais utilizados e que melhor descrevem o fenômeno de liberação de fármacos são, em geral, os modelos de Higuchi, de cinética de ordem zero, de cinética de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas (DASH *et al.*, 2010).

O primeiro exemplo de um modelo matemático destinado a descrever a liberação do fármaco a partir de um sistema de matriz foi proposto por Higuchi em 1961. Esse modelo visava o estudar a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis em matrizes semi-sólidas e sólidas e descrever a liberação de um fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo (DASH *et al.*, 2010). O modelo de Higuchi é representado pela seguinte equação:

$$Q_t = KH + t^{1/2},$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

KH = constante de liberação de Higuchi.

A cinética de ordem zero é aplicada para formas farmacêuticas que não desagregam, liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo. Trata-se de um método ideal para sistemas de liberação prolongada, já que a liberação do fármaco ocorre lentamente (DASH *et al.*, 2010)

Este modelo pode ser representado pela equação a seguir:

$$Q_t = Q_0 + K_0t,$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução;

K_0 = constante cinética.

A cinética de primeira ordem é aplicada em formas farmacêuticas que a liberação é proporcional à quantidade de fármaco que permanece no seu interior, de tal modo, que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (DASH *et al.*, 2010). A equação que representa esse modelo é a seguinte:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t,$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução;

K_t = constante de liberação de primeira ordem

A cinética de liberação de Korsmeyer-Peppas é utilizada para descrever a liberação de sistemas poliméricos. Nesse modelo de liberação os dados são plotados em um gráfico *log* da quantidade liberada versus *log* do tempo (DASH *et al.*, 2010).

Todos os quatro modelos foram aplicados a fim de se obter o mais indicado para o perfil de liberação da NIS. A escolha foi realizada a partir do coeficiente de correlação linear. Os resultados encontram-se expostos na tabela 15.

Tabela 15. Resultados da cinética de liberação

Higuchi	Ordem Zero	Primeira Ordem	Korsmeyer-Peppas
$R^2 = 0,981$	$R^2 = 0,987$	$R^2 = 0,877$	$R^2 = 0,991$
$r = 0,990$	$r = 0,993$	$r = 0,937$	$r = 0,995$

Após a aplicação dos modelos matemáticos e a determinação dos valores de coeficiente de correlação linear (r), o modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que apresentou o maior coeficiente de correlação linear e, com isso, foi o modelo que melhor se ajustou ao perfil de liberação das Np preparadas. Por se tratar de um sistema polimérico era possível inferir que o melhor modelo seria o Korsmeyer-Peppas (DASH *et al.*, 2010). Porém o modelo de Higuchi e o de ordem zero também apresentaram coeficiente de correlação satisfatórios. De acordo com esses resultados, verifica-se que a liberação do peptídeo se dá através do mecanismo de difusão.

Conforme os resultados obtidos, é possível utilização do nanossistema produzido como um mecanismo de liberação prolongada, já que a liberação do fármaco ocorre lentamente e não acontece a erosão do polímero. O modelo de

Korsmeyer-Peppas baseia-se na Lei de Fick. Este modelo é usado para descrever a liberação do soluto, quando o mecanismo predominante é uma combinação de difusão do fármaco e transporte Fickiano. Tal modelo é controlado pelo relaxamento das cadeias de polímeros (JOSE *et al.*, 2013).

A cinética de liberação da NIS das Np pelo modelo de Korsmeyer-Peppas pode ser observada na figura 22.

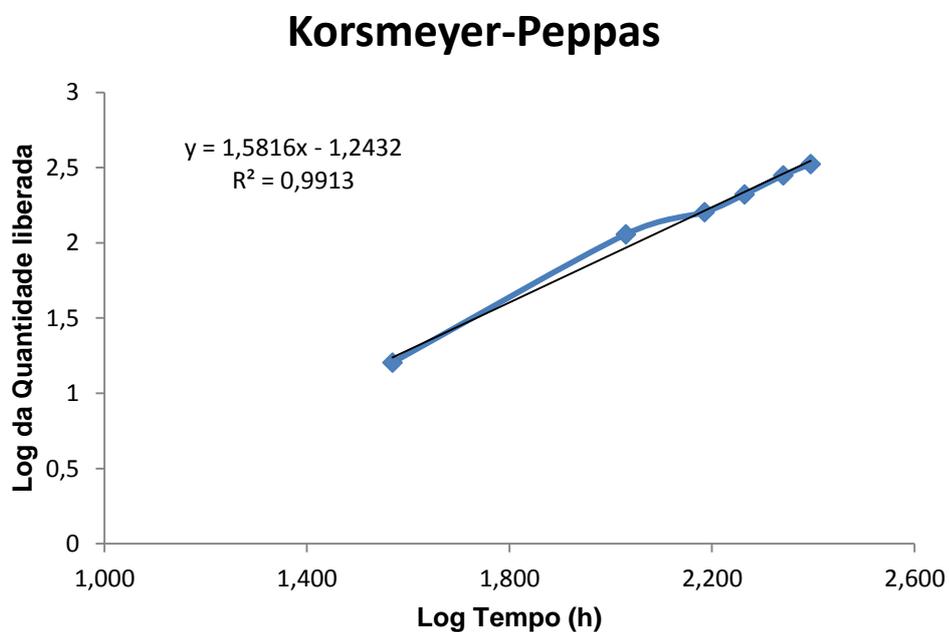


Figura 22. Cinética de Liberação da NIS encapsulada, segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas.

A partir dos dados de perfil de liberação (Tabelas 21 e 22) foram determinados, matematicamente, o fluxo e o *lag time* baseado no modelo de cinética obedecido para formulação, conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de Fluxo e *Lag Time*

Fluxo J ($\mu\text{g}/\text{min}$)	<i>Lag Time</i> (h)
0,722 \pm 0,04	28,15 \pm 0,03

A determinação do fluxo de liberação J foi obtida pelo valor de inclinação da reta. O Valor de fluxo encontrado foi de 0,722 $\mu\text{g}/\text{min}$. Por se tratar de um sistema de liberação prolongada, já era de se esperar que o valor de fluxo encontrado fosse baixo. Já o *lag time*, ou seja, o tempo em que o fármaco começa a ser liberado foi de 28,15 h, indicando um tempo de latência bem elevado, sendo este mais um indicio de que a formulação desenvolvida pode ser um promissor sistema de liberação prolongada para aplicação vaginal.

De acordo com o teste de liberação observa-se que em 72h há a liberação de cerca de 5%, correspondente a uma concentração de 9,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em 72h observa-se também que a atividade antifúngica da NIS isolada é estatisticamente igual a da NIS incorporada no sistema polimérico. Tal fato não deveria ser observado, já que a concentração de NIS liberada pelo sistema polimérico estaria abaixo da concentração mínima inibitória (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e diferente da concentração utilizada na nisina livre (93 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Sendo assim pode-se inferir que a Np está sendo degradada enzimaticamente no interior no fungo, fazendo com que a Np se comporte como o peptídeo livre.

6. Conclusões

O MDEES pode ser utilizado para a encapsulação de Nis em Np de PCL já que apresentou rendimento satisfatório e elevada eficiência de encapsulação.

O método espectrofotométrico utilizado demonstrou-se específico para os aminoácidos da nisina.

A análise do tamanho de partículas demonstrou partículas com tamanho acima de 300 nm. Sendo assim o aumento do tempo de aplicação de energia ultrassônica demonstrou-se eficiente na redução do tamanho de partículas.

As análises de DSC, TGA, FTIR, e de DRX demonstraram que possivelmente houve uma interação entre NIS e a PCL semicristalina após a encapsulação nas Np, além de conceder um aumento de estabilidade térmica a nanopartícula contendo peptídeo.

A técnica de MEV demonstrou morfologia adequada e comprovou o tamanho de partículas obtido pelo DLS.

O teste de atividade antifúngica demonstrou que o fato da NIS estar encapsulada em um sistema polimérico não reduz, ou interfere na sua atividade antifúngica.

O teste de liberação demonstrou que as Np desenvolvidas apresentam perfil de liberação prolongada, já que em 25 dias cerca de 20% NIS foi liberada do sistema polimérico, além de apresentar um fluxo de 0,722 µg/min e um *lag time* de 28,15 h.

A nisina pode ser utilizada como um agente profilático de candidíase vaginal recorrente.

7. Perspectivas

Com os resultados promissores obtidos com o presente trabalho propõe-se:

- O estudo da estabilidade da nisina nas Np utilizando o teste de dicroísmo circular.
- Desenvolvimento de uma forma farmacêutica mucoadesiva para incorporação das Np.
- Avaliação da atividade antifúngica das Np em cepas de *Candida albicans* resistentes.
- Teste de permeação e acúmulo utilizando mucosas de vagina de suínos.

8. REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. **Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisonin.** International Journal of Microbiology v.28, p.169-185, 1995
- AGUIAR, M.M.G.B.; ALBUQUERQUE, R.P.; MARINHO, D.S.; BRAGA B.R.; DORNELAS, C.B.; OLIVEIRA, A. DE SOUSA, V.P.; TORRES, S.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; CABRAL, L.M.; HOLANDINO, C. **Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination.** Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 36, n. 5, p. 594-600, 2010.
- AGUZZI, C; CEREZO, P.; VISERAS, C.; CARAMELLA, C.; **Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations.** Applied Clay Science, 36, p. 22 – 36, 2007.
- AHMAD, A., KHAN, A., MANZOOR, N. KHAN, L.A. **Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against Candida.** Microbial Pathogenesis, v. 48, p. 35-41, 2010.
- AKEREY, B.; LE-LAY, C.; FLISS, I.; SUBRADEZ, M.; ROUABHIA, M. **In vitro efficacy of nisin Z against Candida albicans adhesion and transition following contact with normal human gingival cells.** Journal of applied Microbiology v. 107, n.4, p. 1298-1307, 2009
- AKPAN, A. & MORGAN, R. **Oral Candidiasis.** Postgraduate Medical Journal, v. 78, p. 455-459, 2002.
- ALANGADEN, G.J. **Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention.** Infectious Disease Clinics of North America, v. 25, p. 201-225, 2011.
- ALEXANDER, N.J.; BAKER, E.; KAPTEIN, M.; KARCK, U.; MILLER, L.; ZAMPAGLIONE, E. **Why consider vaginal drug administration?** Fertility and Sterility, v. 82, n. 1, p. 1-12, 2004.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. **Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials.** Material Science Engineering R: Reports 28 (1), p. 1-63, 2000.
- ALVES, P. M.; QUEIROZ, I. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. **Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro da plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero Candida.** Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 42, n.2, p. 222-224, 2009

ANSEL, H.C.; ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2007.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. **Nisin biotechnological production and application: a review.** Trends in Food, Science and Technology v.20, p. 146-154, 2009

BARBOSA, G.M. **Atividade antifúngica de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade em leveduras de *Candida albicans*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

BENOIT, M.A.; BARAS, B.; GILLARD, J. **Preparation and Characterization of Protein-loaded Poly(ϵ -caprolactone) Microparticles for Oral Vaccine Delivery.** International Journal of Pharmaceutics v. 184, p. 73-84, 1999

BRAGA-SILVA, L.A.; SANTOS, A.L.S. **Aspartic Protease Inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis.** Current Medicinal Chemistry, v. 18, n. 16, p. 2401-2419, 2011.

BROWN A.J.P., HAYNES K., QUINN J. **Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity.** Curr Opin Microbiol. v.12, p.384-391, 2009

CAMPOS, V.E.B. **Estudo da Potencialidade de Ácidos Aminados Encapsulados em Nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona para uso na Eletroterapia do Câncer.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

CANUTO MM, RODERO FG. **Antifungal drug resistance to azoles and polyenes.** The Lancet Infectious Diseases v.2, p.550-563, 2002.

CHAWLA, J.S.; AMIJI, M.M. **Biodegradable poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen.** *Int. J. Pharm.*, v. 249, p. 127-138, 2002.

CHEIGH, C.I.; PYUN, Y.R. **Nisin biosynthesis and its properties.** *Biotechnology Letters* v.27 p.1641–1648, 2005.

CLEVELAN, J.; THOMAS, J. M.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M. L. **Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.** International Journal of Food Microbiology, v.71 p. 1-20, 2001.

COWEN L.E., ANDERSON J.B., KOHN L.M. **Evolution of drug resistance in *Candida albicans*.** Annual Review of Microbiology, v. 56, p. 139-165, 2002

DAS, N.G.; DAS, S.K. **Controlled-release of oral dosage forms.** Formulation, Fill & Finish – Pharmaceutical Technology, v. 27, p. 10-16, 2003.

DASH, S.; MURTHY, P.N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. **Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems**. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research. V.64, n. 3, p. 217-223, 2010

DE VOS, W.M.; MULDER, J.W.; SIEZEN, R.J.; HUGENHOLTZ, J. E.; KUIPERS, O.P. **Proprieties of nisin Z and distribution of its gene, nisZ, in Lactococcus latis**, Appl. Environ. Microbiol. V.59, p.213-218, 1993

DELLENBACH, P.; THOMAS, J.-L.; GUERIN, V.; OCHSENBEIN, E.; CONTET-AUDONNEAU, N. **Topical treatment of vaginal candidosis with sertaconazole and econazole sustained-release suppositories**. International Journal of Gynecology & Obstetrics v. 71, n.1, p. 47-52, 2000.

DOROCCA-BOBKOWSKA, B. KONOPKA, K.; DÜZGÜNES, N. **Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells *in vitro***. Archives of Oral Biology, v. 48, n. 12, p. 805-814, 2003

EGGIMANN, P.; GARBINO, J. & PITTET, D. **Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients**. The Lancet Infectious Diseases. V.3, n.11, p. 685-702, 2003

ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; DUMAS, P. **FTIR Study of polycaprolactone chain organization at interfaces**. J. Colloid Interface Sci. v. 273 n.2 p. 381-387, 2004

ELZUBAIR, A.; ELIAS, C.N.; SUAREZ, J.C.M.; LOPES, H.P.; VIEIRA, M.V.B. **The Physical Characterization of a thermoplastic polymer for endontic obturation**. Journal of Dentistry v.34 n.10 p. 784-789, 2006.

EPSTEIN, J. B. & POLSKY, B. **Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies**. Clinical Therapeutics, v. 20, n. 1, p. 40-57, 1998.

ESPINEL-INGROFF A. **Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi**. Revista Iberoamericana de Micologia v 25, p. 101-106, 2008

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.P.; YGARTUA, P. **Poly(ϵ -Caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity**. International Journal of Pharmaceutics, v. 158, p. 19 – 27, 1997.

FARAH, C.S.; ASMAN, R.B.; CHALACOMBE, S.J. **Oral Candidosis. Clinics in Dermatology, v.18, n.15, p.553-563, 2000.**

FARIA-TISCHER, P.C.; TISCHER, C. A. **Nanobiotechnology, biomaterials and biological application of nanostructures, Review**. Biochemistry and Biotechnology Reports v.1, n.1 p. 32-53, 2012

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. **Impact of nanotechnology on drug delivery.** ACS Nano, v. 3 (1), p. 16-20, 2009.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A.M.; LAFONT, O. **Primidone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles.** International Journal of Pharmaceutics, v. 193, p. 107 – 111, 1999.

FERRER, J. **Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors.** International Journal of Gynecology & Obstetrics, v. 71, p. 21-27, 2000.

GARTI, N.; BISPERINK, C. **Double Emulsions: Progress and applications.** Curr. Opin. Colloid Interface v.3, p.657-667, 1998.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F.. **Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. V. 69, p. 1–9, 2008.

GUPTA, S.M.; ARANHA, C.C., BELLARE, J.R.; REDDY, K.V.R. **Interaction of contraceptive antimicrobial peptide nisin with target cell membranes: implications for use as vaginal microbicide.** Contraception v.80, n. 3, p. 299-307, 2009

HAC-WYDRO, K. & DYNAROWICZ-LATKA, P. **Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Lagmuir monolayers - the role of a phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action.** Biophysical Chemistry, v. 123, p. 154-161, 2006.

HAM, A.S.; COST, M.R.; SASSI, A.B. DEZZUTTI, C.S.; ROHAN, L.C. **Targeted Delivery of PSC-RANTES for HIV-1 Prevention using Biodegradable Nanoparticles.** Pharmaceutical Research, v. 26, p.502-511, 2008

HAN, Y.A.; SINGH, M.; SAXENA, B.B. **Development of vaginal rings for sustained release of nonhormonal contraceptives and anti-HIV agents.** Contraception v.76, n.2, p. 132-138, 2007

HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. **Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting.** Current Opinion in Solid State & Material Science, v.6, p. 319 – 327, 2002.

HOLANDA, A.R.R.; FERNANDES, A.C.S.; BEZERRA, C.M.; FERREIRA, M.A.F.; HOLANDA, M.R.R.; HOLANDA, J.C.P.; MILAN, E.P. **Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 29, n.1, p. 3-9, 2006.

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

JAMEELA, S.R.; SUMA, N.; MISRA, A.; RAGHUVANSHI, R. GANGA, S.; JAYAKRISHNAN, A. **Poly (ϵ -Caprolactone) microspheres as a vaccine carrier.** Current Science v. 70, p. 669-671, 1996

JANA, S.; MAJI, N.; NAYAK, A.K.; SEM, K.K.; BASU, S.K. **Development of chitosan-based nanoparticles through inter-polymeric complexation for oral drug delivery.** Carbohydrate Polymers v.98, n.1, p.870-876, 2013

JELVEHGARI, M.; BARAR, J.; VALIZADEH, H.; HEIDARI, N. **Preparation and Evaluation of Poly (ϵ -caprolactone) Nanoparticles-in-Microparticles by W/O/W Emulsion Method.** Iranian Journal of Basic Medical Sciences, v.13, n. 3, p. 85-96, 2010

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE Y.; YIP, H.K. **Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars.** Archives of Oral Biology, v. 49, n.10, p. 789-798, 2004.

JAHANSHAHI, M.; BABAEI, Z. **Protein Nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles.** African Journal of Biotechnology, v.7, n. 25, p. 4926-4934, 2008

JOSE, S.; FANGUEIRO, J.F.; SMITHA, J.; CINU, T.A.; CHACKO, A. J.; PREMALETHA, K.; SOUTO, E.B. **Predictive Modeling of Insulin release Profile from Cross-linked Chitosan Microspheres.** European Journal of Chemistry v. 60, p. 249-253, 2013

JOZALA, A.F. **Produção de Nisina por *Lactococcus latis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo.** São Paulo, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2005.

KADIR, T.; GÜMRÜ, B.; UYGUN-CAN, B. **Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production.** Archives of Oral Biology, v. 52, n. 7, p. 691-696, 2007.

KIM, I.S.; KIM, S.H. **Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety.** International Journal of Pharmaceutics v.257, n.1-2, p. 195-203, 2003

KIM, Y.T; SHIN, B.K.; GARRIPELLI, V.K.; KIM, J.K.; DAVAA, E.; JO, SEONGBONG, J.; PARK, J.S. **A thermosensitive vaginal gel formulation with HP γ CD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B.** European Journal of Pharmaceutical Sciences v. 41, n.2, p. 399-406, 2010

KOO, J. H.; **Polymer nanocomposites: Processing, characterization and applications.** 1 ed. McGraw-Hill, 2006.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I; ONYUKSEL, H. **Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* V. 1, p. 193– 212, 2005.

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

LAI, S.K.; WANG, Y.Y.; HIDA, K.; CONE, R.; HANES, J. **Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 2, p. 598-603, 2010.

LARIDI, R., KHEADR, E. E., BENECH, R. O., VUILLEMARD, J. C., LACROIX, C., & FLISS, I. **Liposome encapsulated nisin Z: optimization stability and release during milk fermentation.** *International Dairy Journal* v.13, p.325-336, 2003.

LE LAY, C.; AKEREY, B.; FLISS, I.; SUBIRADEZ, M.; ROUABHIA, M. **Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form.** *Journal of Applied Microbiology*, 105 pag 1630–1639, 2008

LINHARES, I.M.; GIRALDO, P.C.; CAETANO, M.E.; NISSAN, M.D.; GONÇALVES, A.K.S.; GIRALDO, H.P.D. **Candidíase vulvovaginal recorrente: fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento.** *Revista de ciências médicas (Campinas)*, v. 14, n. 4, p. 373-378, 2005

MA, Y.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; JIANG, L.; CHEN, H.; LIU, R.; HUANG, L.; MEI, L. **Novel Docetaxel-loaded Nanoparticles based on PCL-Tween 8- Copolymer for Cancer Treatment.** *International Journal of Nanomedicine.* V.6, p. 2679-2688, 2011

MATTOS-JUNIOR, A. **Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Orais de Liberação Prolongada contendo Nanocompósitos de Silicatos Lamelares de Rivastigmina para o Tratamento da Doença de Alzheimer.** Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010

MCCATHIE, R. **Vaginal discharge: common causes and management.** *Current Obstetrics & Gynaecology*, v. 16, n. 4, p. 211-217, 2006.

MCCULLOUGH, M.J.; ROSS, B. C. READE, P. C. ***Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation.** *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* v. 25 p.136-144, 1996

MELO, N.R.; SOARES, N. F.F.; GONÇALVES, M. P. J. C, **Nisina: um conservante natural para alimentos,** revista *Ceres*, 52 (303), pag 921-938, 2005

MENEZES, E.A.; MENDES, L.G.; CUNHA, F.A.; **Antifungal resistance of *Candida tropicalis* isolated in the State of Ceará, Review,** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 42, n. 3 p.354-355, 2009

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y.. **Nanoparticles – A Review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* V. 5, p. 561-573, 2006.

MONTEIRO, M.S.S.B. **Desenvolvimento e Caracterização de Híbridos de Policaprolactona contendo Nevirapina**. Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Ciencia e Tecnologia de Polímeros) – Instituto de Macromoléculas Professora Heloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013

MUKERJEE, A.; SINHA, V.R.; PRUTHI, V. **Preparation and Characterization of Poly- ϵ -caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery**. *Journal of Biomed & Pharml Engg*, v.1, n.1, p. 40-44, 2007

MURRAY, P. **Microbiologia Médica**, 5ª Edição, Elsevier. Rio de Janeiro - 2006
 NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. **Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003

NASCIMENTO, M. S.; FINATTI, D. P.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. **Atividade antimicrobiana de *Lc. lactis lactis* ATCC 11454 produtor de nisina sobre patógenos gram-positivos**. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 4, p.322-328, 2008

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

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D. ; ALLEN, C. M. BOUQUOT, J. E. **Patologia oral & maxilofacial**, 2ª ed., editora Guanabara Koogan, 2004

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. **Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality**. *Biochimie*, v.84 p. 593-604, 2002

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

OSSA, D.H.P.; LIGRESTI, A.; GIL-ALEGRE, M.E.; ABERTURAS, M.R.; MOLCEPES, J.; MARZO, V.D.; SUAREZ, A.I.T. **Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy**. *Journal of Controlled Release* v.161, n.3, p. 927-932, 2012

PÉREZ, M.H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. **The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug**. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 429 – 438, 2000.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. **Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: Sistemas monolíticos e multiparticulados**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43 (4), p. 491-502, 2007.

PROMBUTARA, P.; KULWATTHANASAL, Y.; SUPAKA, N. SRAMALA, I. CHAREONPORNWATTANAA, S. **Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity.** *Food Control* v.24, p. 184-190, 2012.

PUPE, C.G. **Desenvolvimento e Avaliação de Sistemas Nanoestruturados de Liberação de Fármacos e suas Aplicações Terapêuticas**, Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E.; Polymer nanoparticles: **Preparation techniques and size-control parameters**, *Progress in Polymer Science* v. 36, p. 887-913, 2011

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. **Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* v. 2, p. 8 – 21, 2006.

RIBEIRO, A.F.; REZENDE, R.L.O.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. **Poly ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box–Behnken design.** *International Journal of Nanomedicine.* v.8 p. 431-442, 2013

ROSA, D. S.; CHUI, Q.S.H.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J.A.M. **Biodegração de PHB, PHB-V e PCL em solo compostado.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

SAHL, H. G. & BIERBAUM, G. **Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria.** *Annu Rev Microbiol* v.52, p.41-79, 1998

SALMASO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A.; LANTE, A.; CALICETI, P. **Nisin-loaded Poly-L-lactide Nanoparticles Produced by CO₂ Anti-solvent Precipitation for Sustained Antimicrobial Activity.** *International Journal of Pharmaceutics* v. 287, p. 163-173, 2004

SARMENTO, B.; MARTINS, S.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; NEUFELD, R. FERREIRA, D. **Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers.** *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* v. 12, n.2, p. 131-138, 2006

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. **Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos.** *Química Nova*, v. 26 (5), p. 726 – 737, 2003.

SCHEU, M.; VEEFKIND, V.; VERBANDT, Y.; MOLINA GALAN, E.; ABSALOM, R.; FÖRSTER, W. **Mapping nanotechnology patents: The EPO approach.** *World Patent Information*, v. 28 (3), p. 204-211, 2006.

SILVA, L.C.R.P. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas polissacarídicas com atividade anticoagulante**, Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2012

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. **Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview**. International Journal of Pharmaceutics, v. 278, p. 1 – 23, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIELMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Capítulo 12, In Atomic X-Ray Spectrometry. p. 272 - 296.

SOARES, M. V.; **Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Cancer**, Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.J.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. **Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices**. *J. Control. Rel*, v. 70, p. 1-20, 2001

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

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.

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

WAN, Y.; LU, X.; DALAI, S.; ZHANG, J. **Thermophysical Properties of Polycaprolactone/Chitosan blend Membranes**. *Thermochimica Acta* v. 487, n. 2, p. 33-38, 2009

WEINDL, G.; WAGENER J.; SCHALLER M. **Epithelial cells and innate antifungal defense**. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 7, p. 666-675, 2010

WONG, P.T.; WANG, S.H.; CIOTTI, S.; MAKIDON, P.E.; SMITH, D.M.; FAN, Y.; SCHULER, C.F.; BAKER, J.R. **Formulation and Characterization of Nanoemulsion Intranasal Adjuvants: Effects of Surfactant Composition on Mucoadhesion and Immunogenicity**. *Molecular Pharmaceutics* v.1.; p.1-14, 2013

XIAO, D.; ZHONG, Q. **In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules**. *Journal of food Engineering*, v.106, n. 1, p. 65-73, 2011

XU, R. **Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement.** *Particuology*. V. 6, p. 112-115, 2008.

XUE, W.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. **Polycaprolactone Coated Porous Tricalcium Phosphate Scaffolds for Controlled Release of Protein for Tissue Engineering.** *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* v.91, n.2, p. 831-838, 2009

YOO, J.W.; GIRI, N.; LEE, C.H. **pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 403, n. 1-2, p. 262-267, 2011.

YUAN, Y.; Li, S.; MO, F.; ZHONGA, D., **Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, p.117 – 123, 2006.

ZABSKA, M.; JASKIEWICZ, K.; KIERSNOWSKI, A.; SZUSTAKIEWICZ, K.; RATHGEBER, S.; PIGLOWSKI, J. **Spontaneous exfoliation and self-assembly phenomena in polyvinylpyrrolidone/synthetic layered silicate nanocomposites.** *Radiation Physics and Chemistry*, v. 80, p. 1125-1128, 2011.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. **Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin.** *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 94, p. 261-267, 2005

ZOU, Y.; LEE, H.Y.; SEO, Y.C.; AHN, J. **Enhanced Antimicrobial Activity of Nisin-Loaded Liposomal Nanoparticles against Foodborne Pathogens.** *Journal of Food Science*, v.77, n.3, p. 165-170, 2012.