

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

RAPHAELA REGINA DE ARAÚJO PEREIRA

**Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível
contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase
vulvovaginal**

Maringá

2011

RAPHAELA REGINA DE ARAÚJO PEREIRA

**Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível
contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase
vulvovaginal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi

Maringá

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESTE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)**

P436d Pereira, Raphaela Regina de Araújo
Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal / Raphaela Regina de Araújo Pereira. -- Maringá, 2011.
171 f. : il., color., tabs., quadros, fotos., figs.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2011.

1. Própolis. 2. Microencapsulação. 3. Mucoadesão. 4. Termossensível. 5. Candidíase vulvovaginal. 6. Atividade antimicrobiana. 7. Reologia. I. Bruschi, Marcos Luciano, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 615.4

AHS-000909

Raphaela Regina de Araújo Pereira

Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi

Aprovada em: 24 / 11 / 2011

Banca examinadora:

Prof.^o Dr. : **Marcos Luciano Bruschi**

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Assinatura: _____

Prof.^a Dra. : **Maria Palmira Daflon Gremião**

Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" - Campus De Araraquara

Assinatura: _____

Prof.^a Dra. : **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Assinatura: _____

*Ao meu irmão **Rodolpho**, meu maior e melhor amigo,
que mesmo distante “geograficamente”
nunca saiu do meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis e Vânia, por todo amor, apoio e carinho e por sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao meu irmão Rodolpho pelo amor, amizade, sinceridade e companheirismo.

À minha família (vó Cida, vô Ely, vó Clarice, Lise, Elton, Jaque, Tia Cristina, Vanessa, Nilo, Bruno e Bianca) pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador professor Dr. Marcos Luciano Bruschi pela sua sabedoria, gentileza e exemplo de grande pesquisador que é. Pelas horas de conversas e ensinamentos, pela sua dedicação e apoio ao meu trabalho. Muito obrigada!

As professoras Dra. Selma Lucy Franco, Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, Dra. Izabel Cristina Piloto Ferreira, Dra. Andréa Diniz, Dra. Gisely Lopes e Dra. Miriam Souza Lima pelo carinho, estímulo e bem querer.

A professora Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pelo apoio e carinho, e por ter gentilmente permitido a realização de parte deste trabalho em seu laboratório e por ter aceitado fazer parte como banca da defesa.

A professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pelo carinho, por ter aceitado fazer parte como banca da defesa e pelas valiosas contribuições apresentadas na sessão de defesa da tese.

As minhas lindas amigas, Jaqueline e Talita, fiéis companheiras para todas as horas até as mais difíceis, que eu tive a felicidade e alegria de conhecer e que irei levar para toda minha vida!

Aos meus queridos amigos, feitos no corredor do K80, Thaisa, Amanda, Paula, Ananda, Frederico, Carla, Joyce, Paula, Léia, Nathiele, Vânia, Graciele, sentirei falta das nossas conversas do corredor!

Aos meus amigos do LABSLIF que sempre me ajudaram muito e contribuíram para a alegria mesmo nos momentos mais difíceis Marise, Lizziane, Fabiana, Sabrina, Maíra, Yeda, Jeane, Bruno, Lucas, e em especial a Mônica pelo carinho e compreensão!

A todos do Laboratório de Micologia Médica-UEM, minhas amigas Patrícia e Sayuri, e em especial a Janine pelo apoio, carinho, paciência e amizade.

Ao Cláudio, por me ajudar diversas vezes com os equipamentos do laboratório e pelas conversas, ensinamentos e momentos de diversão!

Aos técnicos e funcionários do DFA (UEM), Helena pelo apoio e atenção, e em especial a Rose e Érica pelo constante carinho e amizade.

Aos meus grandes e eternos amigos Laertez, Vanessa, Paulo, Eliane, Bruna, Sabrina, Melissa, Érica, Danielle, Robson, Maju pelo apoio incondicional. Amo vocês!

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PPG) e ao Departamento de Farmácia (DFA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela dedicação e apoio.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

***“As pessoas
entram e saem
de nossas vidas.
Mas elas
nunca vão só...
Sempre levam
um pouco de nós
e deixam
um pouco de si.”***

Charles Chaplin

RESUMO

PEREIRA, R. R. A., **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**. 2011. 171f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, 2011.

A candidíase vulvovaginal é uma infecção fúngica da vulva e da vagina, causada por várias espécies de *Candida*, principalmente pela *C. albicans*. O tratamento convencional é realizado por meio da administração de compostos imidazólicos e triazólicos, e agentes poliênicos, levando a sérios problemas de intolerância no trato gastrointestinal e toxicidade. Nos últimos anos, foram realizados vários estudos comprovando a atividade antimicrobiana da própolis, destacando-se por promover um tratamento potencialmente eficaz, seguro e de baixo custo. Além disso, atualmente, busca-se a ação localizada do fármaco pela utilização de sistemas mucoadesivos termossensíveis. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema termossensível mucoadesivo contendo micropartículas de própolis para tratamento de candidíase vulvovaginal. Assim, coletou-se própolis da região noroeste do Paraná e realizou-se seu controle de qualidade. Preparou-se e avaliou-se a qualidade do extrato da droga, validaram-se metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e polifenóis totais. Desenvolveu-se e caracterizou-se um sistema mucoadesivo termossensível, composto por poloxamer 407 e Carbopol 934P[®], contendo micropartículas de própolis. Realizou-se a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do extrato de própolis e do sistema. A própolis apresentou boa qualidade, assim como seu extrato etanólico, que demonstrou ser adequado para utilização na produção de micropartículas *in situ* da droga. As metodologias analíticas foram validadas. Foram desenvolvidos dois sistemas, com diferentes proporções dos polímeros, que apresentaram temperatura de gelificação, propriedades mecânicas e reológicas, de mucoadesão e teor de própolis adequadas para a liberação na cavidade vaginal. O extrato de própolis e os sistemas demonstraram atividade antifúngica *in vitro* frente a cepas de referência e isolados clínicos. A determinação do perfil de liberação *in vitro* demonstrou que a própolis pode ser liberada de forma controlada por um período de 24 horas.

Palavras-chave: Própolis. Microencapsulação. Mucoadesão. Termossensível.
Candidíase vulvovaginal. Atividade antimicrobiana. Reologia.

ABSTRACT

PEREIRA, R. R. A. **Development and characterization of thermo-sensitive mucoadhesive system containing propolis microparticles for the potential treatment of vulvovaginal candidiasis.** 2011. 171f. Dissertation (Master) - Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, 2011.

Vulvovaginal candidiasis is a fungal infection of vulva and vagina, caused by several species of *Candida*, mainly by *C. albicans*. The conventional treatment is accomplished through the administration of imidazole and triazole compounds, and polyenic agents, leading to serious problems of intolerance and toxicity in the gastrointestinal tract. In the last years, several studies were made proving the antimicrobial activity of propolis, especially by promoting a potentially effective treatment, with safe and low cost. In addition, currently the goal is the localized action of the drug by the use of thermo-sensitive mucoadhesive systems. Thus, the study aimed to develop and characterize a thermo-sensitive mucoadhesive system containing microparticles of propolis for the treatment of vulvovaginal candidiasis. Then, propolis was collected in the Northwest region of Paraná State and their quality was evaluated. It was prepared and evaluated the quality of the drug extract, validated analytical methods for quantification; developed and characterized a thermo-sensitive mucoadhesive system, composed of poloxamer 407 and Carbopol 934P[®], containing microparticles of propolis. It was held *in vitro* antifungal evaluation of propolis extract and from the system is well. The propolis and extractive solution showed good quality which proved to be suitable for use in the production of microparticles *in situ* of the drug. The analytical methodologies were validated, two systems were developed, with different proportions of the polymers, which showed the gelation temperature, mechanical and rheological properties, mucoadhesion and content of propolis appropriate to release into the vaginal cavity. The propolis extract and systems demonstrated *in vitro* antifungal activity against reference strains and clinical isolates. The determination of *in vitro* release profile of propolis from system showed that propolis can be released in a controlled way for a period of 24 hours.

Keywords: Propolis. Microencapsulation. Mucoadhesion. Thermo-sensitive, Vulvovaginal candidiasis. Antimicrobial activity. Rheology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama de corte coronal da vagina.....	33
Figura 2-	Diagrama de corte medial da vagina.....	34
Figura 3-	Fotografias da própolis <i>in natura</i> e triturada.....	41
Figura 4-	As duas etapas do processo de mucoadesão.....	54
Figura 5-	Esquema da microplaca de 96 poços.....	73
Figura 6-	Esquema da placa para determinação do CFM do extrato de própolis.....	74
Figura 7-	Analisador de textura TA-XTplus (a) e curva típica de análise do perfil de textura (APT): (C) dureza, (A1) compressibilidade, (A3) adesividade, (A2/A1) coesividade e (D) elasticidade (b).....	79
Figura 8-	Esquema do teste <i>in vitro</i> de mucoadesão (a) e gráfico típico do tempo <i>versus</i> força necessária para a remoção do disco de mucina a partir da formulação (b).....	80
Figura 9-	Esquema da etapa de diluição dos sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS).....	89
Figura 10-	Esquema do teste para determinação do CIM para os sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS) com micropartículas de própolis.....	89
Figura 11-	Esquema da placa de SDA para determinação do CFM do SMTS com micropartículas de própolis.....	90
Figura 12-	Curva de análise da crisina (padrão), obtido por espectrofotometria em 425 nm (n=6)	97
Figura 13-	Espectro de absorção para o extrato de própolis a 30% (p/p) para o método de quantificação de flavonóides totais.....	99
Figura 14-	Curva de análise do ácido gálico (padrão), obtido por espectrofotometria em 760 nm (n=6).....	101
Figura 15-	Espectro de absorção para o extrato de própolis a 30% (p/p) para o método de quantificação de polifenóis totais.....	104
Figura 16-	Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a	

	curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.....	117
Figura 17-	Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.....	118
Figura 18-	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.....	121
Figura 19-	Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%....	122
Figura 20-	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.....	123
Figura 21-	Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%....	124
Figura 22-	Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis SMTS-1.....	128
Figura 23-	Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo	

	micropartículas de própolis SMTS-2.....	128
Figura 24-	Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis SMTS-1.....	130
Figura 25-	Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis SMTS-2.....	131
Figura 26-	Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.....	136
Figura 27-	Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.....	137
Figura 28-	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%....	140
Figura 29-	Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%....	141
Figura 30-	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%....	142

- Figura 31-** Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.... **143**
- Figura 32-** Perfil de liberação a partir da dispersão 4% (V/V) do extrato e dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis SMTS-1 e SMTS-2..... **146**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Origem botânica da própolis.....	43
Quadro 2-	Polímeros mucoadesivos utilizados em sistemas vaginais (sozinhos ou combinados).....	55
Quadro 3-	Preparações mucoadesivas vaginais comercializadas.....	58
Quadro 4-	Materiais e fármacos utilizados em comprimidos, óvulos e supositórios mucoadesivos.....	60
Quadro 5-	Materiais e fármacos utilizados em formulações mucoadesivas semissólidas e filmes.....	62
Quadro 6-	Equipamentos e modelos de membrana utilizados em testes <i>in vitro</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição dos sistemas semissólidos termossensíveis contendo micropartículas de própolis.....	84
Tabela 2-	Resultados das análises físico-químicas da amostra de própolis.....	92
Tabela 3-	Resultados das análises físico-químicas do extrato de própolis.....	94
Tabela 4-	Parâmetros de linearidade para curva de análise da crisina.....	97
Tabela 5-	Regressão linear da curva de análise da crisina.....	98
Tabela 6-	Análise da falta de ajuste da curva de análise da crisina.....	98
Tabela 7-	Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de crisina analisadas.....	99
Tabela 8-	Precisão do método de quantificação de flavonóides totais.....	100
Tabela 9-	Recuperação do método de quantificação de flavonóides totais.....	100
Tabela 10-	Robustez do método de quantificação de flavonóides totais.....	101
Tabela 11-	Parâmetros de linearidade para curva de análise do ácido gálico.....	102
Tabela 12-	Regressão linear da curva de análise do ácido gálico.....	103
Tabela 13-	Análise da falta de ajuste da curva de análise do ácido gálico.....	103
Tabela 14-	Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de ácido gálico analisadas.....	104
Tabela 15-	Precisão do método de quantificação de polifenóis totais.....	105

Tabela 16-	Recuperação do método de quantificação de polifenóis totais.....	105
Tabela 17-	Robustez do método de quantificação de polifenóis totais.....	106
Tabela 18-	Resultados da quantificação do extrato de própolis por teor de flavonóides totais e polifenóis totais.....	106
Tabela 19-	Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de própolis frente às leveduras testadas.....	108
Tabela 20-	Densidade relativa dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis.....	112
Tabela 21-	Temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$) preliminar dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2).....	112
Tabela 22-	Propriedades mecânicas dos sistemas dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2).....	114
Tabela 23-	Análise <i>in vitro</i> da força mucoadesiva dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2).....	115
Tabela 24-	Valores obtidos para o índice de consistência (k) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis.....	118
Tabela 25-	Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (η) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis.....	119
Tabela 26-	Temperatura de transição sol/gel ($T_{sol/gel}$) obtida para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis....	126
Tabela 27-	Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SMTS-1.....	129
Tabela 28-	Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SMTS-2.....	130
Tabela 29-	pH dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2) contendo micropartículas de própolis.....	132

Tabela 30-	Densidade relativa dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2) contendo micropartículas de própolis.....	132
Tabela 31-	Temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$) obtida por meio de método mecânico (preliminar) dos SMTS contendo micropartículas de própolis.....	133
Tabela 32-	Força mucoadesiva dos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis.....	134
Tabela 33-	Análise <i>in vitro</i> da força mucoadesiva dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2) contendo micropartículas de própolis.....	135
Tabela 34-	Valores obtidos para o índice de consistência (k) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis.....	137
Tabela 35-	Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (η) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis.....	138
Tabela 36-	Temperatura de transição sol/gel ($T_{sol/gel}$) obtida para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis.....	144
Tabela 37-	Resultados do teor de própolis nos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis por quantificação teor de polifenóis totais.....	145
Tabela 38-	Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação <i>in vitro</i> a partir dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis.....	147
Tabela 39-	Tempo necessário para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir dos sistemas contendo micropartículas de própolis.....	147
Tabela 40-	Concentração fungicida mínima (CFM) do SMTS-1 contendo micropartículas de própolis.....	150
Tabela 41-	Concentração fungicida mínima (CFM) do SMTS-2 contendo micropartículas de própolis.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APT	Análise do Perfil de Textura
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASS	Assintomática
C934P	Carbopol 934P®
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CV	Coeficiente de Variação
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EO	Blocos de óxido de etileno
EPRP	Extrato de própolis
EUCAST	<i>European Committee on Antibiotic Susceptibility</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HSV	Vírus simplex humano
ICH	<i>International Conference on the Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LEPAC	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas
LQ	Limite de quantificação
P407	Poloxamer 407
PC	Policarbofil
pH	Potencial Hidrogeniônico
PO	Blocos de óxido de propileno
PEO	Poli(et)ilenoglicol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RS	Resíduo Seco
RVL	Região viscoelástica linear
DAS	<i>Sabouraud Dextrose Ágar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SLFV	Sistemas de liberação de fármacos via vaginal
SM	Solução Mãe
SMTS	Sistema mucoadesivo termossensível
SSE	Solução salina estéril
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultra Violeta
VB	Vaginose bacteriana
VIS	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	absortividade específica
%	por cento
λ	comprimento de onda
®	marca registrada
A	Absorvância
cm	Centímetro
FD	fator de diluição
g	Gramma
G'	módulo elástico ou de estocagem
G''	módulo viscoso ou de perda
h	Hora
Hz	Hertz
k	índice de consistência
m	Massa
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	índice de fluxo
N	Newton
°C	grau Celsius
°GL	grau Gay Lussac
p	Peso
p	significância do teste estatístico
Pa	Pascal
r^2	coeficiente de correlação linear
s	desvio padrão
S	inclinação da curva de calibração
s	Segundo
t	tempo de liberação
$\tan \delta$	tangente de perda ou viscosa
TP	teor de polifenóis totais

TF	teor de flavonóides totais
$T_{\text{sol/gel}}$	temperatura de transição sol/gel (gelificação)
V	Volume
γ	gradiente de cisalhamento
η'	viscosidade dinâmica
μL	Microlitro
σ	tensão de cisalhamento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	32
2.1 Anatomofisiologia da vulva e vagina.....	32
2.2 Candidíase vulvovaginal.....	35
2.3 Própolis.....	40
2.3.1 Histórico.....	41
2.3.2 Origem botânica.....	42
2.3.3 Composição química.....	44
2.3.4 Atividade biológica.....	45
2.4 Própolis e candidíase.....	46
2.5 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal.....	47
2.5.1 Mucosa vaginal como um local para liberação de fármacos.....	47
2.5.2 Estratégias para a liberação de fármaco na mucosa vaginal.....	49
2.5.2.1 Comprimidos vaginais, óvulos e supositórios.....	59
2.5.2.2 Semissólidos e filmes.....	60
2.5.3 Estratégias de avaliação.....	63
3. OBJETIVOS.....	65
3.1 Objetivos específicos.....	65
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1 Material.....	66
4.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas.....	66
4.1.2 Equipamentos e acessórios.....	66
4.1.3 Outros.....	67
4.2 Métodos.....	67
4.2.1 Coleta e controle de qualidade da própolis.....	67
4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação.....	68
4.2.1.2 Determinação do teor de cinzas.....	68
4.2.1.3 Determinação do teor de ceras.....	68
4.2.1.4 Determinação do teor de extrativos em água.....	69
4.2.1.5 Determinação do teor de extrativos em etanol 96 °GL.....	69
4.2.1.6 Determinação do teor de flavonóides totais da droga.....	70

4.2.2	Preparação e controle de qualidade do extrato de própolis.....	71
4.2.2.1	Determinação do pH.....	71
4.2.2.2	Determinação da densidade relativa.....	71
4.2.2.3	Determinação do resíduo seco.....	71
4.2.2.4	Determinação do teor alcoólico.....	71
4.2.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do extrato de própolis.....	72
4.2.2.5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato de própolis.....	72
4.2.2.5.2	Determinação da Concentração Fungicida Mínima do extrato de própolis.....	73
4.2.2.6	Validação de métodos espectrofotométricos para análise de extrato de própolis.....	74
4.2.2.6.1	Validação do método de análise para quantificação de flavonóides totais.....	74
4.2.2.6.2	Validação do método de análise para quantificação de polifenóis totais.....	76
4.2.2.7	Análise do extrato de própolis por espectrofotometria.....	77
4.2.2.7.1	Análise do extrato de própolis pelo método de quantificação de flavonóides totais.....	77
4.2.2.7.2	Análise do extrato de própolis pelo método de quantificação de polifenóis totais.....	77
4.2.3	Desenvolvimento e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo termossensível.....	78
4.2.3.1	Determinação do pH.....	78
4.2.3.2	Determinação da densidade relativa.....	78
4.2.3.3	Avaliação preliminar da temperatura de gelificação.....	78
4.2.3.4	Análise do perfil de textura.....	79
4.2.3.5	Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	80
4.2.3.6	Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	81
4.2.3.7	Análise reológica oscilatória.....	81
4.2.3.8	Determinação da temperatura de gelificação.....	82
4.2.3.9	Análise estatística.....	83
4.2.4	Preparação e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo	

termossensível contendo micropartículas de própolis.....	83
4.2.4.1 Análise morfológica.....	84
4.2.4.2 Análise granulométrica.....	84
4.2.4.3 Determinação do pH.....	84
4.2.4.4 Determinação da densidade relativa.....	84
4.2.4.5 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação.....	85
4.2.4.6 Análise do perfil de textura.....	85
4.2.4.7 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	85
4.2.4.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	85
4.2.4.9 Análise reológica oscilatória.....	85
4.2.4.10 Determinação da temperatura de gelificação.....	85
4.2.4.11 Determinação do teor de própolis.....	85
4.2.4.12 Análise estatística.....	86
4.2.4.13 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da própolis a partir das preparações.....	86
4.2.4.14 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos sistemas mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis.....	88
4.2.4.14.1 Determinação da CIM dos sistemas contendo própolis.....	88
4.2.4.14.2 Determinação da CFM dos sistemas contendo própolis.....	90
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.1 Controle de qualidade da própolis.....	91
5.2 Preparação e controle de qualidade do extrato de própolis.....	94
5.3 Validação de metodologia analítica para avaliação do extrato de própolis.....	95
5.3.1 Validação de metodologia analítica para quantificação de flavonóides totais.....	96
5.3.2 Validação de metodologia analítica para quantificação de polifenóis totais.....	101
5.3.3 Quantificação do extrato de própolis.....	106
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do extrato de própolis.....	106
5.4.1 Determinação da CIM e CFM do extrato de própolis.....	106
5.5 Desenvolvimento e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo termossensível.....	109
5.5.1 Determinação da densidade relativa.....	111

5.5.2 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação.....	112
5.5.3 Análise do perfil de textura.....	113
5.5.4 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	115
5.5.5 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	117
5.5.6 Análise reológica oscilatória.....	120
5.5.7 Determinação da temperatura de gelificação.....	126
5.6. Preparação e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis.....	127
5.6.1 Análise morfológica.....	127
5.6.2 Análise granulométrica.....	129
5.6.3 Determinação do pH.....	131
5.6.4 Determinação da densidade relativa.....	132
5.6.5 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação.....	133
5.6.6 Análise do perfil de textura.....	133
5.6.7 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	134
5.6.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	135
5.6.9 Análise reológica oscilatória.....	139
5.6.10 Determinação da temperatura de gelificação.....	144
5.6.11 Determinação do teor de própolis.....	145
5.6.12 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da própolis a partir das preparações.....	146
5.6.13 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos sistemas mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis.....	149
5.6.13.1 Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração fungicida mínima sistemas contendo micropartículas de própolis.....	149
6. CONCLUSÕES.....	152
REFERÊNCIAS.....	153
APÊNDICE A – Trabalho 1.....	171

1. INTRODUÇÃO

A administração de medicamentos pela via oral possibilita com que a concentração do fármaco seja, muitas vezes, superior a necessária para obtenção do efeito terapêutico no local desejado, acarretando toxicidade e efeitos adversos indesejáveis ao paciente (RANG et al., 2004; BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; DOTA et al., 2010). Estes inconvenientes tem levado a exploração de outras vias com grande potencial para a liberação local e absorção de fármacos. Rotas transmucosas para liberação de ativos (como as mucosas de revestimento nasal, retal, ocular e das cavidades oral e vaginal) oferecem claras vantagens sobre a administração oral. Dentre estas, está a possibilidade de uma presença efetiva de ativo no local de ação, de contornar o efeito de primeira passagem e evitar a eliminação pré-sistêmica dentro do trato gastrintestinal e, principalmente, a alta toxicidade e os efeitos adversos indesejáveis ao paciente (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; CHIDAMBARAM; SRIVATSAVA, 1995; GANDHI; ROBINSON, 1994; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009).

Nesse sentido, sistemas farmacêuticos mucoadesivos possibilitam controlar a localização e a liberação de fármaco em uma região particular do organismo, aumentando a disponibilidade e o tempo de contato entre este e a mucosa (BONACUCINA, 2004; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Além disso, as doenças infecciosas são as mais comumente encontradas entre as do trato genital feminino (BILENSOY et al., 2006). Dentre estas, as vaginites destacam-se como um problema comum em mulheres de todas as idades (ALAM et al., 2007). Os habitantes da microbiota da mucosa vaginal permanecem em equilíbrio no ambiente vaginal (VITALI et al., 2007) protegendo-a de patógenos invasores, incluindo os causadores de infecções do trato urinário e doenças sexualmente transmissíveis (BORIS et al., 1998). Esta ação da microbiota é fundamental para impedir a colonização por micro-organismos indesejáveis, incluindo os responsáveis por candidíases, tricomoníase, infecções do trato urinário e doenças sexualmente transmissíveis (FREDERICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005; VITALI et al., 2007).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma inflamação da mucosa genital, que compromete principalmente vulva e vagina, desenvolve-se em decorrência de infecção por leveduras, as quais podem ser habitantes normais dessas mucosas, sendo um problema relevante na saúde da mulher e figurando entre as formas mais comuns de infecções fúngicas oportunistas (FIDEL, 2002; DOTA et al., 2010). As manifestações da CVV são com frequência dolorosas e incômodas (FERRAZA et al., 2005; DOTA et al., 2010), sendo caracterizadas clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar intenso, leucorréia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal (SOBEL, 1997; ALAM et al., 2007; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; BACHHAV; PATRAVALE, 2009, DOTA et al., 2010). O prurido é o sintoma mais importante quando a CVV é comparada a vulvovaginites de outras etiologias (FERRAZA et al., 2005; HOLANDA et al., 2007). Em alguns casos, é possível observar a presença de lesões satélites vulvares, como escoriações (FIDEL, 2002). Por acometer milhões de mulheres anualmente, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas e prejudicando o desempenho laboral, a CVV é considerada um importante problema de saúde pública mundial (CANDIDO et al., 1998; HOLANDA et al., 2007; DOTA et al., 2010).

O tratamento desta desordem não tem obtido bons resultados. O alívio dos sintomas, na maioria dos casos, é temporário e a taxa média de cura micológica é de 75 a 80%, com recidivas constantes (MENEZES et al., 2001; DOTA et al., 2010). Na década de 80, a introdução dos derivados imidazólicos, como cetoconazol, clotrimazol, miconazol, tioconazol, e mais tarde, itraconazol e fluconazol, possibilitou a elevação desta taxa para 85 a 90% (MENEZES et al., 2001; DOTA et al., 2010). Entretanto, nenhum dos agentes antifúngicos orais sistêmicos tem a aprovação da *Food and Drug Administration* para uso específico na CVV (MENEZES et al., 2001). Além disso, há outros fatores limitantes para o uso desses fármacos, entre eles a hepatotoxicidade e distúrbios gastrintestinais, principalmente do cetoconazol (BENNET, 1996). Estes efeitos são menos frequentes para o itraconazol e fluconazol, porém o elevado custo torna-os “proibitivos”, especialmente em saúde pública (GONZALEZ-PEDRAZA et al., 1998; MENEZES et al., 2001; DOTA et al., 2010). Adicionalmente, nenhum dos agentes antifúngicos disponíveis tem sido capaz de erradicar os sintomas definitivamente e a problemática das recidivas permanece (SOBEL; CHAIM, 1996; DOTA et al., 2010).

Por outro lado, evidências sugerem que o desenvolvimento de tolerância, ocorrência de efeitos colaterais e aumento da taxa de recorrência da infecção (DOTA et al., 2010) são em grande parte devido à falha na restabilização da microbiota vaginal normal composta por *Lactobacillus* após a terapia antimicrobiana (REID, 2002; DOTA et al., 2010). Tratamentos da microbiota vaginal, portanto, poderiam provocar a erradicação não somente de micro-organismos patógenos, mas também os da microbiota vaginal normal, dificultando também o restabelecimento da capacidade de enfrentar outros agentes infecciosos (INHOF et al., 2005). Nesse sentido, a própolis demonstra ser eficaz no tratamento de infecções vaginais e, diferente de antibióticos e antimicóticos sintéticos, não está associada à formação de resistência por micro-organismos (KOC et al., 2005; INHOF et al., 2005; DOTA et al., 2010).

Própolis é uma gomo-resina fortemente adesiva produzida pelas abelhas *Apis mellifera* L. que já vem sendo utilizada pelos homens desde tempos antigos por suas propriedades farmacêuticas (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998). Entre elas estão incluídas a antimicrobiana (KUJUMGIEV et al., 1999; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001), fungicida (MARCUCCI, 1995; KUJUMGIEV et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; DOTA et al., 2010), antiviral (KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI, 2001), antiúlcera (BRUSCHI et al., 2004), imunoestimulante (BRUSCHI et al., 2004), hipotensiva (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 2001), anti-inflamatória (BURDOCK, 1998; CESCHEL et al., 2002), antioxidante (ISLA et al., 2001; NAGAI et al., 2001) e citostática (CESCHEL et al., 2002). Sua composição química é complexa e depende do material resinoso, gomoso ou balsâmico que as abelhas coletam da vegetação ao redor da colmeia (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). Por estas características, ela tem sido utilizada em sistemas de liberação, principalmente na forma de seu extrato alcoólico microencapsulado, possibilitando a liberação prolongada de seus ativos (BRUSCHI et al., 2003, 2004, 2006, 2007).

Além disso, Carbopol 934P[®] (C934P) e poloxamer 407 (P407) têm sido empregados como blendas no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos termossensíveis, devido às suas características físico-químicas e de interação com a mucosa (DUMORTIER et al., 2006; BRUSCHI et al., 2006, 2007; JONES et al., 2009; FABRI et al., 2011).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de CVV. Assim, foi realizada uma revisão de literatura sobre CVV, própolis e sistemas de liberação vaginais.

O controle de qualidade da própolis e seu extrato etanólico foram realizados seguindo procedimentos farmacopéicos, assim como procedimentos de uso consagrado na prática analítica, além da comparação com outros estudos relevantes. Para assegurar a confiabilidade dos resultados foi realizada a validação de metodologias analíticas para quantificação do teor de flavonóides totais e polifenóis totais, principais responsáveis pelas atividades biológicas da droga, além de ensaios microbiológicos, para comprovação de sua atividade.

Desenvolveu-se um sistema semissólido mucoadesivo termossensível composto por P407 e C934, no qual foram preparadas *in situ* micropartículas de própolis. Estas foram avaliadas em relação à morfologia e granulometria. O sistema foi avaliado quanto as suas características físico-químicas, tais como pH e densidade relativa, temperatura de gelificação, suas propriedades reológicas e mecânicas, mucoadesão, teor de própolis e atividade antifúngica. Além disso, foi avaliado *in vitro* o perfil de liberação de própolis a partir dos sistemas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia da vulva e vagina

O sistema reprodutor feminino está envolvido na reprodução, sendo constituído pelos ovários, tubas uterinas, útero, vagina e vulva, localizando-se no interior da cavidade pélvica.

Nas mulheres, o clitóris e o aparelho vestibular, juntamente com algumas pregas da pele e de tecido, formam a vulva. A cada lado da linha média, há duas pregas finas de pele denominadas pequenos lábios. A região contida por eles, e em que se abrem a uretra e a vagina, é o vestíbulo. (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004). Anteriormente, os pequenos lábios bifurcam-se, formando uma prega medial e uma lateral. As pregas mediais unem-se para formar o frênulo do clitóris, que se une à glânde do clitóris. As pregas laterais unem-se ventralmente sobre a glânde do clitóris e o corpo do clitóris para formar o prepúcio do clitóris. Posteriormente ao vestíbulo, os pequenos lábios se unem, formando uma pequena prega transversa, a comissura posterior da vulva (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004; MOORE; DALLEY, 2007).

Dentro do vestíbulo, o orifício vaginal é cercado, em graus variáveis, por uma prega de membrana em forma de anel, o hímen, que pode ter uma pequena perfuração central ou pode fechar completamente a abertura vaginal. Os orifícios da uretra e da vagina associam-se às aberturas das glândulas. Os ductos das glândulas vestibulares maiores (glândulas de Bartholin) abrem-se adjacientemente à margem póstero-lateral da abertura vaginal na prega entre o orifício vaginal e os remanescentes do hímen. (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004). Lateralmente aos pequenos lábios, há duas pregas largas, os grandes lábios, que se unem anteriormente para formar o monte púbico. O monte púbico fica sobre a parte inferior da sínfise púbica e é anterior ao vestíbulo e ao clitóris. Posteriormente, os grandes lábios não se unem e são separados por uma depressão denominada comissura posterior, que fica sobre a posição do corpo do períneo (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004; MOORE; DALLEY, 2007).

A vagina tem um papel fundamental na reprodução (VALENTA, 2005; BALOGLU et al., 2009), sendo um importante órgão do sistema reprodutor. Possui estrutura tubular musculomembrânica se insere superiormente no contorno médio do colo do útero (a abertura do útero), atravessa o diafragma urogenital e se abre na

vulva (órgãos genitais externos) pelo óstio da vagina (Figura 1) (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; HUSSAIN; AHSAN, 2005; DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004; VALENTA, 2005; MOORE; DALLEY, 2007; BALOGLU et al., 2009; ROHAN; SASSI, 2009). Está posicionada entre o reto, bexiga e uretra com dimensões de 7,0 – 9,0 cm de comprimento e 2,1-5,0 cm de diâmetro e apresenta-se em forma de “S” e suas paredes, anterior e posterior encontram-se colapsadas, exceto em sua extremidade superior onde o colo as mantém afastadas, constituindo uma cavidade virtual (Figura 2) (HUSSAIN; AHSAN, 2005; DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004; VALENTA, 2005; MOORE; DALLEY, 2007; BALOGLU et al., 2009). A vagina situa-se posteriormente à uretra, que se projeta para sua parede ântero-inferior, e à bexiga, e situa-se anteriormente ao reto, passando entre as margens mediais dos músculos levantadores no ânus (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2004; MOORE; DALLEY, 2007).

Figura 1 - Diagrama de corte coronal da vagina

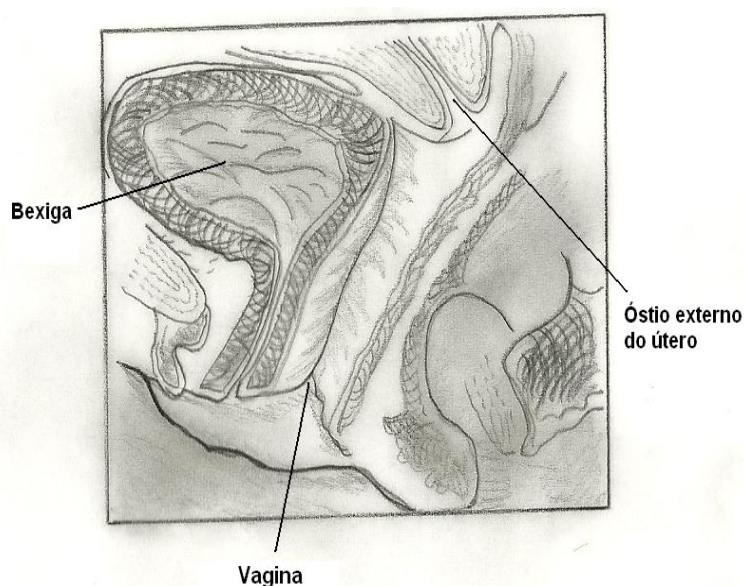


Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

A parede vaginal é composta por três camadas: a camada epitelial, a camada muscular e túnica adventícia (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005; BALOGLU et al., 2009). A superfície da vagina é composta de numerosas pregas (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; HUSSAIN; AHSAN, 2005), que são frequentemente chamadas de rugas (Figura 1). As rugas promovem distensibilidade, suporte e uma maior área de superfície da parede vaginal. A vagina tem uma elasticidade excelente, devido à

presença de fibras elásticas na camada muscular (HUSSAIN; AHSAN, 2005). O epitélio é escamoso estratificado não cornificado e sua espessura é dependente da idade. Com a atividade hormonal o epitélio vaginal aumenta de espessura e é maior na fase proliferativa e atinge o maior conteúdo de glicogênio durante a ovulação (VALENTA, 2005).

Figura 2 - Diagrama de corte medial da vagina



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

A vagina não possui glândulas, mas secreta uma grande quantidade de fluido (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; HUSSAIN; AHSAN, 2005). Secreção cervical e transudato dos vasos sanguíneos com células descamadas e leucócitos são os principais constituintes do fluido vaginal, bem como as secreções do endométrio e tubas uterinas (HUSSAIN; AHSAN, 2005; ROHAN; SASSI, 2009). Assim, o fluido vaginal humano é uma mistura de vários componentes, incluindo enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas, carboidratos, aminoácidos, álcoois, hidroxiconas, compostos aromáticos (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005), transudatos do epitélio, muco cervical, células epiteliais esfoliadas, secreções das glândulas de Bartholin, leucócitos, fluidos do endométrio e tubários (VALENTA, 2005; ROHAN; SASSI, 2009).

Além disso, o fluido vaginal possui características especiais, como a presença de muco cervical. Muco é uma secreção complexa viscosa aderente que é

sintetizada pelas células *goblet* (DUCHÊNE; PONCHEL, 1992; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Estas são células glandulares do epitélio e estão presentes em todos os órgãos que são expostos ao ambiente externo (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). O muco apresenta muitas funções nesses locais, tais como lubrificação, manutenção da hidratação do epitélio, função de barreira para patógenos e substâncias nocivas e como uma camada de gel permeável permitindo a troca de gases e nutrientes para o epitélio subjacente (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; BALOGLU et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; LAI et al., 2010). O muco cervical contém glicoproteínas, sais inorgânicos e orgânicos (VALENTA, 2005; CARVALHO et al., 2010), mucinas, proteínas, colesterol, lipídios, carboidratos, uréia, enzimas e aminoácidos (VALENTA, 2005; ROHAN; SASSI, 2009) e cerca de 95% de água, tornando-se um sistema altamente hidratado (CARVALHO et al., 2010). A mucina é o composto mais secretado e mais importante sendo a glicoproteína responsável pela estrutura do muco (BALOGLU et al., 2009, CARVALHO et al., 2010).

O muco desempenha um importante papel na adesão célula-célula, atuando também como lubrificante, permitindo que as células movam-se uma em relação as outras, exercendo papel crítico na bioadesão de sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos (DUCHÊNE; PONCHEL, 1992; BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; BRUSCHI et al., 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010). Ele forma uma barreira semipermeável viscoelástica continuamente renovada que reveste todo o trato reprodutivo feminino (LAI et al., 2010). Em pH fisiológico, a rede de muco fica carregada negativamente (devido ao ácido siálico e resíduos de sulfato) desempenhando papel na mucoadesão (VALENTA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Neste pH, o muco pode formar uma estrutura de gel fortemente coesa que se liga à superfície de células epiteliais como uma camada gelatinosa (DUCHÊNE; PONCHEL, 1992; BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; VALENTA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

2.2 Candidíase vulvovaginal

A vagina humana saudável é colonizada por lactobacilos, que desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções urogenitais (BORIS et al., 1998; VÁSQUEZ et al., 2002; ROHAN; SASSI, 2009). O ácido láctico produzido a partir de glicogênio pelos *Lactobacillus acidophilus* presentes na vagina

age como um tampão para manter o pH vaginal entre 3,8 e 4,2 (HUSSAIN; AHSAN, 2005; ROHAN; SASSI, 2009). No entanto, a presença de muco cervical e da quantidade de transudato vaginal podem alterar o pH vaginal (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; HUSSAIN; AHSAN, 2005; ROHAN; SASSI, 2009).

Por outro lado, sabe-se que o equilíbrio microbiano entre lactobacilos com a microbiota dominante e outros, principalmente Gram-negativos anaeróbios pode ser rompido, resultando frequentemente na síndrome de vaginose bacteriana (VB), tricomoníase, infecções do trato urinário, vaginite aeróbica e doenças sexualmente transmissíveis, como as causadas por vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus simplex humano (HSV) e vírus do papiloma humano (HPV) e CVV (YOO et al., 2006; VITALI et al., 2007; DOTA et al., 2010).

A CVV é uma infecção da mucosa genital, causada por fungos leveduriformes, patógenos oportunistas frequentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais (MORAGUES et al., 2003; FERRAZA et al., 2005; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010), estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007), sendo que em sua grande maioria pertencem ao gênero *Candida* (ZIARRUSTA, 2002; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007), 80% a 90% dos casos são devidos a *C. albicans* e 10% a 20%, a outras espécies chamadas não-*C. albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*). *C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV (SOBEL, 2003; FERRAZA et al., 2005; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007, DOTA et al., 2010). Porém, leveduras de outros gêneros também podem causar essa infecção, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* sp (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

As infecções por leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por milhões de visitas ao consultório médico a cada ano (CARVALHO et al., 2003; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010). Cerca de 5% das mulheres com CVV desenvolvem CVVR, definida usualmente como a ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV no período de 12 meses (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010). Ao contrário das mulheres que têm episódios esporádicos de CVV, aquelas com a doença recorrente não se beneficiam de uma diminuição na frequência de episódios sintomáticos com o passar da idade

(FERRRAZA et al., 2005; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). A patogênese da CVVR entre mulheres que não têm condições predisponentes aparentes, que são a grande maioria, está sob investigação. Estudos não indicam que uma elevação na resistência de espécies de *Candida* na maioria dos casos, embora mulheres com recorrência tenham uma prevalência discretamente mais elevada de *C. glabrata*, menos sensível aos fármacos imidazólicos, comumente utilizadas no tratamento de CVV e CVVR (FERRRAZA et al., 2005). As lesões da CVV assemelham-se as da candidíase oral, mas produzem sintomas mais desagradáveis, como prurido vulvar intenso, leucorréia em grumos, semelhante à nata de leite, inodora e, quando depositada nas vestes a seco, apresenta aspecto farináceo (SOBEL, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2006). Frequentemente, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura (SOBEL, 2003; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010). Os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, devido à acidez vaginal aumenta (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Estudos indicam que 20 a 25% das mulheres normalmente saudáveis são completamente assintomáticas (ASS), ou seja, apresentam culturas de secreção vaginal positiva para *Candida*, embora não apresentem nenhum ou somente um dos sintomas acima relacionados, o que indica a importância da colonização vaginal prévia para o desenvolvimento da infecção (SOBEL, 2003; CARVALHO et al., 2003; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

As infecções normalmente são resultados do supercrescimento oportunista, quando a microbiota competidora é suprimida como consequência de alguns fatores predisponentes (SOBEL, 1993; TORTORA; FUNKE; CASE, 2006) que incluem *diabetes mellitus* não controlada, o uso de antibióticos de largo espectro e de corticóides (CARVALHO et al., 2003; FERRAZA et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2006; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; HOLANDA et al., 2007). Embora diferentes estudos não tenham sido conclusivos nesse sentido, antibióticos podem suprimir a microbiota vaginal lactobacilar, que é o principal mecanismo defensivo vaginal contra os fungos (ZIARRUSTA, 2002).

A microbiota vaginal normal é rica em lactobacilos produtores de peróxido (bacilos de Döderlein), os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das células escamosas do tipo intermediárias do

epitélio vaginal, cuja produção é estimulada pelos hormônios sexuais femininos. Esse mecanismo propicia acidez adequada do ambiente vaginal (pH em torno de 4,0), dificultando a proliferação da maioria dos patógenos (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010). As leveduras são exceções, uma vez que proliferam em ambiente ácido (ALMEIDA, PASSOS, GÔUVEA; 1995). A microbiota vaginal composta por lactobacilos constitui uma barreira defensiva importante à CVV, sendo que os lactobacilos competem com os fungos pelos nutrientes, realizam um processo de co-agregação, podendo com isso, além de competir com os fungos, bloquear os receptores epiteliais para eles, inibindo a adesão dos mesmos ao epitélio vaginal e, ainda, são capazes de produzir substâncias (bacteriocinas) capazes de inibir a germinação de micélios (ZIARRUSTA, 2002; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; DOTA et al., 2010).

A gestação e o uso de anticoncepcionais orais são também fatores predisponentes, pois causam um aumento do glicogênio na vagina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006), diminuindo o pH vaginal, propiciando assim o ambiente ideal para o desenvolvimento de CVV (FERRAZA et al., 2005). Parecem contribuir também hábitos higiênicos e vestuário inadequado, como roupas muito justas ou de fibras sintéticas (FERRAZA et al., 2005). Os hormônios são provavelmente outro fator, principalmente no período pré-menstrual (SOBEL, 1993), a candidíase é muito menos comum em meninas antes da puberdade ou em mulheres após a menopausa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006). Contudo, a fisiopatogenia da CVV constitui um intrincado mecanismo que envolve também a resposta do hospedeiro, além da espécie de levedura isolada, fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos (FIDEL; SOBEL, 1996; FERRAZA et al., 2005).

A prevalência de CVV parece ter aumentado nos últimos anos (FERRAZA et al., 2005). Segundo dados do Ministério da Saúde (2006) as vulvovaginites constituem um dos problemas ginecológicos mais comuns e incomodativos que afetam a saúde da mulher e representam cerca de 70% das queixas em consultas ginecológicas, sendo as formas mais comuns de vaginite a CVV, causadas por fungos – *C. albicans* e *C. glabrata* e a tricomoníase vulvovaginal, causada por protozoário – *Trichomonas vaginalis* (FERRAZA et al., 2005). Além da alta prevalência, as recidivas e reinfecções na CVV são frequentes e representam um dos problemas cruciais da doença. Como é transmissível por via sexual, desajustes conjugais decorrentes da CVV são comuns e muitas vezes traumáticos,

principalmente pela falta de informação do casal sobre a fisiopatogenia da doença. Essas questões, aliadas ao sofrimento e a angústia da mulher, em função dos sintomas clínicos e, sobretudo, a interferência na sua capacidade de trabalho, dão suporte à inclusão desta doença entre os problemas de saúde pública (MENEZES et al., 2001; DOTA et al., 2010).

O tratamento da CVV normalmente é empírico, porém as recidivas frequentes refletem preocupação desde longa data quanto à eficácia desses tratamentos. Este é realizado principalmente empregando-se agentes imidazólicos e triazólicos, entre eles fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, e agentes poliênicos, como a nistatina e algumas formulações contendo anfotericina B (FERRAZA et al., 2005; DOTA et al., 2010). As células fúngicas possuem o ergosterol como componente da membrana celular, exercendo funções semelhantes às do colesterol em células animais. As semelhanças estruturais destes dois esteróis justificam o fato dos antifúngicos atualmente disponíveis serem poucos e consideravelmente mais tóxicos que os agentes antibacterianos, uma vez que seu principal mecanismo de ação é impedir a síntese ou ligar-se ao ergosterol (TRABULSI; ALTERTHUM; GOMPertz, 1999). Terapias antifúngicas de venda livre para tratar essas infecções estão entre os produtos sem prescrição médica mais vendidos nos Estados Unidos (FERRIS et al., 2002). Além disso, muitas pacientes não respondem à terapêutica inicial. Nesse sentido justifica-se a investigação quanto à possível tolerância das leveduras aos antifúngicos (FERRAZA et al., 2005).

O arsenal disponível para o tratamento de infecções fúngicas é limitado, a anfotericina B é um excelente recurso terapêutico com alta eficácia contra leveduras e fungos filamentosos, mas seu uso é limitado a casos graves, devido à sua alta toxicidade (DOTA et al., 2010). Derivados azólicos, especialmente o triazol fluconazol, tem comprovado ser altamente efetivo no tratamento de infecções fúngicas, mas infecções resistentes à terapia com fluconazol têm aumentado (FIDEL; CUTRIGHT; SOBEL, 1997; DOTA et al., 2010). Além disso, este apresenta pouca eficácia nos casos de candidíase causadas por *C. glabrata* (FIDEL; CUTRIGHT; SOBEL, 1997). Ferraza et al. (2005) sugeriram que a dificuldade no tratamento da CVV não estaria somente relacionada à suscetibilidade das leveduras aos antifúngicos. É possível observar uma tendência das espécies *C. não-albicans* dependerem de maiores concentrações de antifúngicos para serem inibidas. Esse dado fica claro considerando principalmente *C. glabrata* diante do fluconazol. Estes

autores observam ainda que essa espécie esta frequentemente associada à resistência aos antifúngicos também em infecções urinárias e sistêmicas, que costumam ser mais bem estudadas do que CVV.

Os compostos imidazólicos, são os de escolha nas micoses cutâneas e de mucosas, mas uma efetiva terapia requer que a substância ativa seja liberada no sítio de infecção numa adequada concentração para produzir um efeito farmacológico (FUCHS; WANNMACHER, 1998). A utilização de um sistema mucoadesivo termossensível de liberação local do fármaco para o tratamento de candidíases vulvovaginais, permitiria uma ação localizada, aumentando-se a disponibilidade e o tempo de contato entre o fármaco e a mucosa, obtendo uma eficácia maior da terapia e a diminuição de efeitos injeáveis das formas farmacêuticas tradicionais.

2.3 Própolis

O termo própolis é derivado do grego, significando em defesa (*pro*) da cidade (*polis*) (GHISALBERTI, 1979). Ela é empregada para defesa da colmeia, a cidade das abelhas (MOREIRA, 1986; BURDOCK, 1998; BRUSCHI, 2002). As abelhas, a partir de coleta de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores, produzem esse material. Trata-se de um forte adesivo, substância resinosa coletada, transformada e usada pelas abelhas (*Apis mellifera* L.) para selar frestas em suas colmeias, paredes internas e proteger a entrada contra intrusos (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2002). Essa resina sofre ação de enzimas salivares da própria abelha, principalmente a enzima 13-glicosidase, formando a própolis e o material, parcialmente digerido, é misturado com cera e usado na colmeia (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; BRUSCHI et al., 2002). Sua cor varia de amarelo-esverdeado a marrom-escuro, dependendo da origem e idade, com odor característico e picante (Figura 3) (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; BRUSCHI, 2006).

Figura 3 - Fotografias da própolis *in natura* e triturada



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

A própolis é difícil de ser removida da pele humana, uma vez que ela interage fortemente com os óleos e proteínas da pele. É dura e quebradiça quando fria, mas macia e maleável quando aquecida (GHISALBERTI, 1979). Normalmente a própolis *in natura* é processada e o extrato obtido é utilizado como forma farmacêutica final ou intermediária (BRUSCHI, 2006).

2.3.1 Histórico

A utilização de própolis já era descrita pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Era conhecida e utilizada pelos sacerdotes do Egito (1700 A.C.) como auxiliar na mumificação de cadáveres (propriedades anti-putrefativas). Os gregos são os responsáveis pelo seu nome e, entre os quais Hipócrates, a adotou como cicatrizante (GHISALBERTI, 1979; PEREIRA et al., 2002; BRUSCHI, 2006; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007). Aristóteles a cita em *História dos Animais* como “remédio para os males da pele, chagas e supurações”. No Século II, Galeno também cita a resina nos seus tratados. Nas Américas, os Incas a utilizavam no tratamento de infecções febris. São encontrados a partir do Século XII relatos de uso nos livros de medicina da Geórgia. Na idade moderna, o uso da própolis chegou a seu auge, como desinfetante e cicatrizante, na guerra dos Bôeres na África do Sul e também no começo do Século XIX no tratamento da doença de Chagas na França (CARMO, 1999; PAMPLONA, 1997; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007). Ela também está

presente na farmacopéia de Londres no Século XVII (CASTALDO; CAPASSO, 2002; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Ao longo dos tempos observou-se a versatilidade de atividade biológica da própolis. As atividades antibacteriana, hipotensora, antiviral, fungicida, antiúlcera, imunoestimulante e citostática, são as mais descritas (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1995; KUJUMGIEV et al., 1999; BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Sua utilização continua até hoje em medicamentos, alimentos funcionais e cosméticos. Estas aplicações incluem uma infinidade de itens dermatológicos, onde se procura a regeneração de tecido, tratamento de queimaduras, neurodermatites, úlceras de perna, psoríase, herpes simples e genital, pruridos e contra dermatófitos. Produtos à base de própolis têm sido utilizados no tratamento de reumatismo e na odontologia. A própolis é utilizada em cremes e em enxaguatórios bucais no tratamento de gengivites, queilites e estomatites. Também utilizada em produtos cosméticos, tais como cremes faciais, pomadas, loções e soluções. É comercializada em comprimidos, pó e goma de mascar (BURDOCK, 1998).

2.3.2 Origem botânica

A própolis é coletada na colmeia pelos apicultores, que raspam as paredes com uma ferramenta, normalmente um formão. Esta coleta é feita entre o outono e o inverno, depois que o mel é extraído (BRUSCHI, 2006).

Os constituintes da própolis refletem a sua origem botânica (Quadro 01) e, com o advento de análises químicas mais sofisticadas, pode-se identificar espécies de árvores que podem ser utilizadas como fonte de material para a produção de própolis pelas abelhas (BURDOCK, 1998). Na Europa, América do Sul, América do Norte e oeste da Ásia, a principal fonte de própolis é o exsudato de brotos de choupo (*Populus sp.*). Menos comumente, em outras partes do mundo, outros gêneros, como *Bétula sp.*, *Pinus sp.* e *Acacia sp.* são utilizados como fonte para as abelhas produzirem própolis (KÖNIG, 1985). Na Nova Zelândia, a própolis origina-se também de espécies do gênero *Populus* (BANKOVA et al., 1999).

Quadro 1 - Origem botânica da própolis.

Gênero e espécie	Localização geográfica	Referência
<i>Xanthorrhoea</i> sp.	Austrália	GHISALBERTI, 1979
<i>Populus nigra</i> , <i>P italica</i> , <i>P tremula</i> , <i>Betula verrucosa</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i> , <i>Salix alba</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Prunus padus</i> , <i>Prunus cerasus</i>	Bulgária	BANKOVA et al., 1992 ; BANKOVA et al., 1994; MARCUCCI, 1995 ; POPOVA et al., 2004 ; SALOMÃO et al., 2004
<i>Populus suaveolens</i>	Mongólia	BANKOVA et al., 1992
<i>Populus nigra</i>	Albânia	BANKOVA et al., 1994
<i>Betula</i> sp., <i>Populus</i> sp., <i>Pinus</i> sp., <i>Prunus</i> sp. e <i>Acacia</i> sp., <i>Aesculus hypocastanum</i>	Hungria	MARCUCCI, 1995
<i>Betula</i> sp., <i>Alnus</i> sp.	Polônia	MARCUCCI, 1995
<i>Populus nigra</i>	Espanha	GARCÍA-VIGUERA; GREENAWAY; WHATLEY, 1992
<i>Eucalyptus</i> sp	Egito	HADY; HEGAZI, 2002
<i>Populus</i> sp.	Itália	PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002
<i>Populus</i> sp.	China	HU et al., 2005
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC., <i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.), <i>Pinus</i> sp., <i>Schinus terebenthifolius</i>	Brasil	BRUSCHI et al., 2002; MANI et al., 2006; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007
<i>Populus</i> sp.	Turquia	SILICI; KOC, 2006

No Brasil existem diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para a retirada de resina, estas plantas ainda não foram todas identificadas, mas destacam-se o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), pinheiros (*Pinus*

sp.), aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (BRUSCHI et al., 2002).

2.3.3 Composição química

A composição química da própolis é muito complexa e está diretamente relacionada com a flora existente ao redor do apiário, a qual pode variar de região para região em um mesmo território (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; POPOVA et al., 2004).

A sua composição química é complexa e, em geral, consiste de aproximadamente 50% de compostos resinosos principalmente polifenóis (constituída por flavonóides e ácidos fenólicos), outros compostos são 30% de cera, 10% de óleos voláteis e ácidos aromáticos, 5% de bálsamos e pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo impurezas (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; INHOF et al., 2005; CVEK et al., 2007; MIGUEL et al., 2010). A própolis é considerada um mistura complexa com mais de 300 constituintes foram isolados (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; MIGUEL et al., 2010), principalmente polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenóides, esteróides e aminoácidos (MIGUEL et al., 2010).

Na Europa, América do Norte e Ásia a fonte de exsudado para as abelhas é a *Populus* sp., sendo assim somente um tipo de própolis é encontrada nessas regiões (KÖNIG, 1985). Entretanto na América do sul a espécie *Populus* sp não é nativa, existindo uma grande diversidade para retirada da resina, dificultando inclusive a correlação da própolis com a fonte produtora. Análises de própolis do Brasil confirmaram a presença significativa de polifenóis, além dos flavonóides, que são comumente encontrados em maiores quantidades nas própolis de regiões temperadas (MARCUCI, 1995; PEREIRA et al., 2002; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Nos recentes anos, vários estudos da atividade antibacteriana da própolis em locais distintos têm sido feita e os resultados demonstram semelhança, embora a própolis de diferentes origens tenham diferentes composições, eles possuem efeitos antimicrobianos similares (D'AURIA, 2003; KOC et al., 2005). No entanto, a sua composição varia qualitativa e quantitativamente com a origem geográfica e botânica. Por causa da diferença geográfica, amostras de própolis da Europa, América do Sul e Ásia têm composições químicas diferentes e, conseqüentemente,

diversas atividades biológicas (BANSKOTA et al, 2001;. KUMASAWA et al, 2004; MIGUEL et al, 2010).

No Brasil a fonte botânica predominante para coleta de material para produção da própolis é o alecrim do campo (*Baccharis* sp), nesse tipo de própolis estudos tem demonstrado uma predominância de polifenóis (FUNARI; FERRO;MATHOR, 2007). Polifenóis são um dos mais importantes grupos de compostos que ocorrem em plantas. Em geral, os polifenóis são divididos em pelo menos 10 grupos dependendo da sua estrutura básica. Dentre os cerca de 300 compostos isolados, a grande maioria são polifenóis (MIGUEL et al, 2010).

Flavonóides e ácidos fenólicos contituem a mais importante classe de polifenóis. Os flavonóides biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais (ZUANAZZI, 2000; BRUSCHI, 2006; MIGUEL et al, 2010).

Os flavonóides são protetores contra doenças causadas por micro-organismos em plantas. Eles podem servir como alimento dissuasivo contra insetos e animais herbívoros. Alguns destes podem reagir com enzimas e, como conseqüência, interferir em processos biológicos, possuindo assim atividade farmacológica potencial (BRUSCHI, 2002; ZUANAZZI, 2000).

A composição fenólica da maioria das amostras de própolis investigadas até hoje demonstra ser similar e isso pode ser esperado devido à origem mais ou menos comum dos exsudatos de brotos. Ao contrário, Bankova et al. (1994) observaram substanciais diferenças na composição de voláteis em própolis de diferentes locais, indicando que a composição destes na própolis varia de acordo com a origem dos exsudatos dos brotos de diferentes árvores.

A literatura atribui a atividade biológica da própolis em grande parte aos polifenóis (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007; MIGUEL et al, 2010). Flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, e compostos fenólicos aparecem como os principais componentes responsáveis por suas atividades biológicas (MIGUEL et al., 2010).

2.3.4 Atividade biológica

As atividades biológicas da própolis têm sido estudadas extensivamente na Europa (principalmente nos países do leste) (BURDOCK, 1998), no Brasil (BRUSCHI, 2006), na Argentina (MORENO et al., 2000) e no Japão.

Existe um grande número de constituintes na própolis e em seus extratos que são comuns em vegetais, alguns dos quais são bem conhecidos pelas suas atividades biológicas. Destas substâncias, nenhuma contribui mais para os efeitos observados que os compostos fenólicos e seus derivados. Eles ocorrem naturalmente nas plantas e possuem uma grande variedade de efeitos bioquímicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, capacidade de inibir enzimas dentre outras atividades biológicas benéficas para a saúde humana (MOREIRA, 1986; BANKOVA et al., 1999; BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2003; INHOF et al., 2005; BRUSCHI, 2006; CVEK et al., 2007; MIGUEL et al., 2010).

2.4 Própolis e candidíase

Preparações com própolis têm demonstrado atividades antimicrobianas *in vitro* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *Helicobacter pylori*, protozoários, fungos e vírus (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Em geral, bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a própolis que Gram-negativas. Outros estudos têm demonstrado a atividade da própolis frente à *Candida* (OTA et al., 2001, INHOF et al., 2005; DOTA et al., 2010). Tem sido relatada a susceptibilidade de vários micro-organismos a própolis, mas seu mecanismo específico de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mais estudos são necessários para esclarecer se a estrutura celular e a permeabilidade a tais compostos ou até alvos específicos do sistema enzimático da célula estão envolvidos na susceptibilidade microbiana (KOC et al., 2005).

Própolis destaca-se quando se procura um tratamento potencialmente eficaz e de baixo custo (OLIVEIRA et al., 2006). Trata-se de uma gomo-resina considerada um 'antibiótico natural' sem graves efeitos colaterais, em comparação com tratamentos utilizando sintéticos (BURDOCK, 1998). O tratamento de CVV convencional não é muito efetivo, sob estas circunstâncias, a própolis tem sido recomendada tanto na monoterapia quanto em associação com outros produtos farmacêuticos por ter demonstrado comprovada atividade antimicrobiana

(BURDOCK, 1998; CASTALDO; CAPASSO, 2002). Além disso, o alto custo do tratamento representa um sério problema para o Sistema Público de Saúde (OLIVEIRA et al., 2006). A própolis pode ser utilizada como ativo de escolha para tratamentos desta desordem, possuindo como vantagens além do baixo custo, a ausência de toxicidade e efeitos indesejáveis (BURDOCK, 1998).

Sozinho ou incorporado em outra forma farmacêutica, o extrato etanólico de própolis é geralmente utilizado em terapias, como cicatrizante, para regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermatites, úlceras em membros inferiores, psoríase, herpes simples e genital, reumatismo e entorses, doença periodontais, candidíases, quelites, estomatites, gripes e resfriados (BRUSCHI, 2006; DOTA et al., 2010).

O extrato etanólico de própolis tem efeito irritante na mucosa (CESCHEL et al., 2002; DOTA et al., 2010). Além disso, a utilização de sistemas microparticulados pode servir para controlar odores e sabores desagradáveis, proteger o fármaco da umidade ou oxidação, alterar a solubilidade, retardar a volatilização, remover solventes indesejáveis, para prevenir incompatibilidades e modificar a liberação (BRUSCHI et al., 2003, BRUSCHI, 2006, ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009).

2.5 Sistemas de liberação de fármacos para administração vaginal

2.5.1 Mucosa vaginal como um local para a liberação de fármacos

A via oral é talvez a via de administração de medicamentos preferida por pacientes e médicos (VALENTA, 2005; BRUSCHI, 2006). Embora a administração oral de fármacos tenha desvantagens, tais como:

(A) Metabolismo de primeira passagem hepática e degradação enzimática no trato gastrointestinal (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005);

(B) Limitação de absorção de alguns medicamentos, devido às características físico-químicas (por exemplo, solubilidade em água) (VALENTA, 2005);

(C) Irritação da mucosa gastrointestinal (VALENTA, 2005);

(D) Problemas na absorção como propulsão na presença de alimentos ou outras fármacos;

(E) Necessidade adesão do paciente (VALENTA, 2005).

Essas desvantagens podem limitar ou impedir a administração oral de certas classes de fármacos, especialmente peptídeos e proteínas, exceto quando eles são

inseridos por meio de sistemas de liberação cólon específica (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005). Essas limitações motivaram a exploração de outros locais para administração de sistemas de liberação de fármacos (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; GARG et al., 2005). Rotas transmucosas para administração de fármacos (por exemplo, a mucosa nasal, retal, ocular, vaginal, e a cavidade oral) oferecem diversas vantagens sobre a administração oral de fármacos de ação sistêmica (CHIDAMBARAM et al., 1995; VALENTA, 2005; BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007). Essas vantagens incluem a possibilidade de evitar o efeito de primeira passagem hepática e evitar a eliminação pré-sistêmica no trato gastrointestinal (CHIDAMBARAM et al., 1995; BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; VALENTA, 2005; BRUSCHI, 2006).

A via de administração vaginal tem muitas vantagens em comparação com outras rotas transmucosa, como:

(A) A presença de uma rede densa de vasos sanguíneos faz da vagina uma excelente via de administração de fármacos tanto de ação local quanto sistêmica (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005, BALOGLU et al., 2009).

(B) Vagina fornece um local promissor para liberação de fármacos de ação sistêmica devido à sua grande área de superfície de absorção (VALENTA, 2005);

(C) A possibilidade da manutenção dentro da cavidade vaginal por longos períodos (diurnos e noturnos), diminuindo a frequência de administração (VALENTA, 2005; WANG et al., 2008);

(D) Em numerosos estudos tem sido mostrado que ela possui uma boa permeabilidade para uma ampla gama de compostos incluindo peptídeos e proteínas (VALENTA, 2005);

(E) Ausência de efeitos colaterais gastrointestinais (VALENTA, 2005; BALOGLU et al., 2009);

(F) A facilidade de auto-inserção e remoção da forma farmacêutica (VALENTA, 2005; BALOGLU et al., 2009).

(G) Contato prolongado de um sistema liberação de fármacos na mucosa vaginal pode ser alcançado mais facilmente do que em outros locais de absorção, como reto ou mucosa intestinal (VALENTA, 2005; WANG et al., 2008);

Além disso, a vagina, ao contrário de outros sistemas, é altamente dinâmica no que diz respeito à absorção de fármacos, seu metabolismo e sua eliminação (GUPTA et al., 2009). Sistemas de liberação vaginal de fármacos (SLFV) têm sido

nos últimos anos um proeminente campo de pesquisa (VALENTA, 2005; DAS NEVES et al., 2008). SLFV são usados para contracepção, infecções vaginais, manutenção de higiene e saúde vaginal (VALENTA, 2005; ALAM et al., 2007). Formas farmacêuticas vaginais comerciais incluem comprimidos, pessários, filmes, esponjas, espumas, cremes, géis, soluções, pomadas, óvulos, cápsulas gelatinosas moles, duchas, supositórios e anéis vaginais. As formulações vaginais mais comuns são comprimidos e géis (ALAM et al., 2007).

Além disso, vários inconvenientes, incluindo sensibilidade cultural, higiene pessoal, a especificidade de gênero, irritação local e influência da relação sexual, precisam ser abordados durante o projeto de uma formulação vaginal (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005). Também é observada uma grande variabilidade na taxa e extensão da absorção de fármacos devido a mudanças na espessura do epitélio vaginal (HUSSAIN; AHSAN, 2005).

Sistemas de liberação local na cavidade vaginal tem um grande número de aplicações como o tratamento de vaginites (CVV e tricomoníase) (ALAM et al. et al., 2007). A administração local de fármacos via vaginal permite a ação localizada na mucosa vaginal (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005). Conseqüentemente, os estudos sobre a liberação de agentes antimicrobianos, por exemplo, de própolis (DOTA et al., 2010), clindamicina (GUPTA et al., 2009), fluconazol (BACHHAV et al., 2009), o clotrimazol (CESCHEL et al., 2001) ou metronidazol (BHOWMIK et al., 2009), a partir de sistemas poliméricos, e a avaliação dos seus efeitos clínicos têm sido realizados. Tem sido sugerido que polímeros mucoadesivos podem ser úteis na terapia vaginal (GARG et al., 2005; HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005; BALOGLU et al., 2009; SHAIKH et al., 2011).

2.5.2 Estratégias para a liberação de fármacos na mucosa vaginal

Diversas estratégias farmacotécnicas envolvendo a administração de fármacos na cavidade vaginal, para ação local ou sistêmica têm sido propostas e até mesmo algumas já chegaram ao mercado (HUSSAIN; AHSAN, 2005). As formas farmacêuticas convencionais (por exemplo, comprimidos, cremes, géis, óvulos, e espumas) têm uso limitado devido a formulação possuir, geralmente, pouca retenção no trato vaginal, ser rapidamente removida devido a mecanismos fisiológicos do trato reprodutivo (CESCHEL et al., 2001; PAVELIĆ et al., 2004; VALENTA, 2005; ALAM et al., 2007; BILENSOY et al., 2007; AHMAD et al., 2008; BHOWMIK et al.,

2009; SHAIKH et al., 2011) e ao escoamento e em consequência efeitos terapêuticos insuficientes (VALENTA, 2005; BRUSCHI, 2006; YOO et al., 2006; ALAM et al., 2007; BILENSOY et al., 2007). Além disso, formulações convencionais com múltiplas administrações resultam em baixa adesão pela paciente (ALAM et al., 2007; BILENSOY et al., 2007; AHMAD et al., 2008). As formas farmacêuticas vaginais convencionais mais utilizadas são soluções, géis, suspensões, supositórios, cremes e comprimidos e todos possuem curto tempo de residência (SHAIKH et al., 2011). Sabe-se que pacientes tem preferência por produtos vaginais na forma de géis ou pomadas (HUSSAIN; AHSAN, 2005). SLFV têm sido usados para contracepção, infecções vaginais, manutenção da higiene e da saúde vaginal (ALAM et al., 2007; SHAIKH et al., 2011).

Nos últimos anos tem crescido o interesse no desenvolvimento de vacinas para administração na mucosa contra uma variedade de patógenos microbianos. Várias rotas de imunização da mucosa vêm sendo estudados em um esforço para melhorar as respostas humoral e sistêmica contra esses patógenos (HAN et al., 2006; GOODSELL et al., 2007) como *Trichomonas vaginalis* e *Gardenerella vaginalis*, entre outros (PAVELIĆ et al., 2004; DIAS et al., 2005; GARG et al., 2005; SIMÕES et al., 2005). A administração intravaginal promove uma promissora vacinação não invasiva (HAN et al., 2006; GOODSELL et al., 2007). As mulheres por possuírem uma grande superfície de contato na cavidade vaginal, enfrentam um risco maior de contrair doenças sexualmente transmissíveis (DST), como o HIV, devido à exposição da mucosa aos fluidos seminais, a alta prevalência de sexo não consensual, o sexo sem o uso do preservativo, e aos desconhecidos comportamentos de alto risco dos seus parceiros (GARG et al., 2005). Esforços para desenvolver vacinas contra o HIV não foram bem sucedidas até agora, principalmente devido a natureza "dinâmica" do vírus (GARG et al., 2005). Ferramentas de prevenção padrão, como o uso de preservativos e modificações comportamentais (monogamia e abstinência sexual) também tem demonstrado serem insuficientes para limitar a propagação de DST (GARG et al., 2005; GUPTA et al., 2009; NDESENDO et al., 2010). Sob estas condições, uma nova categoria de agentes profiláticos e formulações conhecidas como "microbicidas" estão sendo desenvolvidas na esperança de controlar e impedir a disseminação rápida de DSTs (HARRISON et al., 2000; ZANEVELD et al., 2001; GARG et al., 2005; YOO et al., 2006; GUPTA et al., 2009; NDESENDO et al., 2010). Eles também podem ter um

benefício terapêutico em infecções sexualmente transmissíveis, como as causadas por *Candida*, *Chlamydia* e *Neisseria gonorrhoea*. Assim, SLFV precisam residir nos locais de infecção por um período prolongado de tempo para serem eficazes (GUPTA et al., 2009). SLFV convencionais têm sido limitados em uso devido à pobre retenção no trato vaginal (PAVELIĆ et al., 2004; Valenta, 2005; ALAM et al., 2007; BILENSOY et al., 2007; Ahmad et al., 2008; BHOWMIK et al., 2009 ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; SHAIKH et al., 2011).

Neste contexto, novos SLFV têm sido desenvolvidos na intenção de liberar fármaco durante um período de tempo definido (HUSSAIN; AHSAN, 2005; VALENTA, 2005; ALAM et al., 2007; BILENSOY et al., 2007; Ahmad et al., 2008; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; BHOWMIK et al., 2009) . Diferentes técnicas vem sendo adotadas no desenvolvimento de sistemas de liberação como a utilização de nanopartículas, lipossomas e ciclodextrinas, entre outros, para veiculação de fármacos (VALENTA, 2005; BILENSOY et al., 2006; BILENSOY et al., 2007; BALOGLU et al., 2009). Ciclodextrinas são utilizadas na área farmacêutica para formar complexos de inclusão com moléculas de fármacos, dessa forma consegue-se um aumento da solubilidade em água, uma melhora na estabilidade em água ou da fotoestabilidade, mascarar características indesejáveis ou reduzir efeitos colaterais, e também controlar a liberação de ativos (BILENSOY et al., 2006; BILENSOY et al., 2007). Microemulsões tem recebido uma grande atenção na utilização de sistemas de liberação de agentes hidrofóbicos para tratamento sistêmico e local (BACHHAV et al., 2009). No entanto, é essencial que a forma farmacêutica fique aderida à mucosa vaginal, aumentando assim o tempo de residência do fármaco na vagina. Isto pode ser alcançado utilizando-se na microemulsão materiais adesivos (BACHHAV et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Formulações líquidas para administração local, como na área dos olhos, bolsa periodontal, mucosas vaginal, bucal ou nasal, podem ser desenvolvidas para gelificar devido a mudanças químicas e/ou físicas induzidas por condições fisiológicas. Esta gelificação *in situ* pode ser induzida por uma mudança no pH por alterações nas concentrações de íons cálcio (por exemplo, Gelrite[®]) ou por aumento da temperatura, como em sistemas termossensíveis, utilizando-se polissacarídeos (por exemplo, celulose e derivados, xiloglucana, quitosana), N-isopropilacrilamida e poloxamers (CHANG et al., 2002; Han et al., 2006; BILENSOY et al., 2007; DURMOTIER, 2006). A capacidade de intumescimento do polímero também é

relatada como ponto importante no comportamento bioadesivo e tem um grande impacto sobre estabilidade e os perfis de liberação dos fármacos incorporados (YOO et al., 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). A extensão e a razão de absorção de água são afetadas pelo grau de reticulação e comprimento das cadeias das macromoléculas mucoadesivas. A adesividade aumenta com o grau de hidratação, mas não é um processo ilimitado. Um intumescimento excessivo provoca uma diminuição na coesividade das formulações e uma queda abrupta na força adesiva devida ao desentrelaçamento na interface polímero-substrato (YOO et al., 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010).

Sistemas bioadesivos podem controlar a taxa de liberação de fármacos e estender o tempo de residência na cavidade vaginal (CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). A bioadesão pode ser usada para melhorar o contato, bem como aumentar o tempo de residência da forma farmacêutica, podendo ser utilizada para várias vias de administração (CHANG et al., 2002; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). Estas formulações podem conter fármacos ou, simplesmente, agir em conjunto com agentes hidratantes para o controle de secreta vaginal (SHAIKH et al., 2011).

Portanto, as vantagens em se usar sistemas terapêuticos mucoadesivos são muitas, pois estes podem manter terapêuticamente concentrações efetivas do fármaco diretamente no local de infecção (BONACUCINA, 2004; CARVALHO et al., 2010) sem o uso de uma concentração superior a necessária para se ter o efeito terapêutico no local desejado, diminuindo assim problemas de alta toxicidade e efeitos adversos, promovendo com isso uma maior adesão do paciente ao tratamento (BRUSCHI et al., 2003; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; DOTA et al., 2010). Para tanto, deve ser ressaltada a importância da formulação e da tecnologia bem equilibrada, para obter-se um sistema adesivo que cumpra seu papel, aderindo de maneira eficaz na mucosa e liberando o fármaco de modo prolongado (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Com isso, uma real contribuição ao melhoramento da atividade farmacológica pode ser encontrada nos processos farmacotécnicos, através de recursos capazes de alterar características físico-químicas e biológicas importantes na definição da atividade destes compostos. Sistemas de liberação controlada, especialmente sistemas de liberação sítio-específico, que liberam o fármaco para o local de ação

desejado, reduzem a quantidade total no sangue, diminuindo, desse modo, a chance de reação adversa no sítio de ação (LARA; GARCIA; PANZERI, 1998; BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

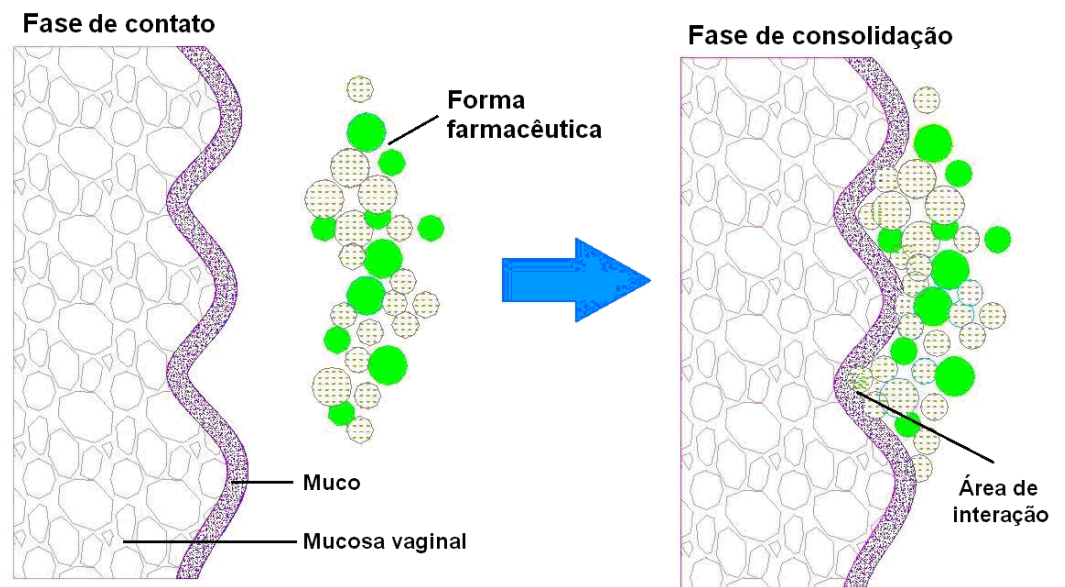
Sistemas de liberação mucoadesivos de fármacos são reportados por fornecer como vantagem um contato íntimo e prolongado da formulação com a mucosa doente e pela alta resistência aos mecanismos fisiológicos de remoção (BRUSCHI, 2006; CARVALHO et al., 2010). O objetivo de todos eles é promover uma quantidade terapêutica de fármaco(s) no local adequado do corpo para conseguir, rapidamente, e depois manter uma concentração eficaz (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Proporcionando, por um longo período, efeitos terapêuticos que, pelas formas convencionais, somente poderiam ser alcançados após múltiplas administrações (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). Além disso, outra vantagem de tratamentos terapêuticos com sistemas mucoadesivos alvo-específico é pode ser rapidamente suspensas pela remoção do sistema. Finalmente, os sistemas mucoadesivos de liberação minimizam a administração do medicamento, o que redundam em maior conforto ao paciente (LARA; GARCIA; PANZERI, 1998; BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

A mucoadesão é afetada pela ação sinérgica no ambiente biológico, pelas propriedades do sistema polimérico, e pela presença do fármaco em si. As interações mucoadesivas dependem de ambos os componentes que formam o contato: o polímero mucoadesivo, como componente do sistema de liberação de fármacos, e o muco, que recobre a superfície da mucosa (Figura 4) (BOGATAJ, 1999; BRUSCHI, 2006; CARVALHO et al., 2010).

De acordo com Wong et al. (1999) a principal propriedade da bioadesão é a força de adesão da forma farmacêutica ao tecido biológico. O uso de sistemas mucoadesivos tem sido uma alternativa para aumentar a eficácia de tratamentos tradicionalmente realizados por via oral que acarretam desvantagens para pacientes e sistema público de saúde (LARA; GARCIA; PANZERI, 1998; BONACUCINA, 2004; CARVALHO et al., 2010). Os atributos desejáveis para um sistema mucoadesivo para a liberação prolongada são: a alta capacidade de carreamento de fármaco, boa mucoadesão, não ser irritante, ser confortável e liberar o fármaco por um tempo

prolongado (BRUSCHI et al., 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Figura 4 - As duas etapas do processo de mucoadesão.



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

Formas farmacêuticas mucoadesivas vêm sendo sugeridas para a liberação de fármacos para administração vaginal, incluindo sistemas sólidos e semissólidos composta por diversos polímeros (Quadro 2).

Quadro 2 - Polímeros mucoadesivos utilizados em sistemas vaginais (sozinhos ou combinados)

Polímeros	Referências
Carbopol 934P [®]	PATEL et al., 2009
Carbopol 934P [®] e Hidroxipropilmetilcelulose ou Carboximetilcelulose sódica	DIAS et al., 2005; SHARMA et al., 2006; YOO et al., 2006
Carbopol 974P [®]	PAVELIC et al., 2004; DAS NEVES et al., 2008; CHOPRA et al., 2007; BHOWMIK et al., 2009
Carbopol ETD-2020 [®] , Alginato de sódio e Hidroxipropilmetilcelulose	BACHHAV et al., 2009
Carboximetilcelulose	ZANEVELD et al., 2001
Quitosana	VALENTA et al., 2001; KAST et al., 2002; BONFERONI et al., 2006; GUPTA et al., 2009; PERIOLI et al., 2008; PERIOLI et al., 2009a; PATEL et al., 2010
Celulose microcristalina e Goma xantana	D'CRUZ, 2005
Pluronic F127 [®] e Hidroxipropilmetilcelulose	BILENSOY et al., 2006; BILENSOY et al., 2010
Poloxamer 407, Poloxamer 188 e Policarbofil	CHANG et al., 2002
Poloxamer P407, Poloxamer P188, Polyox [®] WSR-1105 e Noveon [®] AA1	HAN et al., 2006
Policarbofil e Hidroxietilcelulose ou Hidroxipropilmetilcelulose ou Carboximetilcelulose sódica	CESCHEL et al., 2001; ALAM et al., 2007; CURRAN et al., 2009
Álcool polivinílico, Hidroxietilcelulose e Hidroxipropilmetilcelulose	GARG et al., 2005
Alginato de sódio e Quitosana	EL-KAMEL et al., 2002

Um polímero ideal para utilização em sistemas mucoadesivos para liberação de fármacos via vaginal não deve ser tóxico e não pode ser absorvido através da

membrana mucosa, não causar irritação na mucosa, preferencialmente formar ligações não-covalentes com a mucina das células epiteliais da superfície, aderir rapidamente ao tecido úmido e deve possuir um sítio específico, permitir a fácil incorporação do fármaco e não oferecer impedimento para sua liberação, não se decompor durante o armazenamento ou durante o prazo de validade da forma farmacêutica, ter baixo custo, e permitir flexibilidade e conforto da forma farmacêutica (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; HUSSAIN; AHSAN 2005; VALENTA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; SHAIKH et al., 2011).

As propriedades físico-químicas das formulações mucoadesivas são caracterizadas em vários aspectos. O ângulo de contato é usado como uma indicação do grau inicial de molhabilidade, quanto menor o valor do ângulo de contato maior o grau de molhabilidade e hidrofiliabilidade (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). É relatado que o ângulo de contato está estreitamente relacionado com o trabalho de adesão, representado na mucoadesividade de formulações contendo Carbopol[®]. Sistemas formados *in situ* são baseados em diferentes estratégias, como irradiação UV, alteração do pH e/ ou temperatura (YOO et al., 2006).

Materiais bioadesivos que conseguem aderir a tecidos moles têm grande potencial em aplicações clínicas (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010). Polímeros que podem formar interações adesivas com substratos biológicos têm sido relatados por vários autores por oferecer certas vantagens para a liberação de fármaco, incluindo o tempo de permanência prolongada e localização em sítios específicos (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Uma grande variedade de polímeros, naturais e sintéticos, têm sido estudados por seu uso potencial como mucoadesivos. Polímeros que aderem à mucina da superfície epitelial podem ser divididos em três grandes categorias:

- 1) Os polímeros que se tornam aderentes quando colocados em água, tornando-se bioadesivos;

- 2) Os polímeros que aderem por meios não específicos, interações não covalentes que são essencialmente de natureza eletrostática (apesar de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas poderem ser significativas);

3) Os polímeros que se ligam a receptores específicos na superfície celular (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al, 2009; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Géis vaginais com polímeros mucoadesivos como policarbofil, Carbopol[®], hidroxipropilcelulose e polivinilpirrolidona, aumentam a adesão de formas farmacêuticas em mucosas e podem estar combinadas com polímeros termossensíveis, como o poloxamer, adquirindo assim a propriedade de gelificação *in situ*, por alteração da temperatura (BILENSOY et al., 2006). Poloxamers são copolímeros que foram introduzidos no final de 1950, e desde então têm sido propostos para diversas aplicações farmacêuticas (DURMOTIER et al., 2006). São conhecidos por sua excelente compatibilidade com outros polímeros, além da sua capacidade de dispersar fármacos com características diversas, demonstrando assim características ideais para serem utilizados em sistemas de liberação modificada de fármacos (CHANG et al., 2002). Poloxames são formados por blocos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) dispostos em uma estrutura tribloco $EO_x-PO_y-EO_x$ (CHANG et al., 2002, BRUSCHI, 2006; DURMOTIER et al., 2006). Sua fórmula química é $HO [CH_2-CH_2O]_x [CH (CH_3)-CH_2O]_y [CH_2-CH_2O]_x OH$, y é maior que 14. Marcas registradas desses copolímeros (por exemplo, Pluronic[®], Synperonic[®] ou Tetryonic[®]..) representam uma vasta gama de produtos líquidos, pastosos e sólidos. Eles são sintetizados pela polimerização em sequência de monômeros de PO e EO na presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (DURMOTIER et al., 2006).

Poloxamers têm sido amplamente utilizados em formulações farmacêuticas para uso nasal, ocular e vaginal devido a sua propriedade termossensível (DURMOTIER et al., 2006; HAN et al., 2006). No entanto, embora poloxamers permitam confortável liberação local de fármacos terapêuticos em formas farmacêuticas líquidas, seguido por gelificação nos locais de ação e longo prazo para liberação modificada, este polímero não possui propriedades mucoadesivas (DURMOTIER et al., 2006; JONES et al., 2009). Polímeros mucoadesivos, polietilenoglicol (PEO) e policarbofil (PC) têm sido usados para aumentar o contato de compostos terapêuticos com a mucosa em uma variedade de formulações farmacêuticas tópicas (DURMOTIER et al., 2006).

Neste sentido, um grande número de SLFV tem sido desenvolvido para administração de fármacos, utilizando um aplicador ou especificamente projetados

para a administração intravaginal. Além disso, as formulações vaginais podem ser desenvolvidas para ação local como os espermicidas ou antibacterianos, ou para ação sistêmica como a liberação contínua de contraceptivos (HUSSAIN; AHSAN, 2005; GARG et al., 2005; SHAIKH et al., 2011). Algumas preparações comercializadas e sua função estão demonstradas no Quadro 3.

Quadro 3 - Preparações mucoadesivas vaginais comercializadas

Fármaco (Nome comercial)	Uso	Forma Farmacêutica	Empresa
Progesterona (Prochieve [®])	Infertilidade, amenorréia secundária	Gel	Fleet Laboratories
Nonoxynol-9 (Gynol II [®])	Contracepção	Gel	McNeil-PPC, Inc
Tampão (Buffer Gel [®] - em fase II e III)	Contracepção	Gel	ReProtect, Limited Liability Company
Dinoprostone (Prostin E2 [®])	Indução do parto	Supositório	Pharmacia
Ácido 2-Naftalenosulfônico (PRO 2000/5 [®] - em fases II and III)	Contracepção	Gel	Endo Pharmaceuticals
Progesterona (Prochieve [®])	Infertilidade, amenorréia secundária	Gel	Fleet Laboratories
Chlorhexidine (Clomirex [®])	Infecção bacteriana	Gel	Mipharm Spa
Flúor (Mifluor [®])	Secura vaginal	Gel	Mipharm Spa
Butoconazol (Gynazole [®])	Infecção fúngica	Crème	Sigma-Pharma
Metronidazol (Metrogel Vaginal [®])	Vaginose bacteriana	Gel	3M Pharmaceuticals
Estradiol (Vagifem [®])	Vaginite atrófica	Comprimido vaginal	Novo Nordisk
Nonoxynol-9 (Conceptrol [®])	Contracepção	Gel	McNeil-PPC, Inc

continua

continuação			
Fármaco (Nome comercial)	Uso	Forma Farmacêutica	Empresa
Tampão (Aci-Jel [®])	Restauração e manutenção da acidez vaginal	Gel	Care Pharmaceuticals
Nonoxynol-9 (Advantages [®])	Contracepção	Gel	Columbia Laboratories
Glicerina (Replens [®])	Secura vaginal	Hidratante	LDS Consumer Products
Hidroxietilcelulose e Glicerina (K-Y Gel [®])	Lubrificante	Gel	Johnson & Johnson

2.5.2.1 Comprimidos vaginais, óvulos e supositórios

Um grande número de medicamentos vaginais estão disponíveis na forma de comprimidos ou supositórios. Alguns autores utilizam os termos óvulos e supositórios de forma intercambiável e consideram comprimidos vaginais como uma outra forma farmacêutica (HUSSAIN; AHSAN, 2005).

Os comprimido amolecem e aderem ao sunbstrato e são mantidos no local de ação até completa dissolução e/ou liberação (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; HUSSAIN; AHSAN, 2005). Depois de um curto período de tempo com o comprimido ele torna-se imperceptível para a paciente. Estas formulações vaginais são projetadas para dissolver na cavidade vaginal e liberar o fármaco durante várias horas. Supositórios são agora mais comumente usados para administração de medicamentos para o amadurecimento cervical antes do parto e liberação local de fármacos (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Polímeros com propriedades mucoadesivas são por vezes utilizados na formulação de comprimidos vaginais para aumentar o tempo de residência vaginal. (CESCHEL et al., 2001; HUSSAIN; AHSAN, 2005; SHAIKH et al., 2011). Os materiais e fármacos utilizados em comprimidos, óvulos e supositórios mucoadesivos estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Materiais e fármacos utilizados em comprimidos, óvulos e supositórios mucodesivos

Materiais	Farmáco(s)	Referência(s)
Carboximetilcelulose	Nonoxynol-9	ZANEVELD et al., 2001
Policarbofil e Hidroximetiletilcelulose	Clotrimazol	CESCHEL et al., 2001
Alginato de sódio e Quitosana	Metronidazol	EL-KAMEL et al., 2002
Quitosana	Clotrimazol	KAST et al., 2002
Carbopol [®] 934P e Hidroximetiletilcelulose	Metronidazol	DIAS et al., 2005
Carbopol [®] 934P e Carboximetilcelulose sódica	Clotrimazol	SHARMA et al., 2006
Policarbofil e Carboximetilcelulose sódica	Monocitrato de sódio, Clotrimazol, Metronidazol	ALAM et al., 2007
Hidroxietilcelulose e Policarbofil	HIV-1 envelope (CN54gp140)	CURRAN et al., 2009
Hidroximetiletilcelulose e Quitosana	Cetoconazol	PATEL et al., 2010

2.4.2.2 Semissólidos e filmes

Semissólidos são usados para liberação tópica de anticoncepcionais e medicamentos antimicrobianos. Estas formas de dosagem vaginal devem ser fáceis de aplicar e não devem ser tóxicas ou causar irritação à mucosa. Em muitas partes do mundo, filmes vaginais são preferidos a semissólidos (GARG et al., 2005) devido ao seu apelo estético. Além disso, os filmes têm várias vantagens:

- (a) Portabilidade;
- (b) Facilidade de aplicação (não necessita o uso de aplicador);
- (c) Fácil armazenamento e manuseamento;
- (d) Viabilidade da produção em larga escala;

(e) Maior estabilidade de medicamentos em condições extremas de temperatura e umidade, portanto, os filmes podem ser mais adequados do que géis para regiões de clima tropical (GARG et al., 2005; YOO et al., 2006).

Crems e géis vaginais podem ser formulados como emulsões ou hidrogéis para liberação de fármacos (HUSSAIN; AHSAN, 2005). Durante os últimos anos,

Os hidrogéis vêm sendo estudados de modo intenso como sistemas carreadores de fármacos, dadas as suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, permeabilidade e de intumescimento, assim como sua sensibilidade a estímulos. Hidrogéis são formados a partir de polímeros, os quais podem hidratar-se em meio aquoso, sem sofrer dissolução, atuando como sistemas de liberação dos fármacos confinados dentro da matriz, sendo destas liberados lentamente por difusão ou erosão após hidratação (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; HUSSAIN; AHSAN, 2005).

A principal desvantagem dos sistemas de liberação de fármacos é a pouca retenção no local de aplicação quando o polímero não possui propriedades adesivas. Este inconveniente pode ser minimizado ou eliminado através da incorporação de polímeros bioadesivos na formulação (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009 ; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). Além disso, o tempo de retenção formulação no local de aplicação está relacionado à eficácia dos polímeros bioadesivos, e a taxa e extensão da liberação depende das características físico-químicas do fármaco e da forma farmacêutica (BRUSCHI et al., 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009 ; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). Assim, as propriedades de liberação podem ser controladas pela no desenvolvimento de sistemas semissólidos e filmes para liberação de fármacos, tais sistemas tem como base Carbopol[®], poliacarbofil, álcool polivinílico, celulose microcristalina, hidroxietilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, polietilenoglicol, goma xantana, quitosana, entre outros. No Quadro 5 estão resumidos os materiais e fármacos utilizados em formulações mucoadesivas semissólidas e filmes.

Quadro 5 - Materiais e fármacos utilizados em formulações mucoadesivas semissólidas e filmes.

Materiais	Farmáco(s)	Referência(s)
Poloxamer 407, Poloxamer 188 e Policarbofil	Clotrimazol	CHANG et al., 2002
Carbopol 974P [®]	Cloranfenicol	PAVELIĆ et al., 2004
Cellulose microcristalina e Goma xantana	PHI-113, PHI-346, PHI-443 (microbicidas anti-HIV)	D'CRUZ et al., 2005
Alcool polivinílico, Hidroxietilcelulose e Hidroxipropilmetilcelulose	Polestireno sulfato (PSS)	GARG et al., 2005
Pluronic F127 [®] e Hidroxipropilmetilcelulose	Clotrimazol	BILENSOY et al., 2006
Quitosana	Ácido lático	BONFERONI et al., 2006
Poloxamer P407, Poloxamer P188, Polyox [®] WSR-1105 e Noveon [®] AA1	Antígeno Hepatite B (HBsAg)	HAN et al., 2006
Carbopol 934P [®] e Hidroxipropilmetilcelulose	Dodecil sulfato de sódio	YOO et al., 2006
Carbopol 974P [®]	<i>Trigonella foenum-graecum</i> , <i>Azadirachta indica</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Curcuma longa</i>	CHOPRA et al., 2007
Carbopol ETD-2020 [®] , Alginato de sódio e Hidroxipropilmetilcelulose	Fluconazol	BACHHAV et al., 2009
Carbopol [®] 974P	Metronidazol	BHOWMIK et al., 2009
Quitosana	Clindamicina	GUPTA et al., 2009
Pluronic F127 [®] e Hidroxipropilmetilcelulose	5-fluorouracil	BILENSOY et al., 2010

2.5.3 Estratégias de avaliação

Uma bioadesão eficaz é essencial para uma ação bem sucedida de um sistema mucoadesivo de liberação de fármacos na cavidade vaginal. A principal característica do bioadesão é a capacidade de fixação da forma farmacêutica ao tecido biológico, sendo portanto, necessário métodos de avaliação dos mecanismos dos polímeros mucoadesivos. Estes testes também são importantes durante o desenvolvimento de um sistema bioadesivo de liberação controlada, para garantir a compatibilidade, estabilidade física e mecânica e as forças bioadesivas (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; BRUSCHI et al., 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009; SHAIKH et al., 2011). Uma revisão sobre os métodos usados para avaliar a bioadesão os classificou em duas categorias principais, métodos *in vitro/ex vivo* e métodos *in vivo* (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; CARVALHO et al., 2010).

Os testes *in vitro* são os mais comumente utilizados para a determinação das propriedades mucoadesivas de polímeros (ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009 ; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). A força adesiva pode ser avaliada medindo-se a força necessária para separar a superfície da amostra e a superfície do corpo de prova, por meio da aplicação de uma tração ou tensão (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; GARG et al., 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009 ; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011).

Os testes *in vitro / ex vivo* baseados na medida da resistência à tensão (força necessária para romper a união adesiva entre um modelo de membrana e os polímeros testados) utilizam membranas obtidas de mucosas vaginais de animais (camundongo, porco, coelho, boi, ratos, hamster ou porquinho da Índia) (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; BRUSCHI, 2006; CARVALHO et al., 2010). Os resultados dos estudos fornecem importantes informações sobre os efeitos da densidade de cargas, hidrofobicidade, e condições como pH, força iônica, agentes mucolíticos, e da pressão aplicada sobre bioadesão (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; BRUSCHI et al., 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009; SHAIKH et al., 2011). Os instrumentos normalmente utilizados para medir a resistência à tensão são balança de carga, tensiômetros e analisadores de textura (Quadro 6) (BRUSCHI et al., 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009, JONES et al., 2009; SHAIKH et al., 2011).

Quadro 6 - Equipamentos e modelos de membrana utilizados em testes *in vitro*

Bioadesivo	Substrato	Equipamento	Referência(s)
Poloxamer 407, Poloxamer 188 e Policarbofil	Mucosa vaginal de ratas Sprague-Dawley	Analizador de textura	CHANG et al., 2002
Alginato de sódio e Quitosana	Mucosa intestinal de coelho	Balança de carga	EL-KAMEL et al., 2002
Quitosana	Mucosa vaginal de vaca	Cilindro rotatório	KAST et al., 2002
Alcool polivinílico, Hidroxietilcelulose e Hidroxipropilmetilcelulose	Mucosa vaginal de ovelha	Analizador de textura	GARG et al., 2005
Quitosana	Mucosa vaginal de porca	Tensiômetros	BONFERONI et al., 2006
Poloxamer P407, Poloxamer P188, Polyox [®] WSR-1105 e Noveon [®] AA1	Mucosas vaginais e nasais de animais	Analizador de textura	HAN et al., 2006
Carbopol 934P [®] e Carboximetilcelulose sódica	Mucosa vaginal de porca	Tensiômetros	SHARMA et al., 2006
Policarbofil e Carboximetilcelulose sódica	Mucosa vaginal de búfalo	Analizador de textura	ALAM et al., 2007
Carbopol 974P [®]	Mucosa vaginal de vaca	Analizador de textura	DAS NEVES et al., 2008
Carbopol ETD-2020 [®] , Alginato de sódio e Hidroxipropilmetilcelulose	Placa de Ágar com amostra imersa em tampão fosfato citrato em pH 4,5	Aparelho para teste de desintegração	BACHHAV et al., 2009
Quitosana	Mucosa vaginal de ovelha	Tensiômetros	GUPTA et al., 2009

3. OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar sistema semissólido mucoadesivo termossensível de liberação vaginal de própolis para o tratamento de candidíase vulvovaginal.

3.1 Objetivos específicos

- Realizar controle de qualidade da própolis.
- Preparar e avaliar a qualidade de extrato de própolis a ser incorporado no sistema mucoadesivo.
- Validar metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e polifenóis totais.
- Desenvolver sistema semissólido mucoadesivo termossensível e caracterizá-lo por meio de ensaios físico-químicos.
- Preparar sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis e caracterizá-lo por meio de ensaios físico-químicos.
- Realizar a avaliação antifúngica *in vitro* do extrato de própolis e do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas

- Acetato de Etila grau analítico (FMaia[®])
- Acetona grau analítico (FMaia[®])
- Ácido acético glacial (Dinâmica[®])
- Ácido clorídrico grau analítico (Vetec[®])
- Álcool etílico grau farmacêutico (96°GL)
- Carbopol 934P[®] (BF Goodrich[®])
- Carbonato de sódio (Nuclear[®])
- Éter de petróleo (Nuclear[®])
- Metanol grau analítico (FMaia[®])
- Mucina crua tipo II (Sigma-Aldrich[®])
- Padrão Crisina (Sigma-Aldrich[®])
- Padrão Ácido gálico monohidratado (Sigma-Aldrich[®])
- Poloxamer 407 (Lutrol[®] F127, BASF[®])
- Reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*)
- Solução de Carbonato de sódio 14,06% (p/V)
- Solução de hexametenotetramina 0,5% (p/p)
- Solução etanólica de cloreto de alumínio 2% (p/V)
- Solução metanólica de ácido acético glacial 5% (V/V)
- Sulfato de sódio grau analítico (Synth[®])
- Trietanolamina grau farmacêutico (Galena[®])

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico (Reidolph[®])
- Agitador mecânico (RW 20Digital - Ika[®])
- Agitador magnético (Lab disc - Ika[®])
- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom[®])
- Aparelho analisador de textura (TA-XTplus – Stable Micro Systems[®])
- Aparelho medidor de pH (Gehaka[®])

- Balança analítica (Shimatzu®)
- Balança de determinação de umidade com unidade de infravermelho (MB 200 - Ohaus®)
- Balança semi-analítica (Gehaka®)
- Banho-maria (Fisatom®)
- Câmara de fluxo laminar (Veco®)
- Células de difusão de Franz modificadas
- Centrifuga (206BL-Fanen®)
- Espectrofotômetro UV-VIS (UV 1650 PC - Shimatzu® ; Quimis®)
- Forno Mufla (Quimis®)
- Manta aquecedora termostaticada (Fisatom®)
- Membrana de acetato de celulose
- Microscópio óptico (Kozo Optics®)
- Pipeta automática (Eppendorf®)
- Reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado MARS II (Haake®)
- Shaker (Tecnal®)
- Sistema purificador de água por Osmose Reversa (OS 20 LX - Gehaka®)
- Turboextrator (Mallory®)

4.1.3 Outros

Cepas de referência de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e isolados clínicos *C. albicans* de CVV, *C. albicans* de CVVR, *C. albicans* de ASS, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae* do banco de leveduras do Laboratório de Micologia Médica - Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e controle de qualidade da própolis

A amostra de própolis foi coletada em colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., de apiário localizado na cidade de Cianorte, na região noroeste do Paraná. Esta foi

submetida à refrigeração por 24 h. Após esse tempo, foi triturada em liquidificador industrial, acondicionada em saco plástico e armazenada em freezer. Sob temperatura de -18 °C.

4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada por método gravimétrico, utilizando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Amostras de aproximadamente 3 g da própolis triturada foram exatamente pesadas, em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas a temperatura de 110 °C, até peso constante (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). O resultado foi calculado em relação a 100 g de droga e representa a média de seis determinações.

4.2.1.2 Determinação do teor de cinzas

O cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 minutos, após foi resfriado em dessecador e seu peso (tara) foi determinado em balança analítica. Neste foram adicionados cerca de 3,0 g da própolis triturada, pesados em balança analítica, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Foi colocado em dessecador para arrefecimento e pesagem posterior. Repetiu-se a técnica até peso constante (FARMACOPÉIA, 2010). O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinzas na droga (% p/p) e representa a média de seis determinações.

4.2.1.3 Determinação do teor de ceras

Para determinação do teor de ceras, aproximadamente 1 g de própolis triturada, pesada em balança analítica, foi colocado em frasco de vidro, acrescido de 10 mL de éter de petróleo e submetido à agitação. Em seguida o frasco com o material foi submetido a aquecimento até ebulição do éter de petróleo por 5 minutos. Foram acrescentados mais 10 mL de éter de petróleo e submeteu-se a aquecimento (ebulição) por mais 5 minutos. Em seguida, o processo foi repetido uma terceira vez. A fração etérea foi desprezada e a amostra de própolis remanescente foi seca, sendo posteriormente submetida à nova pesagem após arrefecimento da temperatura (BRUSCHI, 2006). O resultado foi expresso em porcentagem (% p/p) e representa a média de seis determinações.

4.2.1.4 Determinação do teor de extrativos em água

Cerca de 1,0 g da própolis triturada foi pesada em balança analítica e submetida à decocção com 100,0 g de água, durante 10 minutos. Após o resfriamento o volume foi completado a 100,0 mL. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro, desprezando-se os primeiros 20 mL. Do restante do filtrado, pesaram-se exatamente 20 g, em pesa-filtro tarado, e evaporado até secura em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (DEUTSCHES, 1994; BRUSCHI, 2006). O resultado obtido foi expresso em massa percentual segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m} \quad (1)$$

Onde: TE = teor de extrativos (% p/p), g = massa de resíduo seco (g), FD = fator de diluição (5), m = massa da amostra (g).

O resultado representa a média de seis determinações.

4.2.1.5 Determinação do teor de extrativos em etanol 96 °GL

Foram pesados cerca 20 g de extrato etanólico de própolis 1% (p/p), em pesa-filtro previamente tarado, preparado sob refluxo. A amostra foi evaporada até secura em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (BRUSCHI, 2006). O resultado obtido foi expresso em massa percentual segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{g.100}{M} \quad (2)$$

Onde: TE = teor de extrativos (% p/p), g = massa de resíduo seco (g), M = massa da amostra (g).

O resultado representa a média de seis determinações.

4.2.1.6 Determinação do teor de flavonóides totais da droga

Cerca de 400 mg da amostra de própolis triturada, exatamente pesadas em balança analítica, foram colocadas em balão de fundo redondo de 100 mL e acrescidos de 1,0 mL de uma solução de hexametilenotetramina a 0,5% (p/p), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico 6% (V/V). Foram aquecidos sob refluxo por trinta minutos. A mistura foi filtrada para balão volumétrico de 100,0 mL através de chumaço de algodão. O resíduo da própolis e o algodão foram lavados com duas porções de 20 mL de acetona, aquecendo-se à fervura, sob refluxo por 10 minutos em cada lavagem. Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se nova filtração, através de algodão, para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. Exatamente 10,0 mL da fração acetônica foram transferidos para funil de separação, tratados com 20 mL de água e, em seguida, extraídos com 15 mL de acetato de etila, repetindo-se a operação por três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas em funil de separação e lavadas com duas porções de 50 mL de água. A seguir, a fração de acetato de etila foi filtrada para um balão volumétrico de 50,0 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro, tendo seu volume completado a seguir. Exatamente 10,0 mL foram colocados em balão volumétrico de 25,0 mL, adicionando-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) e completando-se com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V). Ao mesmo tempo, 10,0 mL de fração acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V), formando a solução de compensação. Após trinta minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425 \text{ nm}$) (DEUTSCHES, 1994; BRUSCHI, 2006). Os ensaios representam a média de seis determinações e o resultado de cada determinação foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$TF = \frac{A \cdot FD}{[\varepsilon \cdot m \cdot (1 - PD)]} \quad (3)$$

Onde: TF = teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de droga seca (% p/p), A = absorvância da solução teste, FD = fator de diluição (1250), ε = absortividade específica da quercetina (500), m = massa de própolis testada (g) e PD = perda por dessecação da própolis (valor absoluto).

4.2.2 Preparação e controle de qualidade do extrato de própolis

Foi preparado extrato contendo 30% (p/p) de própolis triturada em etanol 96 °GL. Pesou-se 300,0 g de própolis os quais foram completados para 1000,0 g com álcool, no copo do turbo extrator, permanecendo em repouso durante 24 h. Após, o peso foi completado com álcool e o material foi submetido a turbo extração durante 15 minutos, com dois intervalos de repouso de 5 minutos. O extrato foi submetido à refrigeração (8 °C) por 1 h sendo, em seguida, filtrado sob vácuo e acondicionado em frasco de vidro âmbar com batoque interno de vedação e tampa rosca (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006).

4.2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 2010).

4.2.2.2 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato foi determinada utilizando-se picnômetro calibrado a 20 °C, em ambiente com temperatura controlada (20 °C). Em balança analítica, o picnômetro foi previamente tarado e foram determinados os pesos do picnômetro contendo água e contendo extrato. A densidade foi calculada pelo quociente relativo à massa do extrato e a massa de água, após subtração da massa do picnômetro (FARMACOPÉIA, 2010). Foram realizadas três leituras.

4.2.2.3 Determinação do resíduo seco

Uma amostra de cerca de 10 g da solução extrativa foi exatamente pesada e evaporada em banho-maria, sob agitação ocasional. Após a secura, o material foi colocado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). O resultado obtido para o resíduo seco (RS) foi expresso em relação a 100,0 g de extrato e representa a média de três determinações.

4.2.2.4. Determinação do teor alcoólico

Uma alíquota de 25,0 mL da solução extrativa foi colocada em balão de fundo redondo, acrescida de 100,0 mL de água purificada e submetida à destilação simples. Aproximadamente 90 mL de destilado foram recolhidos em balão

volumétrico de 100,0 mL e resfriados à temperatura ambiente. O volume foi completado com água purificada. A densidade do destilado foi determinada por areômetro e o teor de etanol, expresso em porcentagem (V/V) foi calculado (BRUSCHI, 2006; FARMACOPÉIA, 2010). Foram realizadas três determinações.

4.2.2.5 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do extrato de própolis

4.2.2.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de própolis

O teste de susceptibilidade ao extrato de própolis foi realizado por meio do ensaio de microdiluição em caldo, segundo adaptação do documento M27 - A3 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI; 2008), no Laboratório de Micologia Médica - LEPAC da Universidade Estadual de Maringá – PR. As leveduras (estocadas a -20°C) foram reativadas em caldo SDB (*Saboraud dextrose broth*) a 37°C/24h e cultivadas em SDA (*Saboraud dextrose Agar*) a 37°C/24h. O preparo do inóculo foi feito pela suspensão das espécies em SSE (solução salina estéril – 0,85% p/V), ajustando a concentração a ser testada no espectrofotômetro em 1,0 a 5,0 x 10⁶ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). A partir dessa suspensão, foram realizadas novas diluições: 1:50 em salina estéril e, na sequência, 1:20 em meio de cultura, obtendo assim o inóculo final desejado de 1 a 5 x 10³ UFC/mL (CLSI, 2008).

O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute - Gibco*) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (Sigma, Chemical Co, USA) pH 7,0, suplementado com 2% de glicose como proposto pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility* (EUCAST) (CLSI; 2008). As suspensões foram testadas com EPRP em microplacas plásticas esterilizadas, contendo 96 poços organizados em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze poços numerados de 1 a 12 (Figura 5), incubadas a 35°C/48 h. Cada linha (A-H) correspondeu a uma espécie fúngica. Inicialmente foram adicionados 100 µL do meio RPMI nos poços de 2 a 11, de cada linha. Após foi adicionado 200 µL do meio RPMI no poço 12 de cada linha, esse foi o controle negativo (CN). Em seguida foram adicionados 100 µL do EPRP no poço 1 e 2. A partir do 2º poço, foi feita uma diluição seriada, transferindo-se 100 µL do homogeneizado para o seguinte poço, na coluna 10, foram desprezados os 100 µL, não passando, portanto para o poço 11, o controle positivo (CP). Por fim foram adicionados 100 µL do inóculo em cada linha correspondente, indo do poço 1 ao 11.

Além dos controles positivo e negativo, também foi realizado um teste de cada levedura com etanol, na mesma diluição e condição que foi utilizado como líquido extrator no preparo do extrato. Como controle da técnica foi utilizado a cepa de referência *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e os isolados clínicos de *C. albicans* de CVV, CVVR e ASS, e os isolados de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Sacharomyces cerevisiae*.

Figura 5 – Esquema de microplaca de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

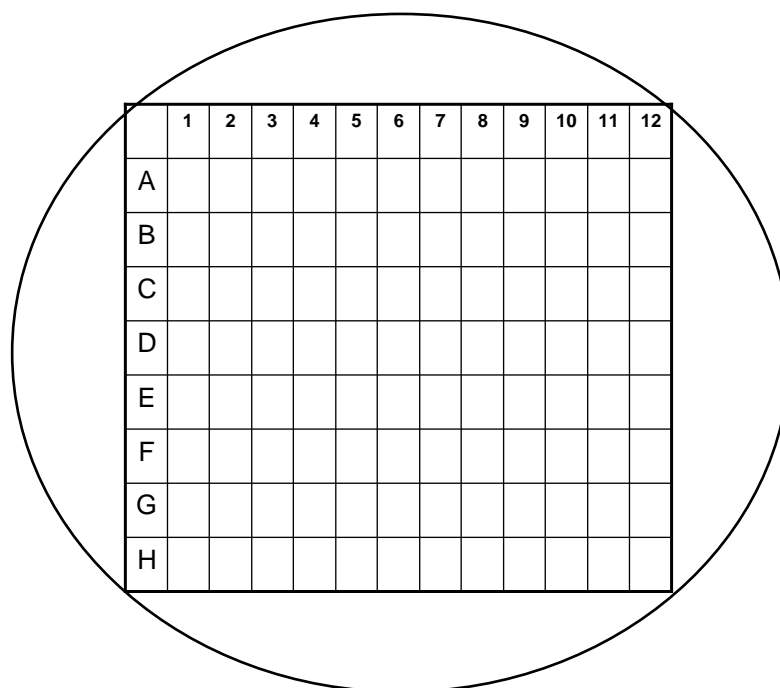
A leitura foi realizada após 48h em equipamento leitor de microplacas, observando o crescimento nas diferentes concentrações, onde o controle positivo (CP) deve apresentar 100% de crescimento e o controle negativo (CN) nenhum. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento de cada levedura, tendo como referência o seu respectivo controle positivo.

4.2.2.5.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato de própolis

A CFM do EPRP foi determinada frente à *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e aos isolados clínicos de *C. albicans* de CVV, CVVR e ASS, assim como, isolados de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Sacharomyces cerevisiae*. O teste para determinação da CFM foi realizado em placas de Petri plásticas esterilizadas com meio de cultura SDA suplementado com cloranfenicol, a qual está organizada em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze quadrados numerados de 1 a 12, seguindo o esquema da Figura 6. Para o teste, foram feitos pontos com agulha

estéril de cada concentração do teste da CIM e transferido para o respectivo local na placa com meio SDA. Em seguida as placas foram incubadas à 35 °C sem agitação por 24 a 48 h com monitoramento diário. A CFM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de impedir o crescimento de cada levedura.

Figura 6 - Esquema da placa para determinação do CFM do extrato de própolis.



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

4.2.2.6 Validação de métodos espectrofotométricos para análise de extrato de própolis

4.2.2.6.1 Validação do método de análise para quantificação de flavonóides totais

A linearidade do método foi determinada por meio da obtenção da curva de análise da crisina (padrão grau analítico). Preparou-se uma solução mãe (SM) em metanol na concentração de 0,40 mg/mL. Em seguida, foram obtidas as diluições (0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,08 mg/mL) em metanol. Retirou-se uma alíquota de 2,0 mL de cada diluição, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) e completou -se o volume em 10,0 mL em balão volumétrico com solução

metanólica de ácido acético a 5% (V/V). Ao mesmo tempo, outros 2,0 mL de cada diluição foram diluídos em balão volumétrico de 10,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V), formando a solução de compensação. Após 30 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425 \text{ nm}$) (BRUSCHI, 2006). Para cada concentração foram realizadas seis determinações. Os resultados foram utilizados para o cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta, coeficiente de correlação, inclinação da reta, intercepto do eixo y, análise de resíduos e análise da falta de ajuste (ICH, 2005; BRASIL, 2003). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de software Statistica 8.0[®].

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação (S) da curva de análise, de acordo com as seguintes fórmulas (ICH, 2005; BRASIL, 2003):

$$\text{LD} = \frac{3,3 \cdot s}{S} \quad (4)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \cdot s}{S} \quad (5)$$

A precisão do método foi determinada de acordo com as normas descritas pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e a resolução brasileira, RE N^o 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, o desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de seis determinações foram considerados. A seletividade do método foi avaliada pela análise do espectro de varredura para o extrato de própolis a 30% (p/p). A exatidão foi determinada pela recuperação, adicionando quantidades pré-determinadas do padrão crista à amostra. O experimento de recuperação foi realizado em triplicata. O resultado foi determinado pela razão do valor encontrado na análise da amostra simulada pela quantidade real adicionada do padrão, multiplicado por 100 (ICH, 2005). A robustez do método foi determinada por meio da variação do comprimento de onda de 415 e 435 nm para leitura.

4.2.2.6.2 Validação do método de análise para quantificação de polifenóis totais

A linearidade do método foi determinada por meio da obtenção da curva de análise de ácido gálico monohidratado (padrão grau analítico). Preparou-se uma solução-mãe (SM) em metanol na concentração de 100 µg /mL. Em seguida, foram obtidas as diluições (0,0125; 0,0250; 0,0375; 0,0875; 0,1000 e 0,1125 µg/ mL) em metanol. Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionado alíquotas de SM de forma seriada. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) em cada um dos balões volumétricos da série e, posteriormente, o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Como solução compensatória foi utilizada água purificada. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760$ nm). Os ensaios representam a média de cinco determinações e foram utilizados para o cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta (curva de análise), coeficiente de correlação, inclinação da reta, intercepto do eixo y, análise de resíduos e análise da falta de ajuste (ICH, 2005; BRASIL, 2003). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de software Statistica 8.0[®].

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação (S) da curva de análise, de acordo com as fórmulas (4) e (5), respectivamente (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

A precisão do método foi determinada de acordo com as normas descritas pela ICH (2005) e a resolução brasileira, RE Nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, o desvio padrão(s) e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de seis determinações foram considerados. A seletividade do método foi avaliada pela análise do espectro de varredura para o extrato de própolis a 30% (p/p). A exatidão foi determinada pela recuperação, adicionando quantidades pré-determinadas do padrão ácido gálico à amostra. O experimento de recuperação foi realizado em triplicata. O resultado foi determinado pela razão do valor encontrado na análise da amostra simulada pela quantidade real adicionada do padrão, multiplicado por 100 (ICH, 2005). A robustez do método foi determinada por meio da variação do comprimento de onda de 750 e 770 nm para leitura.

4.2.2.7 Análise dos extratos de própolis por espectrofotometria

O extrato etanólico preparado com a própolis (EPRP) foi analisado por espectrofotometria utilizando-se os métodos de quantificação de flavonóides totais e polifenóis totais, previamente validados.

4.2.2.7.1 Análise do extrato de própolis pelo método de quantificação de flavonóides totais

Em funil de separação, foram adicionados 1,0 mL de extrato, 1,0 mL de água e 1,0 mL de acetona. Esta mistura foi extraída três vezes com 5,0 mL de acetato de etila. As fases foram reunidas e lavadas, em funil de separação, com duas porções de 15,0 mL de água. A seguir, a fração em acetato de etila foi filtrada para um balão volumétrico de 25,0 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro e completou-se o volume (SA). Retirou-se uma alíquota de 2,0 mL da SA, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/V) e completou-se o volume em 10,0 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V). Ao mesmo tempo, outros 2,0 mL de fração acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 10,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V), formando a solução de compensação. Após 30 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425 \text{ nm}$) (BRUSCHI, 2006). Os ensaios representam a média de seis determinações e o resultado de cada determinação foi calculado utilizando-se a curva de análise obtida anteriormente.

4.2.2.7.2 Análise do extrato de própolis pelo método de quantificação do teor polifenóis totais

Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionado 2,0 μL de extrato. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) e o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Como solução compensatória foi utilizada água purificada. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760 \text{ nm}$) (FARMACOPÉIA, 2010). Os ensaios representam a média de seis determinações e o resultado de cada determinação foi calculado utilizando-se a curva de análise obtida anteriormente.

4.2.3 Desenvolvimento e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo termossensível

Foram preparadas formulações poliméricas binárias contendo 15 e 20% (p/p) de P407 com 0,10; 0,15; 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, por meio de uma adaptação do 'método a frio' descrito por Schmolka (1972). Primeiramente, o C934P foi incorporado paulatinamente em água purificada, sob agitação mecânica constante até a hidratação e dispersão completa do polímero. Incorporou-se o P407 no gel de C934P, deixando a preparação em repouso na geladeira até a hidratação e dispersão completa deste outro polímero. Após 12 horas, a preparação foi submetida à agitação mecânica lenta por 10 minutos, para a completa homogeneização do gel. O pH de cada formulação foi ajustado para 7,0 com trietanolamina. Após o preparo, todas as formulações foram centrifugadas (3000 rpm), para a remoção de bolhas de ar, e armazenadas em geladeira por no mínimo 24 horas antes das análises (BRUSCHI, 2006).

4.2.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH do sistema mucoadesivo termossensível (SMTS) foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 2010).

4.2.3.2 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa dos SMTS foi determinada por meio de picnômetro como descrito no item 4.2.2.2.

4.2.3.3 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação

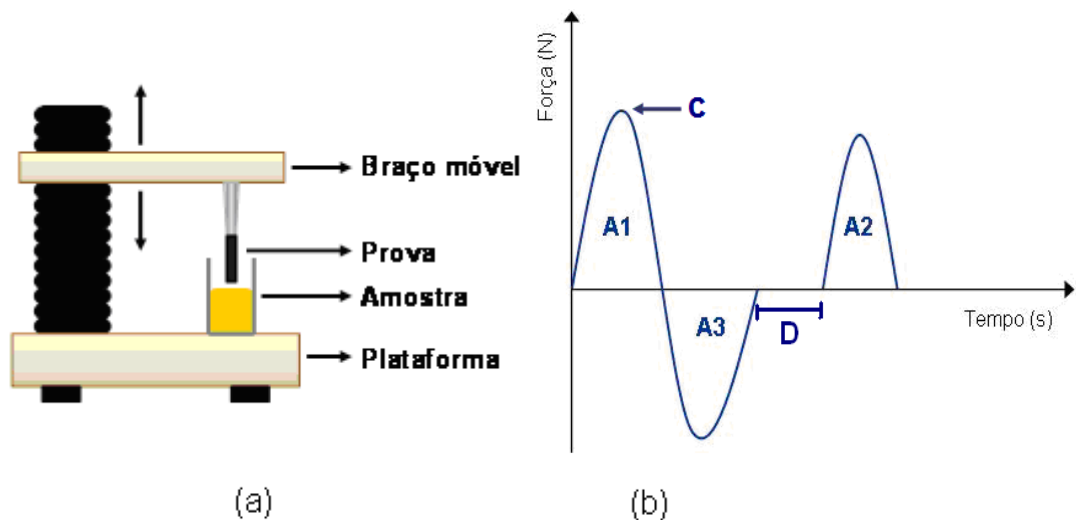
Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensível foram submetidos à avaliação preliminar da temperatura de gelificação ($T_{\text{sol/gel}}$) de acordo com Choi et al. (1999). Um béquer graduado de 20 mL, contendo uma barra magnética e 10,0 g de preparação líquida sob baixa temperatura, foi colocado em uma placa termostatizada. Um termômetro foi imerso na preparação a qual foi aquecida continuamente e com agitação constante. Quando a barra magnética parou de movimentar-se devido à gelificação, a temperatura foi determinada como $T_{\text{sol/gel}}$. O aquecimento máximo foi de 55 °C. Foram realizadas três determinações para cada preparação.

4.2.3.4 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (APT) das formulações poliméricas binárias foi realizada utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®), conforme Figura 7, no modo de análise de textura como descrito por Bruschi (2006).

Uma quantidade de 16 g de formulação foi colocada em frascos de vidro com tampa de pressão, evitando a introdução de bolhas de ar. No modo APT, uma prova analítica de policarbonato (10 mm de diâmetro) foi comprimida duas vezes no interior da amostra, com velocidade de 2 mm/s, profundidade de 15 mm e tempo de 15 s entre o final da primeira e o início da segunda compressão. A análise foi realizada em, no mínimo, cinco replicatas e nas temperaturas de 25 °C e 37 °C. A partir do gráfico resultante da força versus distância e força versus tempo (Figura 7), a dureza (força necessária para atingir uma dada deformação), a compressibilidade (trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da prova), a adesividade (o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da prova), a elasticidade (capacidade de distender e retornar ao seu tamanho e forma inicial) e a coesividade (força das ligações internas que constituem o corpo do material) foram calculados (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007).

Figura 7 - Analisador de textura TA-XTplus (a) e curva típica de análise do perfil de textura (APT): (C) dureza, (A1) compressibilidade, (A3) adesividade, (A2/A1) coesividade e (D) elasticidade (b).

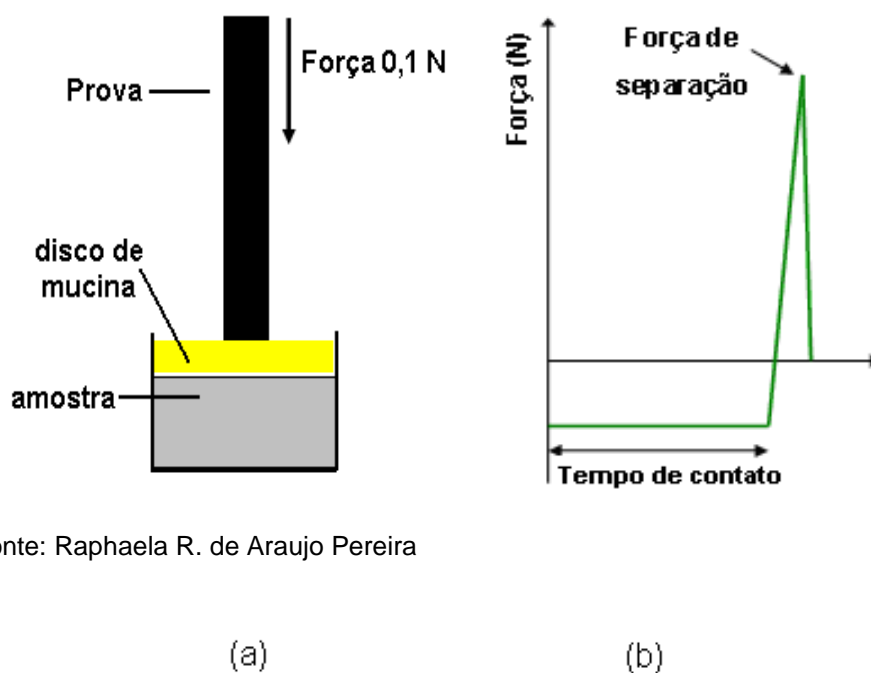


Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

4.2.3.5 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias foi avaliada *in vitro* por meio da medida da força necessária para remover a formulação a partir de um disco de mucina, utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®) no modo de tensão (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007), como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema do teste *in vitro* de mucoadesão (a) e gráfico típico do tempo *versus* força necessária para a remoção do disco de mucina a partir da formulação (b).



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

Inicialmente, o disco de mucina foi preparado pela compressão de mucina crua (400 mg), utilizando um anel de compressão com um diâmetro de 14 mm e força de compressão de 10 toneladas, aplicada por 30 s. O disco foi fixado horizontalmente na extremidade inferior da prova de APT. Antes do teste, o disco de mucina foi hidratado pela submersão em uma solução aquosa de mucina 5% (p/p) por um tempo de 30 s. O excesso de líquido na superfície do disco foi removido através de um papel absorvente macio. Na temperatura de 37 °C, uma amostra da formulação, previamente acondicionada em frasco de vidro cilíndrico e raso, foi colocada sobre a prova analítica, a qual foi então abaixada até que o disco de

mucina entrasse em contato com a superfície da amostra. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,1 N foi aplicada por um tempo definido (30 s) para assegurar o contato íntimo entre a amostra e o disco de mucina. A prova foi então levantada com uma velocidade constante de 1,0 mm/s e a força necessária para remover o disco de mucina da superfície da formulação foi determinada como o valor resultante da curva força pelo tempo. Para todas as formulações, as medidas foram realizadas, no mínimo em cinco replicatas.

4.2.3.6 Análise reológica de cisalhamento contínuo

Os reogramas de fluxo dos sistemas foram obtidos utilizando um reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado MARS II (Haake®), no modo de fluxo, nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e 37 °C, com geometria cone-placa paralelas de 60 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. As curvas ascendente e descendente de fluxo foram obtidas com um gradiente de cisalhamento partindo de 0 s⁻¹ até 5000 s⁻¹. O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 s, mantido no limite superior por 10 s e, então, diminuído durante um período de 150 s. A seleção de faixa de cisalhamento foi determinada de acordo com a consistência de cada formulação (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009). As curvas ascendentes descendentes foram analisadas utilizando a equação de Oswald de Waele (Lei da potência – *Power Law*) (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009):

$$\sigma = k\dot{\gamma}^n \quad (6)$$

Onde: σ = tensão de cisalhamento, k = índice de consistência, $\dot{\gamma}$ = gradiente de cisalhamento, n = índice de fluxo.

4.2.3.7 Análise reológica oscilatória

A análise oscilatória dos sistemas foi realizada nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e 37 °C utilizando um reômetro MARS II (Haake®), no modo oscilatório, com geometria cone-placa paralelas com 60 mm de diâmetro, separadas por uma

distância fixa de 0,052 mm. Para cada amostra, a Região Viscoelástica Linear (RVL) foi investigada pelo aumento da tensão oscilatória (*torque sweep*) a uma frequência fixa. A RVL foi identificada como a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo de estocagem, ou elástico (G') permaneceu constante. Uma deformação dentro da RVL foi selecionada para subseqüentes análises de varredura de frequência. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009). Cinco replicatas, no mínimo, foram analisadas para cada amostra num intervalo de frequência de 0,1 a 10,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa ($\tan \delta$) foram então determinados utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®). Experimentalmente, o primeiro ponto de coleta de dado gerado pelo reômetro a 0,1 Hz está sujeito a artefatos do instrumento e, assim, foi tratado com cautela.

4.2.3.8 Determinação da temperatura de gelificação

A temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) das formulações poliméricas binárias foi determinada utilizando um reômetro de tensão e gradiente controlados MARS II (Haake®), no modo oscilatório com rampa de temperatura, com geometria cone-placa paralelas com 60 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009). Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. Após a determinação da RVL de cada formulação nas temperaturas de 5 °C e 60 °C, a análise de varredura da temperatura foi conduzida da temperatura de 5 °C a 60 °C, com incrementos de temperatura de 10 °C/min, seguindo a aplicação de uma tensão constante e frequência de 1,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa ($\tan \delta$) foram então determinados utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®). As análises foram realizadas com, no mínimo, três replicatas para cada formulação. A $T_{\text{sol/gel}}$ foi definida como o ponto onde o módulo elástico foi

a metade do caminho entre os valores para o estado solução e para o estado gel e foi calculado para as formulações que tiveram aumento significativo da viscosidade dinâmica com o aumento da temperatura (gelificação) (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009).

4.2.3.9 Análise estatística

Os efeitos da concentração polimérica, assim como da temperatura nas propriedades mecânicas de textura foram estatisticamente avaliados por meio de utilizando Análise de Variância (ANOVA) de duas vias. Similarmente, os efeitos da concentração polimérica e da temperatura no índice de consistência, no índice de fluxo, nas propriedades viscoelásticas (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) em cinco frequências representativas (0,60; 2,55; 5,04; 7,53; 10,0 Hz) foram estatisticamente comparados utilizando ANOVA de duas vias. Além disso, os efeitos da concentração de cada componente polimérico na força requerida para superar a ligação adesiva formulação-mucina foram estatisticamente avaliados por meio de ANOVA de uma via. Em todos os casos de ANOVA, comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Teste t para dados emparelhados foi utilizados para determinar se a viscosidade dinâmica das formulações foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura (gelificação). Em todos os casos, um nível de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009) e foi utilizado o programa Statistica 8.0[®].

4.2.4 Preparação e caracterização do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis

Foram preparadas formulações poliméricas binárias contendo 15% ou 20% (p/p) de P407 com 0,15 ou 0,25% (p/p) de C934P, pela adaptação do 'método a frio' (SCHMOLKA, 1972), como descrito anteriormente. Após o repouso em geladeira, por no mínimo, 24 horas, incorporou-se aos géis, por gotejamento, exatamente 4% (p/p) de EPRP sob agitação magnética por 30 min na temperatura de 20 °C (BRUSCHI et al., 2003; 2007), de acordo com a Tabela 1. Após completa homogeneização, as preparações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e hermeticamente fechadas.

Tabela 1 - Composição dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Concentração (% p/p)		
	Poloxamer 407	Carbopol 934P [®]	Extrato de própolis
SMTS-1	15	0,25	4,0
SMTS-2	20	0,15	4,0

4.2.4.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas de extrato de própolis em cada sistema SMTS foi realizada por microscopia óptica com a captação de imagens, utilizando-se microscópio óptico Kozo Optics[®]. Uma amostra foi colocada sobre a lâmina de vidro e as imagens foram capturadas.

4.2.4.2 Análise granulométrica

A determinação da distribuição de tamanho das micropartículas em cada sistema mucoadesivo termossensível foi realizada por captação de imagens, por meio de microscópio óptico Kozo Optics[®], utilizando o programa Image Pro Plus[®] para quantificação. As formulações foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e, para cada campo analisado, foi realizada a distribuição de tamanho das micropartículas, utilizando como parâmetro para medição o diâmetro segundo Feret (BRUSCHI., 2006). Foram medidas cerca de 2400 partículas, e a distribuição de tamanho das mesmas foi determinada.

4.2.4.3 Determinação do pH

A determinação do pH dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 2010).

4.2.4.4 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada através de picnômetro como descrito no item 4.2.2.2.

4.2.4.5 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação

A avaliação preliminar da temperatura de gelificação dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada como descrito anteriormente no item 4.2.3.3.

4.2.4.6 Análise do perfil de textura

A análise APT dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada como descrito anteriormente no item 4.2.3.4.

4.2.4.7 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A avaliação *in vitro* da força mucoadesiva dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi realizada de acordo com o item 4.2.3.5.

4.2.4.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo

A reometria de cisalhamento contínuo dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada como descrito anteriormente no item 4.2.3.6.

4.2.4.9 Análise reológica oscilatória

A reometria oscilatória dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada como descrito anteriormente no item 4.2.3.7.

4.2.4.10 Determinação da temperatura de gelificação

A $T_{\text{sol/gel}}$ dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada como descrito anteriormente no item 4.2.3.9.

4.2.4.11 Determinação do teor de própolis

O teor de própolis dos sistemas SMTS foi determinado pelo método espectrofotométrico por quantificação do teor de polifenóis totais, como descrito no item 4.2.2.7.2.

Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionados 500 µL de amostra. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) e o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Como solução compensatória foi utilizada SMTS sem EPRP. As soluções foram deixadas em

repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760 \text{ nm}$). Os ensaios representam a média de seis determinações e o resultado foi calculado utilizando-se a curva de análise obtida anteriormente.

4.2.3.12 Análise estatística

Os efeitos da concentração polimérica, da presença de micropartículas de própolis e da temperatura no índice de consistência, no índice de fluxo, nas propriedades viscoelásticas (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) em cinco frequências representativas (0,60; 2,55; 5,04; 7,53; 10,0 Hz) foram estatisticamente comparados utilizando ANOVA de três vias. Similarmente, os efeitos das concentrações dos polímeros, da presença de micropartículas de própolis e da temperatura nas propriedades mecânicas de textura foram estatisticamente avaliados por meio de ANOVA de três vias. Além disso, os efeitos das concentrações de P407 e C934P, assim como da presença de micropartículas de própolis, na força requerida para superar a ligação adesiva formulação-mucina foram estatisticamente avaliados por meio de ANOVA de duas vias. Em todos os casos de ANOVA, comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Teste t para dados emparelhados foi utilizado para determinar se a viscosidade dinâmica das formulações foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura (gelificação). Em todos os casos, um nível de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007) e foi utilizado o programa Statistica 8.0[®].

4.2.4.13 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de própolis a partir das preparações

O perfil de liberação de própolis foi determinado em um aparelho de liberação composto por células de difusão de Franz modificadas. O aparelho consistiu de uma célula de vidro, de formato circular, para estudo de semissólidos, com capacidade para um volume total de 50,0 mL e com controle de temperatura, por meio de banho termostático.

Utilizou-se um volume de 50,0 mL de água purificada como meio de dissolução para garantir uma condição *sink* (BRUSCHI et al., 2004; BRUSCHI, 2006), e temperatura de $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação constante com auxílio de barra

magnética, utilizando-se membrana de acetato de celulose como suporte, no intuito de mimetizar a mucosa vaginal. O tempo de ensaio foi de 24 h, com tempos de amostragem (1,0 mL) em 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 360 min, 480 min, 960 min e 1440 min, sem reposição de volume.

As condições descritas acima foram utilizadas tanto para o estudo preliminar com o extrato de própolis, utilizando-se 2,0 mL de uma dispersão aquosa do mesmo 4% (V/V), quanto para o estudo do perfil de liberação da própolis a partir dos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2.

Todos os ensaios foram realizados com seis repetições e a própolis liberada da formulação, em cada intervalo de tempo foi quantificada em relação ao teor de polifenóis totais. Em balões volumétricos de 25 mL, foram acrescentados 10 mL de água purificada e adicionado 1,0 mL da amostra coletada. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico R (*Folin-Ciocalteu*) e o volume foi completado com solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% (p/V). Como solução compensatória foi utilizada água purificada. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz, após 15 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 760 \text{ nm}$). O resultado de cada determinação foi calculado utilizando-se a equação da curva analítica obtida anteriormente.

Os resultados foram avaliados em termos do teor absoluto e acumulado de polifenóis totais liberados em cada intervalo de tempo, considerando o teor real de extrato de própolis presente na formulação.

Para investigar o mecanismo de liberação de própolis a partir dos sistemas, os dados obtidos foram analisados por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983), utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados (regressão linear) como descrito abaixo:

$$\frac{Mt}{M^\infty} = k \cdot t^n \quad (8)$$

$$\log \frac{Mt}{M^\infty} = \log k + n \log t \quad (9)$$

Onde: M_t/M_ϕ é a fração de fármaco liberado, t é o tempo de liberação, k é a constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação e n é o expoente o qual pode indicar o mecanismo de liberação do fármaco (JONES et al., 2000; BRUSCHI, 2006).

Os efeitos da diferença de concentração P407/C934P no tempo requerido para a liberação de percentagens definidas da massa original de própolis (10, 30 e 50%) a partir dos sistemas SMTS foram avaliados estatisticamente usando ANOVA de uma via. Por fim, foi realizada uma comparação dos tempos requeridos para liberar 10, 30 e 50% do teor original de própolis em cada sistema utilizando o teste t para dados não emparelhados. Nos dois casos, comparações post hoc das médias dos grupos individuais foram realizados utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Em todos os casos, um nível de significância de $p < 0,05$ foi aceito (BRUSCHI, 2006) e foi utilizado o programa Statistica 8.0[®].

4.2.4.14 Avaliação da atividade antifúngica

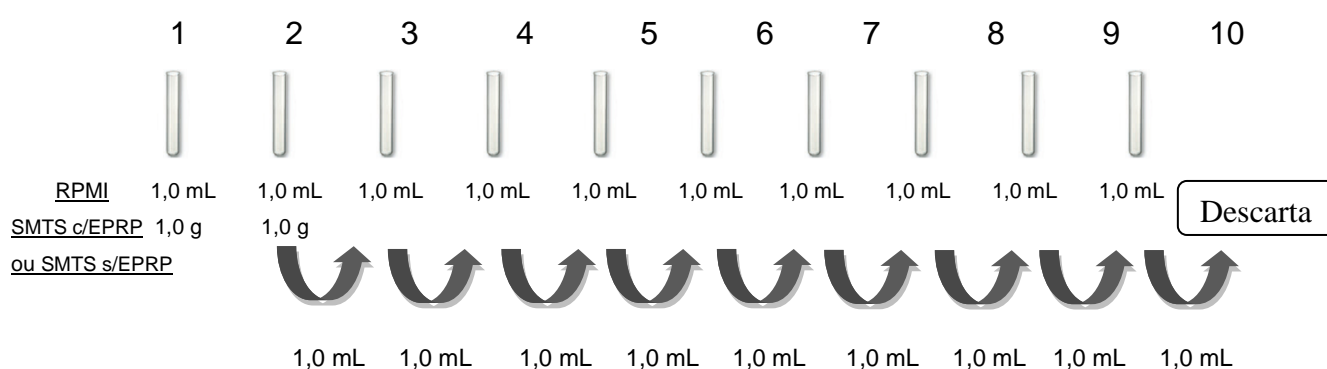
4.2.4.14.1 Determinação da CIM dos sistemas contendo própolis

A CIM dos SMTS contendo micropartículas de própolis foi determinada frente à cepas de referência de *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e aos isolados clínicos, *C. albicans* de CVV, CVVR e ASS, assim como, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*, pelo método de macrodiluição em caldo segundo adaptação do documento M27-A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (RODRIGUEZ-TUDELA, 2008), no Laboratório de Micologia Médica - LEPAC da Universidade Estadual de Maringá - PR.

O preparo do inóculo foi feito através da suspensão das espécies em SSE, ajustando a concentração a ser testada na câmara de Neubauer de $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). A partir dessa suspensão, foram realizadas novas diluições: 1:100 em salina estéril e, na sequência, 1:20 em meio de cultura, obtendo assim o inóculo final desejado de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008). Para os testes com SMTS contendo micropartículas de própolis foi necessária a realização de uma etapa de diluição dos sistemas, na qual se obteve as diluições para o teste em si. Foi realizada também a etapa de diluição para os sistemas SMTS sem micropartículas de própolis nas mesmas diluições e condições dos sistemas SMTS contendo micropartículas de própolis. Na etapa de diluição

foram utilizados 10 tubos de vidro com tampa de rosca enumerados para cada sistema a ser testado. Foram pipetados alíquotas de 1,0 mL de meio RPMI em todos os tubos (1 a 10). Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de formulação no 1° e no 2° tubo. A partir do 2° tubo, foi feita a diluição seriada, transferindo-se 1,0 mL de cada tubo para o seu tubo posterior, até chegar ao décimo tubo, conforme a Figura 9.

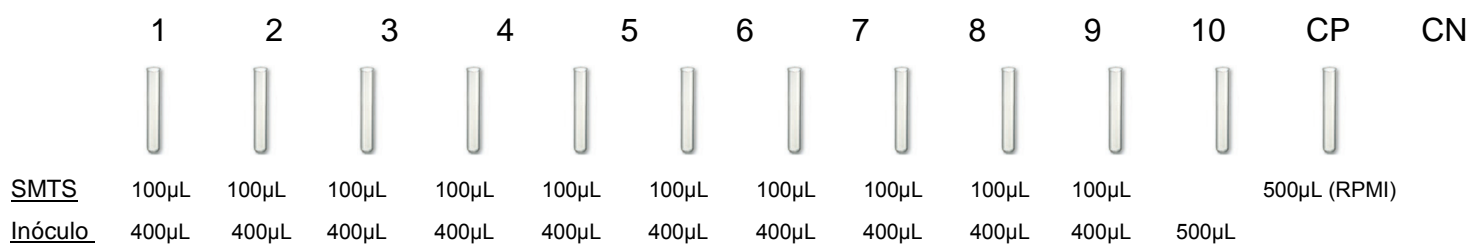
Figura 9 - Esquema da etapa de diluição dos sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS)



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

Após a realização da etapa de diluição dos sistemas iniciou-se o teste para determinação da CIM. Para cada inóculo testado, utilizou-se 10 tubos de vidro com tampa de rosca enumerados de 1 a 10 para as formulações, 1 tubo para controle positivo e 1 tubo para controle negativo, totalizando 12 tubos. Foram pipetadas alíquotas de 100 µL de cada concentração da etapa de diluição e transferidas para os respectivos tubos com tampas de roscas enumerados. Em seguida, foram pipetados 400 µL da suspensão do inóculo do primeiro ao décimo tubo, conforme a Figura 10.

Figura 10 - Esquema do teste para determinação do CIM para os sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS) com micropartículas de própolis



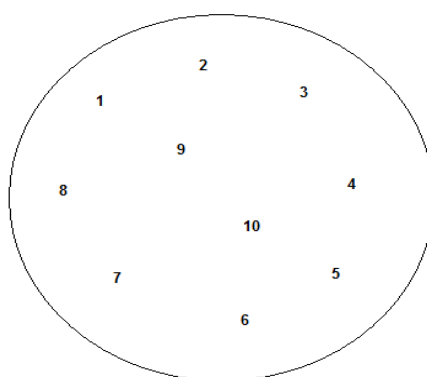
Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

Os tubos foram levemente agitados para homogeneizar todo o volume. Em seguida, foram colocados em estufa a 35 °C (“Shaker” – 70 a 80 RPM) por 48 h com monitoramento diário. Após 48 h, verificou-se o crescimento por meio da turvação do meio. A CIM foi considerada a menor concentração de SMTS com micropartículas de EPRP capaz de inibir o crescimento de cada levedura, tendo como referência o seu respectivo controle positivo.

4.2.4.14.2 Determinação da CFM dos sistemas contendo própolis

A CFM dos SMTS contendo micropartículas de EPRP foi determinada frente à *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 2001, e dos isolados clínicos de *C. albicans* de CVV, CVVR e ASS, assim como, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*, pelo método de macrodiluição em caldo segundo adaptação do documento M23-A7 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI; 2008), no Laboratório de Micologia Médica - LEPAC da Universidade Estadual de Maringá – PR. O teste para determinação da CFM foi realizado em placas de Petri plásticas esterilizadas com meio de cultura SDA suplementado com cloranfenicol. Para averiguar a atividade fungicida, foi semeado 20µL de cada concentração do teste da CIM e transferidas para as placas de petri conforme esquema apresentado na Figura 11. Em seguida as placas foram incubadas à 35 °C sem agitação por 24 a 48 h com monitoramento diário. A CFM foi considerada a menor concentração de SMTS com micropartículas de EPRP capaz de impedir o crescimento de cada levedura.

Figura 11 - Esquema da placa de SDA para determinação do CFM do SMTS com micropartículas de própolis.



Fonte: Raphaela R. de Araujo Pereira

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade da própolis

A própolis vem sendo usada desde tempos remotos por suas propriedades farmacêuticas (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998). Estas atividades tem sido responsáveis pela proliferação de preparações com própolis produzidas tanto pela indústria farmacêutica quanto pela alimentícia (BURDOCK, 1998; SFORCIN et al., 2007; MIGUEL et al., 2010). Sua composição química é variável, possuindo grande dependência da flora existente ao redor do apiário, a qual varia de uma localidade para outra (BRUSCHI et al., 2003; POPOVA et al., 2004). Além disso, outros fatores contribuem para essa variabilidade como a época e forma de coleta, situação e manejo das colmeias, linhagem das abelhas, densidade populacional das colmeias e localização do apiário, estando todos estes fatores intimamente relacionados com a qualidade da própolis (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; BRUSCHI, 2006).

A amostra de própolis obtida apresentou odor aromático e sabor picante, com aspecto de gomo-resina ligante e coloração amarelo-esverdeada. Essas características são marcantes nas própolis produzidas na região tropical do Brasil, como o norte e noroeste do estado do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (PAMPLONA, 1997; BRUSCHI, 2006).

A origem vegetal da própolis tem relação direta com a sua cor (KÖNIG, 1985). A própolis foi coletada numa região de vegetação variada, onde a principal fonte vegetal para as abelhas são pinheiros (*Pinus* sp. e *Araucaria heterophylla*) responsáveis pelo tom esverdeado, além de espécies do cerrado como o alecrim do campo ou vassourinha (*Bacharis dracunculifolia*). O aspecto mais amarelado em algumas amostras de própolis é explicado pela fonte vegetal particular da região e principalmente pela maior quantidade de ceras (FRANCO, 2001).

Na avaliação da droga foram utilizados métodos analíticos físico-químicos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. A determinação da perda por dessecação avalia o grau de umidade da droga analisada, embora seja conhecido que o aquecimento pode promover a liberação de substâncias voláteis presentes tanto nas plantas como também na própolis (BRUSCHI, 2006). Franco et al. (2000) observaram variações na perda por dessecação de amostras de própolis coletadas em diferentes estações do ano e locais da colmeia, sempre dentro de um limite

admitido de 15%. Além disso, amostras coletadas no inverno e das partes mais externas da colmeia apresentaram maior perda por dessecação (FRANCO, 2000; BRUSCHI, 2006). O valor encontrado (5,97%) indica que a amostra de própolis foi provavelmente coletada dos locais mais internos da colmeia (caixilho, por exemplo) e bem acondicionada.

Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas da amostra de própolis

Parâmetros	Média	s	CV%	n
Perda por dessecação (% p/p)	5,97	0,1506	2,52	6
Teor de cinzas totais (% p/p)	4,62	0,1922	4,31	6
Teor de ceras (% p/p)	24,79	0,5622	2,27	6
Teor de extrativo em água (% p/p)	56,54	0,9176	1,62	6
Teor de extrativos em etanol (% p/p)	64,20	1,0111	1,57	6
Teor de flavonóides totais (% p/p) em quercetina	1,86	0,0523	3,84	6

s = desvio padrão CV% = coeficiente de variação n = número de análises

O teor de cinzas totais evidencia o grau de substâncias residuais não voláteis presentes na amostra em análise. O valor de referência normalmente estabelecido para drogas sintéticas é de 1% e de até 3% para drogas de origem vegetal. Entretanto, esse valor não pode ser considerado para a própolis, pois esta contém um alto valor de gomo-resina, entre outros materiais, que podem elevar o valor de cinzas totais. Constituindo-se, portanto de um parâmetro muito importante para verificação de possíveis adulterações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BRUSCHI et al., 2002). O teor de cinzas totais obtido (4,62%) está de acordo com o perfil específico encontrado por Franco et al. (2000).

As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante períodos em que as resinas são escassas ou de difícil coleta e períodos onde a vedação da colmeia deve ser muito maior, como no inverno (BURDOCK, 1998; BRUSCHI et al., 2002). É necessário que a análise do teor de ceras da própolis seja feita para cada amostra

como controle de qualidade obrigatório, em função da possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas (BRUSCHI et al., 2002). A faixa normalmente encontrada para o teor de ceras é de 10 a 35% (BRUSCHI et al., 2002). Dessa forma, o resultado da determinação do teor de ceras na amostra analisada (Tabela 2) apresentou valor médio (24,79%) que justifica sua cor mais amarelada, encontrando-se dentro da faixa desejada, contribuindo para um bom teor de substâncias ativas.

A determinação do tamanho médio das partículas é um fator muito importante na obtenção de um extrato, pois a qualidade da extração está intimamente relacionada com as dimensões das partículas e, conseqüentemente, com a área de superfície de contato com o líquido extrator (BRUSCHI et al., 2002). As partículas da droga triturada apresentaram um tamanho médio de 0,4432 mm permitindo uma boa superfície de contato com o etanol, facilitando a extração.

Juntamente com a determinação do tamanho médio das partículas, a determinação da fração extraível, que permite visualizar a capacidade de um determinado líquido extrator em retirar substâncias presentes na droga, é um parâmetro importante na otimização do processo de extração. Devido à própolis ser um material resinoso com solubilidade limitada em água, a mesma é normalmente utilizada na forma de extrato etanólico. Portanto, a determinação do teor de extrativos foi realizada em água e em etanol 96 °GL, para a avaliação do melhor líquido extrator de substâncias presentes na droga.

Os resultados encontrados para o teor de extrativos (Tabela 2) utilizando-se etanol 96 °GL foi maior (64,20%) que utilizando água (56,54%), com isso pode-se concluir que no preparo de extrato de própolis, a utilização de etanol como líquido extrator favorece a extração.

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância na própolis, sendo nela utilizados como marcadores (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; BURDOCK, 1998; MARCUCCI et al., 1995). O método de quantificação do teor de flavonóides totais, baseado na complexação com cloreto de alumínio e detectado espectrofotometricamente no visível ($\lambda = 425 \text{ nm}$), é o normalmente utilizado (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). Este quantifica os flavonóides da droga em quercetina, um flavonóide comum na própolis. Na quantificação da droga, o resultado obtido (1,36%) demonstrou que o material

analisado possui um teor de flavonóides adequado, estando dentro dos limites normalmente encontrados (1,0 a 8,5%) (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; BURDOCK, 1998; FRANCO, 2001).

5.2 Preparação e controle de qualidade do extrato de própolis

Com relação à qualidade dos produtos contendo própolis, um problema muito comum é o grande número de formas de preparação de extrato de própolis sem controle e padronização. Franco e Bueno (1999) demonstraram a eficiência da turboextração na obtenção de soluções extrativas de própolis, com teores de flavonóides variando de 0,76 a 1,91%. Os resultados encontrados na análise dos extratos de própolis (Tabela 3) demonstraram a semelhança em teor de flavonóides com os estudos citados acima e com os valores encontrados por Franco et al. (2000). Comparando as origens das própolis e os teores de flavonóides obtidos para os extratos, observa-se a semelhança entre os teores das própolis originárias do Estado do Paraná.

Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas do extrato de própolis

Parâmetros	Média	s	CV%	n
Densidade relativa (g/mL)	0,8718	0,0008	0,09	3
pH	5,31	0,0115	0,22	3
Resíduo seco (% p/p)	17,11	0,5733	3,35	3
Teor alcoólico (% V/V)	85,00	3,0000	3,53	3

s = desvio padrão CV% = coeficiente de variação n = número de análises

O pH de uma solução extrativa está diretamente relacionado com o pH do líquido extrator e com o pH das substâncias nela presentes. Assim, o pH do extrato de própolis é dependente do pH do etanol, das substâncias fenólicas, dos derivados do álcool cinâmico, de substâncias nitrogenadas como os aminoácidos, entre outras substâncias (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006; FRANCO; BUENO, 1999). O valor de pH (Tabela 3) foi compatível com o pH do fluido vaginal sendo, portanto, adequado para com a utilização clínica.

A determinação da densidade relativa dos extratos tem como objetivo estabelecer mais um parâmetro de caracterização para reconhecimento destes. A maior quantidade de própolis na preparação do extrato leva a um aumento da densidade relativa, este aumento pode modificar a capacidade de dissolução do solvente, e em consequência diminuir o coeficiente de solubilidade dos flavonóides (BRUSCHI et al., 2002; FRANCO, 2001). Esse aumento está relacionado provavelmente, a dissolução de uma quantidade maior de resina e de cera. O valor obtido para a determinação da densidade relativa (0,8718 g/mL) está de acordo com os valores normalmente obtidos (BRUSCHI, 2006).

A determinação do resíduo seco justifica-se pela necessidade da obtenção de informações como a quantidade real de própolis na solução extrativa e a escolha do método de extração. O valor encontrado (Tabela 3) está de acordo com os valores normalmente obtidos (BRUSCHI et al., 2002; BRUSCHI, 2006). Embora, o teor de resíduo seco não seja considerado como um padrão de melhor ou pior qualidade, sendo apenas considerado como mais uma característica do extrato de própolis.

A determinação do teor alcoólico é mais um parâmetro avaliado no do extrato obtido. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1959) esta determinação pode ser realizada por meio da determinação da densidade ou pelo teor de água existente no extrato. A determinação da densidade pode ser realizada por diversos métodos, sendo os mais usuais, os obtidos através de densímetros (areômetros) ou através de picnômetros. A destilação, preconizada no método de determinação do teor alcoólico da Farmacopéia Brasileira (2010), elimina a possibilidade de interferência na leitura da densidade devida a presença de substâncias extraídas no extrato. Dessa forma, evita-se que ocorram determinações errôneas dos valores de densidade e, conseqüentemente, dos teores alcoólicos. O teor alcoólico no extrato (85,00%) foi inferior ao do líquido extrator utilizado, resultado da presença de umidade residual da droga e perda de solvente durante o processo extrativo devido a evaporação, mesmo com os cuidados tomados com temperatura e vedação dos recipientes.

5.3 Validação de metodologias analíticas para avaliação do extrato de própolis

O aumento do uso de preparações farmacêuticas requer abordagens relevantes para quantificação das substâncias ativas e diversos procedimentos analíticos vêm sendo propostos (BANKOVA et al., 1992; BONVEHI; COLL, 1994;

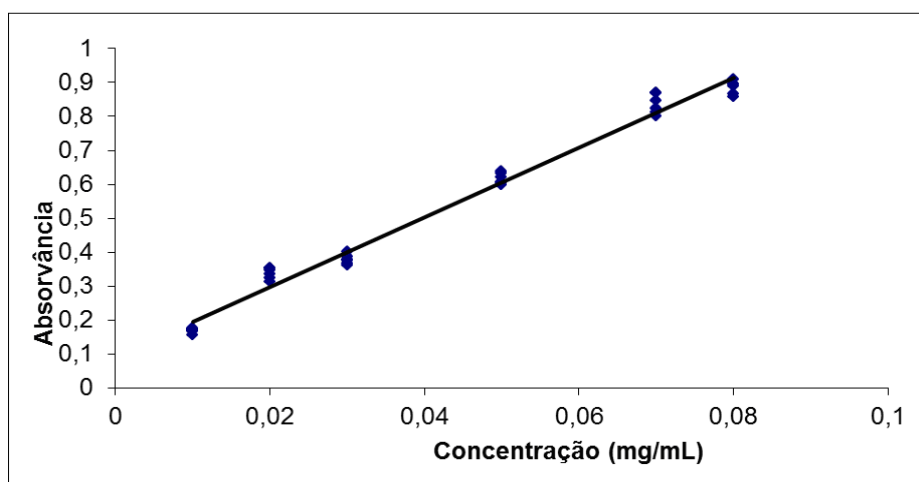
WOISKY; SALATINO, 1998; POPOVA et al., 2004). Métodos espectrofotométricos rápidos têm demonstrado serem úteis na rotina de controle de qualidade de própolis (BONVEHI; COLL, 1994; WOISKY; SALATINO, 1998; POPOVA et al., 2004). Os métodos são principalmente para determinação do teor de flavonóides totais (BRUSCHI et al., 2003) e polifenóis totais (WOISKY; SALATINO, 1998; POPOVA et al., 2004). Entretanto, para a própolis ser utilizada na terapêutica, seus procedimentos analíticos de controle químico devem ser descritos e validados, o que garante sua qualidade, segurança e eficácia.

Na análise do extrato de própolis por espectrofotometria, foi realizada a validação de metodologia analítica para quantificação de flavonóides totais e para quantificação de polifenóis totais contidos no extrato alcoólico de própolis. O procedimento foi validado de acordo com as normas descritas pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e a Resolução brasileira, RE Nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). A validação, como parte integrante da qualidade, tem por objetivo garantir, por meios de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Na análise de matrizes biológicas complexas, como o extrato de própolis, o tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser avaliados (BRUSCHI, 2006). Os parâmetros de validação os quais devem ser considerados são a exatidão, a precisão (repetibilidade e precisão intermediária), a especificidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a linearidade e a variação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

5.3.1 Validação de metodologia analítica para quantificação de flavonóides totais

A linearidade do método de quantificação do teor de flavonóides totais do extrato etanólico de própolis foi realizada a partir de diluições da solução-mãe de crisina. A curva analítica foi determinada investigando-se a crisina em seis níveis de concentração (0,01-0,08 mg/mL). As análises foram realizadas em seis replicatas para cada concentração (Figura 12).

Figura 12 - Curva de análise da crisina obtida por espectrofotometria em 425 nm (n = 6).



A equação linear representativa foi $y = 10,269x + 0,0925$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9855, com isso pode-se afirmar a existência de correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações da crisina. O limite de detecção (LD) foi de 0,1661 mg/mL e o limite de quantificação (LQ) foi de 1,7284 mg/mL. Segundo o ICH (2005) e a resolução RE n°899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), após a obtenção da curva de análise deve ser determinado os parâmetros de linearidade por meio de análise estatística, como demonstrado na tabela abaixo.

Tabela 4 - Parâmetros de linearidade para curva de calibração da crisina

Crisina	
Faixa linear (mg/mL)	0,01 - 0,08
Número de concentrações	6
Coeficiente de correlação	0,9855
Intercepto ± Erro padrão	0,089714 ± 0,011030
Inclinação ± Erro padrão	10,312994 ± 0,219146
LD (mg/mL)	0,1661
LQ (mg/mL)	1,7284

Foi realizada a regressão linear por meio do teste de Fisher, com nível de confiança de 95%. Nesta análise o valor de F, calculado pela razão da média

quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos ($F_{\text{calculado}} = \text{MRQ} / \text{MQE}$) é comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Quando $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$, se aceita, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" $a \neq 0$ "), com isso conclui-se que a regressão é significativa e a inclinação da reta da regressão não é nula. Os resultados da regressão linear para a crisina encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Regressão linear da curva de calibração da crisina

	Regressão	Resíduos
Soma quadrática	2,51004531826742	0,0385352372881355
Graus de liberdade	1	34
Média quadrática	2,51004531826742	0,00113338933200398
Teste F		2214,64
F crítico		4,13

Como o $F_{\text{calculado}}$ apresentou-se mais que dez vezes maior que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que a regressão é altamente significativa.

A análise da falta de ajuste foi realizada pelo teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Ela é realizada comparando-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (determinado pela razão das médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro) com o valor de $F_{\text{crítico}}$.

Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, o modelo apresenta ajuste satisfatório. Os valores da análise da falta de ajuste estão descritos na tabela 6.

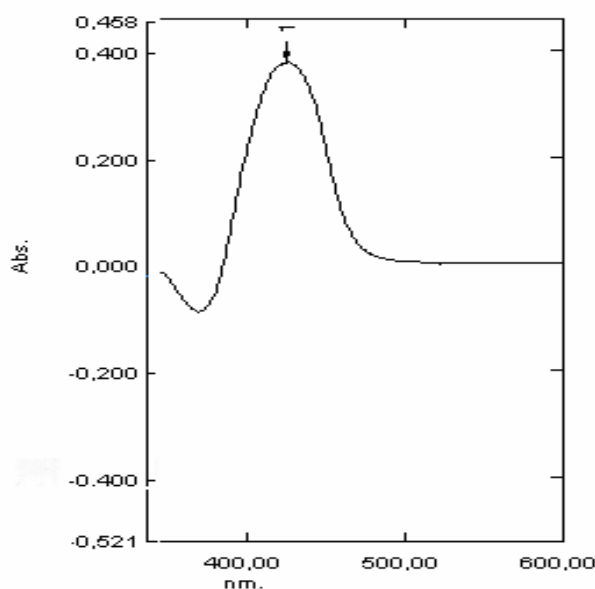
Tabela 6 – Análise da falta de ajuste da curva de calibração da crisina

	Falta de ajuste	Erro puro
Soma quadrática	0,026616037	0,009977833
Graus de liberdade	4	30
Média quadrática	0,006654009	0,000332594
Teste F		20,01
F crítico		2,69

Como o $F_{\text{calculado}}$ apresentou-se ligeiramente maior que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que o modelo linear apresenta uma pequena falta de ajuste. Entretanto mesmo possuindo essa variância entre os valores dos erros puros a curva de análise foi utilizada pelo modelo possuir valores de regressão linear altamente significativos.

A seletividade do método foi avaliada pela análise do espectro de varredura para o extrato de própolis a 30% (p/p) (Figura 13).

Figura 13 - Espectro de absorção para o extrato de própolis a 30% (p/p) para o método de quantificação de flavonóides totais.



O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual para as concentrações de crisina analisadas (Tabela 7) demonstraram reprodutibilidade.

Tabela 7 – Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de crisina analisadas

Crisina (mg/mL)	0,01	0,02	0,03	0,05	0,07	0,08
CV (%)	4,74	4,80	3,81	2,68	3,47	2,15

Para determinação do parâmetro de precisão (Tabela 8) foram realizadas a repetibilidade e precisão intermediária. Este resultado é referente à média de três

determinações e está de acordo com o limite estabelecido (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 8 - Precisão do método de quantificação de flavonóides totais

Crisina (mg/mL)	Dias	Repetibilidade		Precisão intermediária	
		Média ± s	CV %	Média ± s	CV %
0,02000	1	0,02641 ± 0,00109	4,11	0,02488 ± 0,00156	4,62
	2	0,02498 ± 0,00061	2,43		
	3	0,02326 ± 0,00088	3,80		
0,03000	1	0,02943 ± 0,00088	2,98	0,02790 ± 0,00161	4,37
	2	0,02796 ± 0,00079	2,81		
	3	0,02631 ± 0,00131	4,97		
0,04000	1	0,04861 ± 0,00099	2,03	0,04807 ± 0,00192	3,37
	2	0,04663 ± 0,00195	4,18		
	3	0,04897 ± 0,00229	4,68		

A análise de uma amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de ácido gálico determinou a exatidão do método utilizando ensaios de recuperação (Tabela 9). A recuperação de crisina adicionada foi de $112,52 \pm 13,65\%$. Este resultado é referente à média de três determinações e está de acordo com os valores de referência de 80 – 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 9 - Recuperação para método de quantificação de flavonóides totais

Crisina (mg/mL) Adicionada	Crisina (mg/mL) Encontrada	Recuperação (% ± CV%)	Média (% ± CV%)
0,02000	0,02488 ± 0,002	124,40 ± 7,8208	112,52 ± 13,65
0,03000	0,02781 ± 0,002	92,71 ± 5,6714	
0,04000	0,04807 ± 0,002	120,17 ± 4,8054	

A robustez do método foi avaliada pela variação do comprimento de onda para leitura (Tabela 10). O método demonstrou ser robusto para o comprimento de onda de 425 nm.

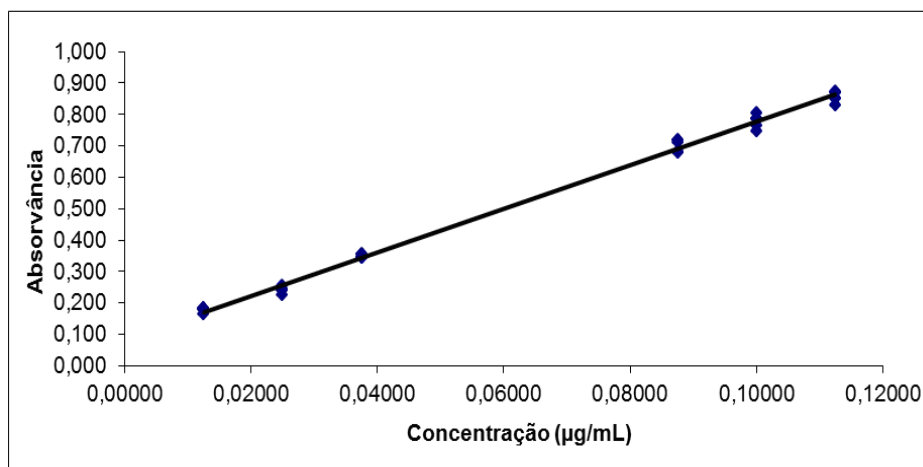
Tabela 10 - Robustez para método de quantificação de flavonóides totais

Crisina (mg/mL)	λ (nm)	Crisina (mg/mL)	CV%
		Média \pm s	
0,02000	415	0,04309 \pm 0,002	3,70
	425	0,02641 \pm 0,001	4,11
	435	0,01222 \pm 0,001	5,75
0,03000	415	0,04718 \pm 0,002	3,72
	425	0,02943 \pm 0,001	2,98
	435	0,01653 \pm 0,001	3,78
0,04000	415	0,07695 \pm 0,002	2,16
	425	0,04861 \pm 0,001	2,03
	435	0,02563 \pm 0,0005	1,95

5.3.2 Validação de metodologia analítica para quantificação de polifenóis totais

A linearidade do método de quantificação do teor de polifenóis totais do extrato etanólico de própolis foi realizada a partir de diluições da solução-mãe de ácido gálico. A curva analítica foi determinada investigando-se o ácido gálico em seis níveis de concentração linear (0,0125 - 0,1125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As análises foram realizadas em cinco replicatas para cada concentração (Figura 14).

Figura 14 - Curva de análise do ácido gálico obtido por espectrofotometria em 760 nm (n = 5).



A equação linear representativa foi $y = 6,9283x + 0,0845$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9962, com isso pode-se afirmar a existência de correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações do ácido gálico. Este valor concorda com a Resolução Brasileira RE n° 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que estabelece uma $r \geq 0,99$ como critério de aceitação do método proposto. Além disso, o limite de detecção (LD) foi de 0,0028 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o limite de quantificação (LQ) foi de 0,0086 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e os parâmetros de linearidade por meio de análise estatística, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros de linearidade para curva de análise do ácido gálico

Ácido gálico	
Faixa linear ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,0125 - 0,1125
Número de concentrações	6
Coeficiente de correlação	0,9962
Intercepto \pm Erro padrão	0,084549 \pm 0,005929
Inclinação \pm Erro padrão	6,928275 \pm 0,080568
LD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,0028
LQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,0086

Foi realizada a regressão linear por meio do teste de Fisher, com nível de confiança de 95%. Nesta análise o valor de F , calculado pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos ($F_{\text{calculado}} = \text{MRQ} / \text{MQE}$) é comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Quando $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$, aceita-se, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" a " $\neq 0$), com isso conclui-se que a regressão é significativa e a inclinação da reta da regressão não é nula. Os resultados da regressão linear para a crisina encontram-se na tabela 12.

Tabela 12 - Regressão linear da curva de calibração do ácido gálico

	Regressão	Resíduos
Soma quadrática	2,17504560344828	2,17504560344828
Graus de liberdade	1	28
Média quadrática	0,00823576321839081	0,000294134400656815
Teste F	7394,74	
F crítico	4,19	

Como o $F_{\text{calculado}}$ é mais que dez vezes maior que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que a regressão é altamente significativa.

A análise da falta de ajuste foi realizada pelo teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Ela é realizada comparando-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (determinado pela razão das médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro) com o valor de $F_{\text{crítico}}$. Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, o modelo apresenta ajuste satisfatório. Os valores da análise da falta de ajuste estão descritos na tabela 13.

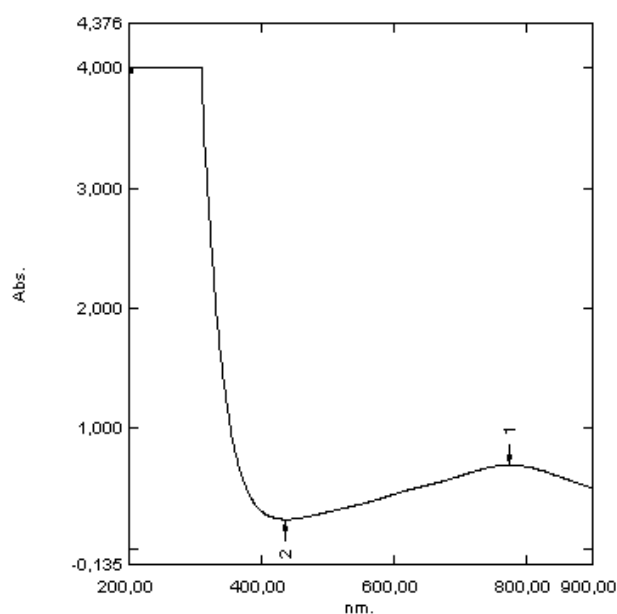
Tabela 13 - Análise da falta de ajuste da curva de calibração do ácido gálico

	Falta de ajuste	Erro puro
Soma quadrática	0,002791763	0,005444000
Graus de liberdade	4	24
Média quadrática	0,000697941	0,000226833
Teste F	3,08	
F crítico	2,78	

O $F_{\text{calculado}}$ apresentou-se um pouco maior que o $F_{\text{crítico}}$, levando-se a concluir que o modelo linear praticamente não apresenta falta de ajuste. Entretanto mesmo possuindo essa pequena variância entre os valores dos erros puros a curva de análise foi utilizada pelo modelo possuir valores de regressão linear altamente significativos.

Adicionalmente, a seletividade do método foi avaliada pela análise do espectro de varredura para o extrato de própolis a 30% (p/p) (Figura 15).

Figura 15 - Espectro de absorção para o extrato de própolis a 30% (p/p) para o método de quantificação de polifenóis totais.



O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual para as concentrações de ácido gálico analisadas (Tabela 14) demonstraram reprodutibilidade.

Tabela 14 - Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de ácido gálico analisadas.

Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	0,0125	0,0250	0,0375	0,0875	0,1000	0,1125
CV (%)	4,69	4,26	1,87	2,74	2,85	1,96

Para determinação do parâmetro de precisão (Tabela 15) foram realizadas a repetibilidade e precisão intermediária. Este resultado é referente à média de três determinações e está de acordo com o limite estabelecido (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 15 - Precisão do método de quantificação de polifenóis totais

Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Dias	Repetibilidade	CV %	Precisão	CV %
		Média \pm s		intermediária	
				Média \pm s	
0,08750	1	0,08768 \pm 0,00252	2,87	0,09224 \pm 0,00429	4,65
	2	0,09197 \pm 0,00110	1,20		
	3	0,09452 \pm 0,00320	3,39		
0,10000	1	0,09841 \pm 0,00297	3,02	0,10277 \pm 0,00472	4,59
	2	0,10390 \pm 0,00226	2,17		
	3	0,10496 \pm 0,00432	4,12		
0,11250	1	0,11054 \pm 0,00268	2,42	0,11185 \pm 0,00201	1,80
	2	0,11020 \pm 0,00025	0,23		
	3	0,11251 \pm 0,00161	1,43		

A análise de uma amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de ácido gálico determinou a exatidão do método utilizando ensaios de recuperação (Tabela 16). A recuperação de ácido gálico foi de $101,77 \pm 4,29\%$. Este resultado é referente a média de três determinações e está de acordo com os valores de referência de 80 - 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 16 - Recuperação para método de quantificação de polifenóis totais

Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) Adicionada	Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) Encontrada	Recuperação (% \pm CV%)	Média (% \pm CV%)
0,08750	0,09139 \pm 0,004	104,44 \pm 4,1820	101,77 \pm 4,29
0,10000	0,10242 \pm 0,004	102,42 \pm 4,1723	
0,11250	0,11075 \pm 0,002	98,44 \pm 1,9624	

A robustez do método foi avaliada pela variação do comprimento de onda para leitura (Tabela 17). O método demonstrou ser robusto nos comprimentos de onda avaliados.

Tabela 17 - Robustez para método de quantificação de polifenóis totais

Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	λ (nm)	Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	CV%
		Média \pm s	
0,08750	750	0,08927 \pm 0,002	2,29
	760	0,08768 \pm 0,003	2,87
	770	0,08889 \pm 0,002	2,39
0,10000	750	0,09817 \pm 0,003	3,29
	760	0,09841 \pm 0,003	3,02
	770	0,09913 \pm 0,003	3,00
0,11250	750	0,10914 \pm 0,002	2,25
	760	0,11054 \pm 0,003	2,42
	770	0,11131 \pm 0,003	2,41

5.3.3 Quantificação do extrato de própolis

Os resultados obtidos na quantificação (flavonóides e polifenóis totais) do extrato de própolis 30% (p/p) estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados da quantificação do extrato de própolis 30% (p/p) para teor de flavonóides e teor de polifenóis totais.

Parâmetros	Média	s	CV%	n
Teor de flavonóides totais (% p/V) extrato em crisina	2,23	0,0366	1,64	6
Teor de polifenóis totais (% p/V) extrato em ácido gálico	4,07	0,0806	1,98	6

s = desvio padrão CV% = coeficiente de variação n = número de análises

5.4 Avaliação antifúngica *in vitro* do extrato de própolis

5.4.1 Determinação da CIM e CFM do extrato de própolis

A própolis possui diversas finalidades na colmeia, ela recobre sua parede interna e veda aberturas, impedindo dessa forma de insetos e permitindo desse

modo que ela fique mais protegida (GHISALBERTI, 1979). Além disso, ela é a principal responsável pela constância da temperatura (28 a 30 °C) e pela manutenção de uma ambiente quase estéril da colmeia (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998). Portanto sua presença garante a baixa incidência de bactérias e fungos no local, agindo como microbicida. Isso que explica seu amplo espectro de atividades biológicas destacando-se, dentre elas, a antibacteriana e antifúngica (MARCUCCI, 1995), sendo a última a de principal interesse no presente trabalho.

Por conseguinte, a atividade antifúngica *in vitro* do extrato de própolis foi avaliada frente à cepas de leveduras provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e frente à isolados clínicos do banco de leveduras do Laboratório de Micologia Médica pertencente ao LEPAC – UEM. Os resultados obtidos para os controles positivo, negativo e etanol controlaram os ensaios e asseguraram a eficácia do experimento.

A CIM do EPRP foi determinada frente a 17 leveduras, as quais apresentaram condições de cultivos compatíveis com as exigências para a execução do teste. A variação da CIM foi de 340,55 – 1362,19 µg/mL para o extrato de EPRP (Tabela 19). A partir dos resultados obtidos, realizou-se o teste para determinação da CFM para comprovação da atividade fungicida. O teste da CFM apresentou os mesmos valores encontrados para CIM concordando, portanto com o teste anterior (Tabela 19). A partir desse resultado foi calculado a CFM em polifenóis totais (principal grupo responsável pela atividade antifúngica da própolis).

Os resultados obtidos para o extrato foram iguais ou menores que 55,44 µg/mL de polifenóis totais, demonstrado boa atividade frente tanto as cepas de referência, como também frente aos isolados clínicos. Eles apresentaram menores valores de CFM frente a 1 *C. albicans* CVV e 1 *C. albicans* CVVR. Em 27,72 µg/mL de polifenóis totais foram susceptíveis 1 *C. albicans* CVVR, 2 *C. albicans* ASS, 1 *C. tropicalis* e 2 *C. parapsilosis*. A menor susceptibilidade (13,86 µg/mL) foi demonstrada frente a *C. albicans* ATCC, 1 *C. albicans* CVV e 1 *C. albicans* CVVR, 1 *C. tropicalis*, todas *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 19 – Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de própolis frente às leveduras testadas

Micro-organismo	Número de leveduras	CFM $\mu\text{g. mL}^{-1}$	CFM em Polifenóis Totais $\mu\text{g. mL}^{-1}$
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	1	1362,19	55,44
<i>Candida albicans</i> CVV	1	340,55	13,86
<i>Candida albicans</i> CVV	1	1362,19	55,44
<i>Candida albicans</i> CVVR	1	340,55	13,86
<i>Candida albicans</i> CVVR	1	681,09	27,72
<i>Candida albicans</i> CVVR	1	1362,19	55,44
<i>Candida albicans</i> ASS	1	681,09	27,72
<i>Candida albicans</i> ASS	1	681,09	27,72
<i>Candida glabrata</i>	1	1362,19	55,44
<i>Candida glabrata</i>	1	1362,19	55,44
<i>Candida glabrata</i>	1	1362,19	55,44
<i>Candida parapsilosis</i>	1	681,09	27,72
<i>Candida parapsilosis</i>	1	681,09	27,72
<i>Candida tropicalis</i>	1	681,09	27,72
<i>Candida tropicalis</i>	1	1362,19	55,44
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	1	1362,19	55,44
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	1	1362,19	55,44
Total	17		

Os antifúngicos sintéticos apresentaram uma variação de 0,125 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, 2,0 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para nistatina e 0,03125 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B. Entretanto, embora a própolis necessite de uma maior concentração que os sintéticos, ela apresenta-se como uma opção de tratamento eficaz e segura, e excluindo-se alergias, praticamente sem efeitos adversos.

Desta forma, pode ser comprovada que tanto a própolis quanto seu extrato etanólico apresentou qualidade e comprovação de sua atividade antifúngica. A concentração de extrato etanólico de própolis utilizado nas formulações foi

estabelecida com base em dados da literatura e resultados obtidos de suas avaliações físico-químicas e microbiológicas. O extrato de própolis é comumente utilizado na terapêutica em dispersões aquosas de 2 à 4% (V/V) (PAMPLONA, 1997; BURDOCK, 1998; BRUSCHI, 2006), considerando-se a variação do seu teor de substâncias ativas e, do extrato, com a origem geográfica e época de coleta (FRANCO, 2001; BANKOVA, 2005; BRUSCHI, 2006).

Com base nesses resultados, o teor de extrato de própolis (resíduo seco) e a evidência que o sistema de liberação mucoadesivo termossensível vaginal deve liberar o agente antifúngico por períodos prolongados de tempo na mucosa vaginal em níveis maiores que a concentração fungicida mínima (CFM) para as leveduras, a concentração utilizada nos sistemas foi de 4% (p/p).

5.5 Desenvolvimento e caracterização de sistema semissólido termossensível

Nas últimas décadas, uma maior atenção tem se concentrado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos. O número de produtos baseados nesses novos sistemas vem crescendo significativamente. As principais vantagens de sistemas de liberação de fármacos por meio de administração vaginal em relação aos convencionais, como a administração oral, entre outros são a capacidade de evitar o metabolismo de primeira passagem, a facilidade de administração e alta permeabilidade para fármacos de baixo peso molecular (PAVELIĆ et al., 2004; HUSSAIN; AHSAN, de 2005; BALOGLU et al., 2009; NDESENDO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011). Entretanto, uma grande desvantagem ainda associada a sistemas de ação local para liberação de fármacos é a sua pouca retenção no sítio de ação (ANDREWS; LAVERTY; JONES; 2009). Pode-se resolver esse problema utilizando-se agentes poliméricos que respondam a estímulos externos como o pH, temperatura, alterações iônicas e de corrente elétrica (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009), como polímeros mucoadesivos e/ou termossensíveis.

A administração local de fármacos possui algumas vantagens distintas em relação à administração oral. Em alguns casos, a administração local é fundamental para a liberação do fármaco em sua forma ativa. A disponibilidade é geralmente mais rápida, ampla e previsível que quando o fármaco é administrado por via oral (WILKINSON, 2003; ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010). A dose eficaz, portanto, pode ser administrada de modo mais preciso.

Pesquisas diversas têm demonstrado resultados promissores com a utilização de sistemas semissólidos mucoadesivos (ANDREWS; LAVERTY; JONES et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011), principalmente hidrogéis, contendo agentes para higiene pessoal (YOO et al. 2006), para restauração e manutenção da acidez vaginal (BONFERONI et al., 2006), contraceptivos (ZANEVELD et al., 2001), antiprotozoários (EL-KAMEL et al., 2002; DIAS et al., 2005; RAMADAN et al., 2008; BHOWMIK et al. et al., 2009), antibacterianos (PAVELIĆ et al., 2004; DIAS et al., 2005; SIMÕES et al., 2005; PERIOLI et al., 2008; GUPTA et al., 2009; PATEL et al., 2009; PERIOLI et al, 2009a) ou antifúngicos (CESCHEL et al., 2001; CHANG et al., 2002; KAST et al., 2002; FRANCOIS et al., 2003; BILENSOY et al., 2006; SHARMA et al., 2006; ALAM et al., 2007; ALBERTINI et al., 2009; BACHHAV et al., 2009, PATEL et al., 2010). Juntamente, polímeros que apresentam aumento da viscosidade com o aumento da temperatura têm despertado grande interesse (CHANG et al., 2002; BILENSOY et al., 2006; HAN et al., 2006, BILENSOY et al., 2010)

Bioadesivos são materiais naturais ou sintéticos que podem fixar-se sobre superfícies biológicas e permanecer ali durante um período prolongado de tempo (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009, SHAIKH et al., 2011). A bioadesão pode ser definida como algum tipo de fenômeno de adesão em que uma ou mais fases estão envolvidas, ou substrato ou adesivo, fazendo parte de um organismo vivo. Sempre que a adesão é em uma superfície mucosa o fenômeno então é chamado mucoadesão (WAITE et al., 1990; BRUSCHI, 2006). Assim como podem interagir com a camada de mucina da mucosa vaginal, pelo princípio da mucoadesão, recobrando uma grande superfície da mucosa, exibindo boa retenção na cavidade vaginal por período de tempo desejável (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009, SHAIKH et al., 2011). A associação de polímeros mucoadesivos com polímeros termossensíveis tem possibilitado desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos com capacidade de contato superior, melhor adesividade, tempo de residência prolongados e, conseqüentemente, absorção assegurada no sítio de aplicação selecionado (VALENTA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009, JONES et al., 2009; SHAIKH et al., 2011).

Nesse contexto, foi desenvolvido um sistema inédito objetivando a administração vaginal, com liberação local de própolis, para o tratamento de CVV,

baseado nas propriedades físico-químicas do polímero termossensível P407 e o do polímero mucoadesivo C934P.

Considerando que o sistema polimérico binário (blenda) composto por P407 e C934P deve ser líquido a baixa temperatura, gelificar na cavidade vaginal (34 - 37 °C) e possuir pH compatível com o da mucosa vaginal (VALENTA, 2005), foram preparadas formulações poliméricas binárias com proporções diferentes de P407 e C934P.

Partindo desse princípio, utilizaram-se P407 e C934P no desenvolvimento de um sistema semissólido mucoadesivo termossensível para liberação de micropartículas de própolis na mucosa vaginal. A variação das concentrações desses polímeros pode gerar sistemas com diversas propriedades físicas. Os sistemas binários, preparados com várias proporções de P407 e C934P, apresentaram diferenças com relação a aparência e consistência. Os mesmos resultados foram observados por Bruschi (2006) ao preparar sistemas bioadesivos formados por P407 e C934P em diferentes proporções. Verificou-se também a influência do pH, mas principalmente do agente neutralizante na alteração da viscosidade, sendo que o último não a afeta de forma direta (BRUSCHI, 2006). Entretanto, a utilização de trietanolamina como neutralizante, no lugar de tampão tris ou solução de hidróxido de sódio, foi justificada pelo fato desta proporcionar utilização clínica e aumentar a mucoadesão das formulações (MUSIAL; KUBIS, 2004; TAMBURIC; CRAIG, 1995; BRUSCHI; 2006). Portanto, a avaliação das propriedades apresentadas pelos sistemas poliméricos binários, foi importante para prever e entender o comportamento *in vivo* dos mesmos.

5.5.1 Determinação da densidade relativa

Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis apresentaram densidade relativa entre $1,0250 \pm 0,0003$ e $1,0318 \pm 0,0003$ conforme apresentado na tabela 20.

Na avaliação de densidade, os sistemas apresentaram valores muito próximos da densidade da água. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que ambos os sistemas sejam constituídos por cerca de 80% (p/p) de água.

Tabela 20 - Densidade relativa dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis^a

SMTS	Concentração (% p/p)		Densidade (g/mL)
	P407	C934P	
15/0,20	15	0,20	1,0297 ± 0,0003
15/0,25	15	0,25	1,0250 ± 0,0003
20/0,10	20	0,10	1,0318 ± 0,0003
20/0,15	20	0,15	1,0305 ± 0,0003

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de pelo menos três replicatas

5.5.2 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação

Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis foram avaliados previamente pelo método mecânico para determinação da temperatura de transição sol-gel ($T_{\text{sol-gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Temperatura de gelificação ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida por meio de método mecânico (preliminar) dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis^a

SMTS	Concentração (% p/p)		$T_{\text{sol/gel}}$ (°C)
	P407	C934P	
15/0,10	15	0,10	31,23 ± 0,25
15/0,15	15	0,15	30,33 ± 1,04
15/0,20	15	0,20	29,00 ± 1,53
15/0,25	15	0,25	28,17 ± 0,00
20/0,10	20	0,10	23,33 ± 1,15
20/0,15	20	0,15	21,83 ± 0,29
20/0,20	20	0,20	19,67 ± 0,58
20/0,25	20	0,25	16,00 ± 0,00

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de pelo menos três replicatas

A avaliação preliminar temperatura de gelificação ($T_{\text{sol/gel}}$) da maior parte dos sistemas poliméricos binários demonstrou ser adequada, podendo garantir o comportamento de gel no interior da cavidade vaginal, sendo também utilizada como

uma etapa de triagem dos sistemas com maior potencial para liberação de própolis. Grande parte das formulações contendo 15 e 20 % (p/p) de P407 apresentou-se na forma líquida a temperatura ambiente e gelificaram em temperatura corporal. As temperaturas de gelificação são adequadas se estiverem entre 25 e 37 °C (CHANG et al., 2002; BRUSCHI, 2006). Quando a $T_{sol/gel}$ de uma formulação termossensível é mais baixa que 25 °C pode-se ter a formação de um gel à temperatura ambiente dificultando a produção, manuseio e administração desta. Entretanto se a $T_{sol/gel}$ é maior que 37 °C, o estado líquido permanece no interior da cavidade vaginal, causando o escoamento e perda do sistema do sítio de ação. As formulações poliméricas binárias apresentaram valores de $T_{sol/gel}$ entre 16,00 e 31,23 °C, e a partir desses resultados selecionou-se as formulações para receberem as micropartículas de própolis (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009).

5.5.3 Análise do perfil de textura

Foram avaliadas as propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade, elasticidade e coesividade) do sistema mucoadesivo termossensível contendo 15% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P (SMTS-1) e do sistema contendo 20% (p/p) de P407 com 0,15% (p/p) de C934P (SMTS-2) sem micropartículas de própolis.

Observou-se que com o aumento da concentração de P407 e da temperatura houve um aumento significativo em todas as propriedades avaliadas, que pode ser comprovado pelos valores mínimos de dureza, compressibilidade, adesividade, elasticidade e coesividade apresentados pela formulação contendo 15% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P na temperatura de 25 °C, e valores máximos das propriedades na formulação contendo 20% (p/p) de P407 com 0,15% (p/p) de C934P na temperatura de 37 °C.

Tabela 22 - Propriedades mecânicas dos sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2)^a

Propriedades	Sistemas			
	SMTS-1		SMTS-2	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
Dureza (N)	0,30 ± 0,02	0,39 ± 0,01	1,04 ± 0,05	1,10 ± 0,03
Compressibilidade (N.mm)	1,38 ± 0,07	1,75 ± 0,04	5,32 ± 0,34	5,56 ± 0,18
Adesividade (N.mm)	1,12 ± 0,06	1,51 ± 0,05	4,74 ± 0,23	5,04 ± 0,47
Elasticidade (mm)	14,64 ± 0,31	14,66 ± 0,28	14,76 ± 0,13	14,90 ± 0,08
Coesividade (N.mm)	0,90 ± 0,02	0,93 ± 0,04	1,23 ± 0,08	1,09 ± 0,04

^a Valores representam a média (± desvio padrão) de seis replicatas.

As propriedades mecânicas das formulações compreendem a resposta dos sistemas às influências mecânicas externas, manifestadas por sua capacidade de desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis, sendo essas propriedades avaliadas por análise de textura. A dureza é proporcional à força aplicada para ocasionar uma deformação ou rompimento da amostra. Observou-se um aumento significativo nessa propriedade com o aumento da concentração do polímero termossensível (P407), ou seja, a força máxima avaliada, para esses sistemas é dependente das proporções dos polímeros na formulação, estando diretamente relacionados também com a temperatura.

A análise dos resultados de textura aponta para valores adequados de dureza, nestes pode-se observar que na formulação com 20% (p/p) de P407 a 37 °C ocasionou uma maior resistência da amostra à compressão (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Esse parâmetro também teve aumento significativo nos seus valores com o aumento de P407 e da temperatura.

A manutenção da coesividade em sistemas poliméricos está relacionada às interações moleculares dos componentes, principalmente ligações de hidrogênio e

ligações cruzadas com a participação de grupos carboxílicos livres (não carregados) e a mobilidade da água na amostra. Valores baixos de coesividade caracterizam sistemas fracamente estruturados de difícil manipulação e administração. O aumento na concentração do polímero termossensível (P407) e da temperatura aumentou significativamente a coesividade e a elasticidade (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009).

A última propriedade avaliada foi a adesividade, definida como o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície do sistema e a superfície da prova, sendo determinada a partir da área sobre a curva força-distância na parte de tensão do gráfico (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Os resultados gerados por essa técnica são úteis para o objetivo dessa aplicação, visto que tem sido reportada a relação entre a mucoadesão e adesividade para sistemas mucoadesivos (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES; 2009; JONES et al., 2009). Ambas as formulações binárias, contendo 15 ou 20% (p/p) de P407 exibiram adesividade tanto a 25 °C quanto a 37 °C. Esses resultados reforçam a interação entre os polímeros e evidenciam a existência de mucoadesão, favorecendo uma melhor retenção do sistema na cavidade vaginal (ANDREWS; LAVERTY; JONES; 2009; JONES et al., 2009).

5.5.4 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

Na avaliação *in vitro* da força mucoadesiva dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 notou-se que com o aumento da concentração de P407 houve um aumento significativo na força vertical de remoção necessária para quebrar a ligação mucoadesiva da formulação com o disco de mucina (Tabela 23).

Tabela 23 – Análise *in vitro* da força mucoadesiva dos sistemas mucoadesivos termossensíveis (SMTS-1 e SMTS-2)^a

Sistema	Força (N)
SMTS-1	0,29 ± 0,01
SMTS-2	0,57 ± 0,03

^a Valores representam a média (± desvio padrão) de cinco replicatas.

É reportado que o C934P possui propriedades mucoadesivas (TAMBURIC; CRAIG, 1995; CHANG et al., 2002a; BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Portanto, a possibilidade de um maior contato entre as duas interfaces permitiu o movimento de água a partir da formulação para o disco de mucina, assegurando intumescimento da mucina e possibilitando a interpenetração das cadeias de mucina com as cadeias poliméricas do sistema. Devido as concentrações poliméricas utilizadas nos sistemas, a quantidade de água foi suficiente para produzir o intumescimento da mucina, garantindo a força de ligação adesiva entre essa e o sistema.

A quantidade de grupos carboxílicos livres presentes nas cadeias poliméricas do C934P está diretamente relacionada com a propriedade de mucoadesão deste polímero (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Entretanto a utilização de trietanolamina como agente de neutralização nas formulações proporcionou uma boa performance mucoadesiva nos sistemas, estando de acordo como valores obtidos por Tamburic e Craig (1995) e Bruschi (2006). Segundo Tamburic e Craig sistemas neutralizados demonstraram uma maior densidade de carga que sistemas não neutralizados, pela presença de base para promover a dissociação. Sabe-se que a natureza expandida da rede polimérica contribui grandemente para a força mucoadesiva, portanto, a natureza não emaranhada das moléculas poliméricas dentro das formulações neutralizadas pode ser explicada por esses efeitos. Além disso, observou-se que cátions monovalentes, como o hidróxido de sódio, reduziram o intumescimento de ácidos poliacrílicos (BRUSCHI, 2006), afetando a mucoadesão.

Com relação ao polímero termossensível P407, observou-se que os segmentos OP deste podem agregar formando o núcleo de micelas em resposta au aumento de temperatura. Juntamente, os segmentos OE são exteriorizados formando a coroa (SCHMOLKA et al., 1972; BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Devido a presença de grupos hidroxilas nos segmentos OE, que possuem capacidade de formar ligações de hidrogênio com os grupos carboxila do C934P, exteriorizando dessa forma os últimos contribuindo para a interpenetração das cadeias poliméricas de mucina com os sistemas. Assim a temperatura da cavidade vaginal é favorável a um bom desempenho da propriedade mucoadesiva dos sistemas.

5.5.5 Análise reológica de cisalhamento contínuo

Na reometria de cisalhamento contínuo os sistemas exibiram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com vários graus de valor de rendimento e área de histerese (Figuras 16 e 17). Tixotropia e valor de rendimento foram mais marcantes no SMTS-2 que possui uma maior concentração de P407.

Figura 16 - Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

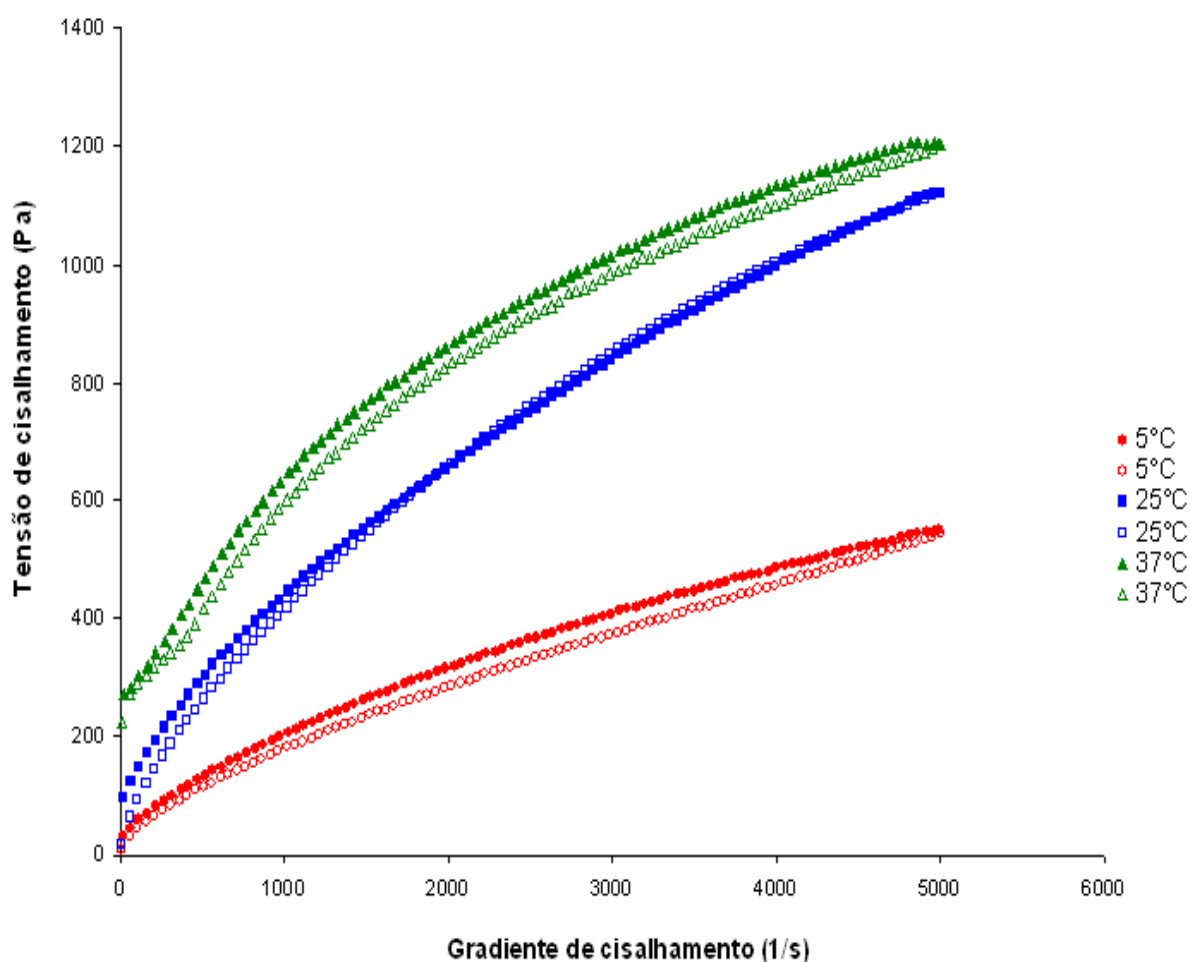
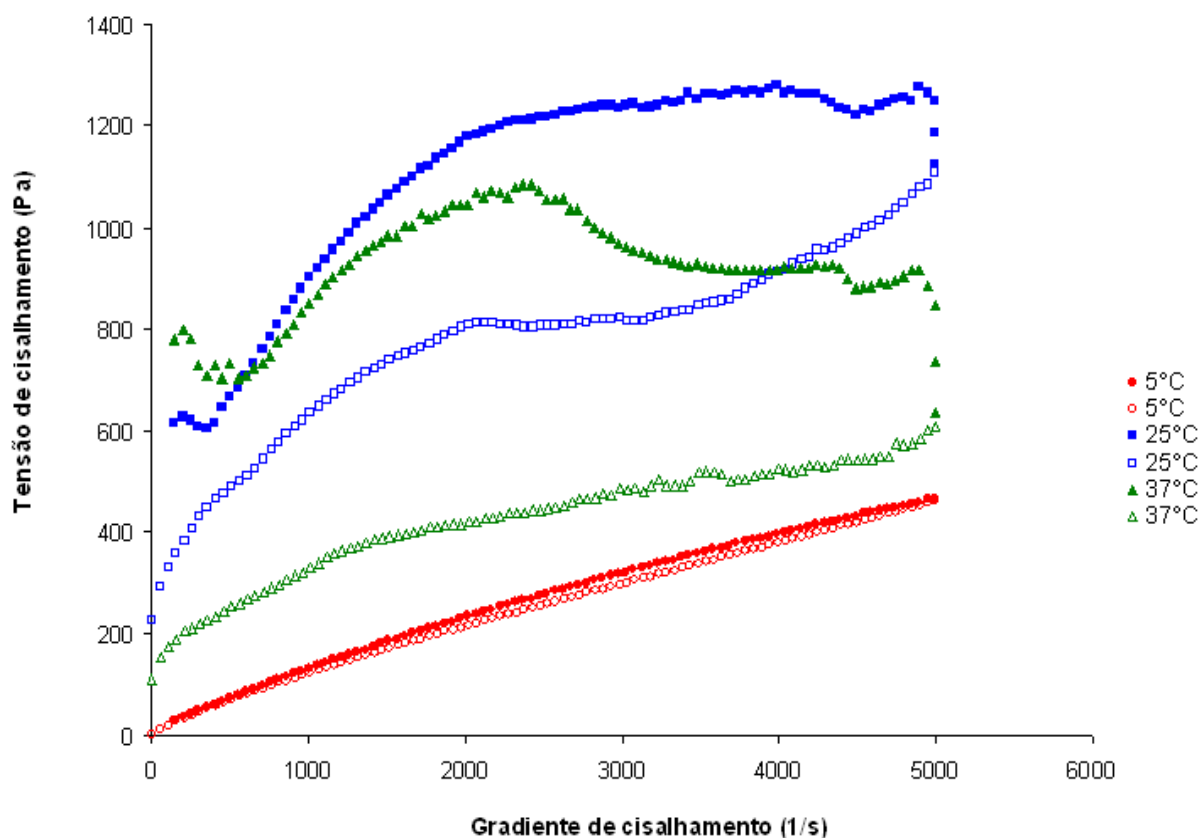


Figura 17 - Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.



Para possibilitar comparações estatísticas dos efeitos de cada componente polimérico nas propriedades de fluxo das formulações, a curva de ida e volta de cada reograma foi matematicamente definida por meio do modelo da Lei da Potência (BRUSCHI, 2006, JONES et al., 2009), do qual os índices k e η de cada formulação foram obtidos e estão apresentados nas Tabelas 24 e 25, respectivamente.

Tabela 24 - Valores obtidos para o índice de consistência (k) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis^a

Sistema	k (Pa.s)		
	5°C	25°C	37°C
SMTS-1	3,15 ± 0,05	5,10 ± 0,10	114,34 ± 0,90
SMTS-2	0,49 ± 0,01	105,20 ± 11,08	243,35 ± 3,66

^a Valores representam a média (\pm desvio padrão) de cinco replicatas.

O comportamento de cisalhamento contínuo de SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis foi influenciado pela temperatura e o conteúdo de P407 e de C934P. Houve um aumento significativo no índice k com o aumento da concentração polimérica e da temperatura. Além disso, o índice η foi diminuído significativamente com o aumento das temperaturas e não houve diferença significativa com o aumento da concentração polimérica.

Tabela 25 - Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (η) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis^a

Sistema	η (adimensional)			
	Temperatura	5°C	25°C	37°C
SMTS-1		0,61 ± 0,00	0,63 ± 0,00	0,28 ± 0,00
SMTS-2		0,81 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,42 ± 0,01

^a Valores representam a média (\pm desvio padrão) de cinco replicatas.

O comportamento de cisalhamento contínuo apresentado pelos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 (Figuras 16 e 17) foi influenciado pela temperatura e pela concentração de cada polímero. Na temperatura de 5 °C, as formulações apresentaram baixo índice k (Tabela 24), existindo na forma líquida. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas (25 e 37 °C), as formulações exibiram índices de consistência maiores, existindo no estado semissólido.

Tem sido reportado que a viscosidade de formulações aquosas contendo poloxamer aumenta com o aumento da concentração polimérica e com a temperatura (SCHMOLKA, 1972). Em contraste, formulações aquosas de Carbopol[®] apresentam diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura (BRUSCHI, 2006). Consequentemente, o comportamento de fluxo das formulações foi devido, em parte, às propriedades reológicas do P407 e do C934P.

Os sistemas exibiram fluxo pseudoplástico, com variados valores de rendimento, típico de pomadas e cremes, géis ou outros semissólidos (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). As respostas não-lineares para a tensão de cisalhamento exibidas por essas formulações nas três temperaturas foram resultado das alterações estruturais causadas pelo cisalhamento. Provavelmente, as

formulações consistiam primariamente de moléculas poliméricas de cadeia longa no estado de relaxamento, com a exposição à tensão de cisalhamento, as cadeias poliméricas se desemaranharam e alinharam ao longo da direção do cisalhamento, liberando o solvente que tinha sido previamente aprisionado nos emaranhados moleculares. Como resultado, o cisalhamento subsequente aconteceu mais prontamente e a viscosidade aparente diminuiu. A propriedade de diminuição da viscosidade com o cisalhamento é desejável em formulações desenvolvidas para administração na cavidade vaginal (ANDREWS, LAVERTY; JONES 2009; SHAIKH et al., 2011). Por exemplo, durante a expulsão a partir de um aplicador vaginal, em altas taxas de cisalhamento, o material fluirá prontamente, facilitando a administração. Entretanto, em condições de baixo cisalhamento, como as que ocorrem dentro da cavidade vaginal, o material adotará uma consistência mais alta, retornando às propriedades reológicas originais que ele possuía antes da administração. Como a temperatura no interior da cavidade vaginal é da ordem de 34 a 37 °C (VALENTA, 2005; MOORE; DALLEY; 2007) e a temperatura de gelificação dos sistemas está acima de 20 °C, para algumas formulações, a recuperação das propriedades reológicas originais acontecerá junto com a gelificação do sistema.

O grau de tixotropia dos sistemas SMTS-2, sendo mais ainda baixo para SMTS-1 indica um curto período de tempo para a restauração da configuração molecular relaxada. Esses atributos são vantajosos para formulações que são desenvolvidas para a administração na cavidade vaginal, pois melhorará a retenção das mesmas dentro do ambiente.

5.5.6 Análise reológica oscilatória

Os efeitos da concentração polimérica e da temperatura nas propriedades oscilatórias (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis foram avaliadas e estão apresentadas nas Figuras 18 a 21, respectivamente.

Figura 18 - Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

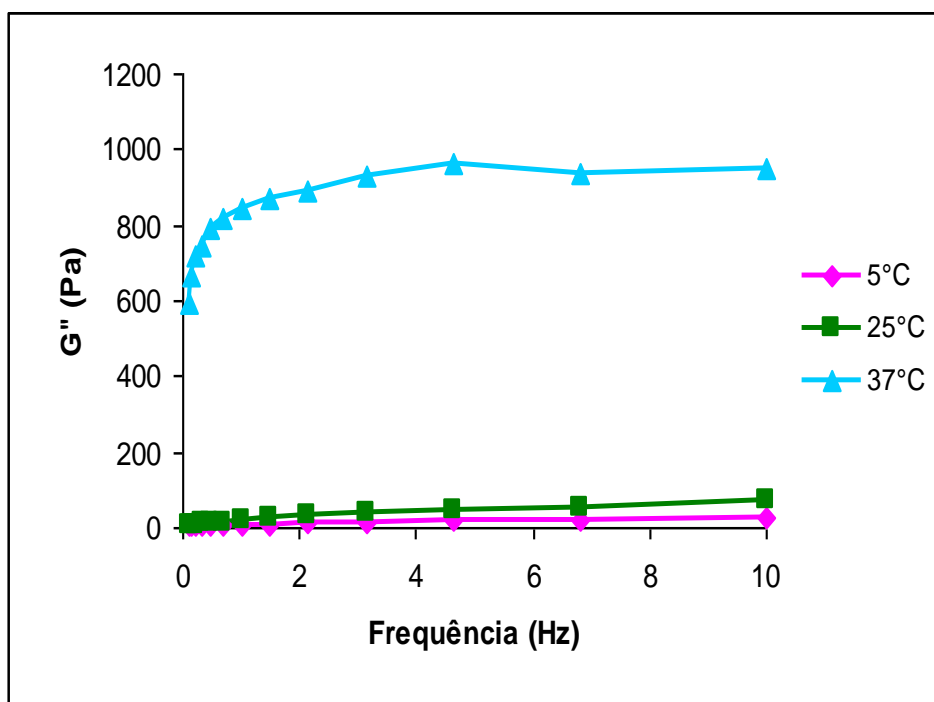
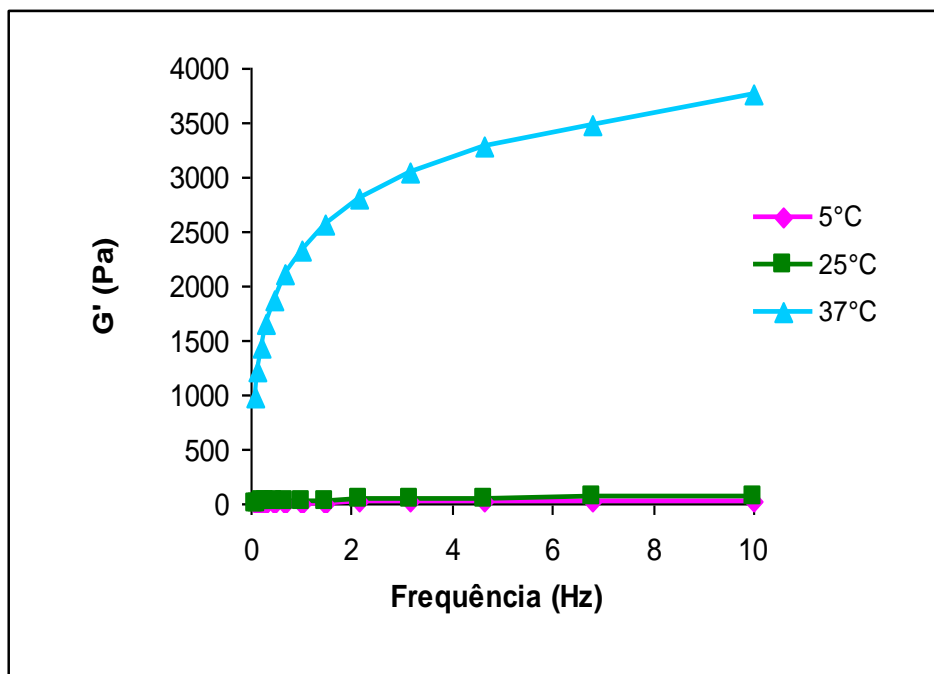


Figura 19 – Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-1 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

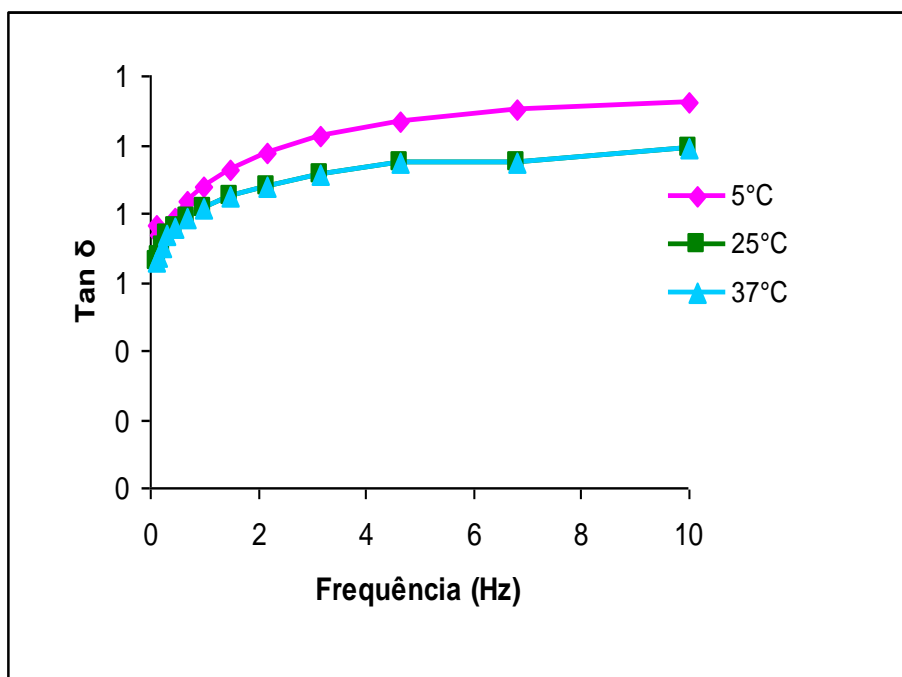
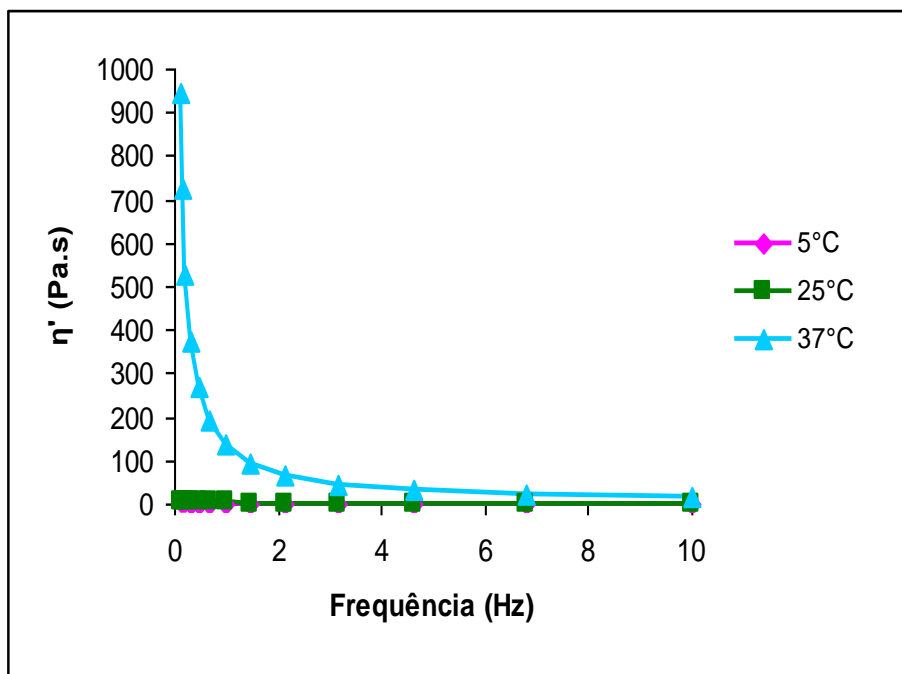


Figura 20 - Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

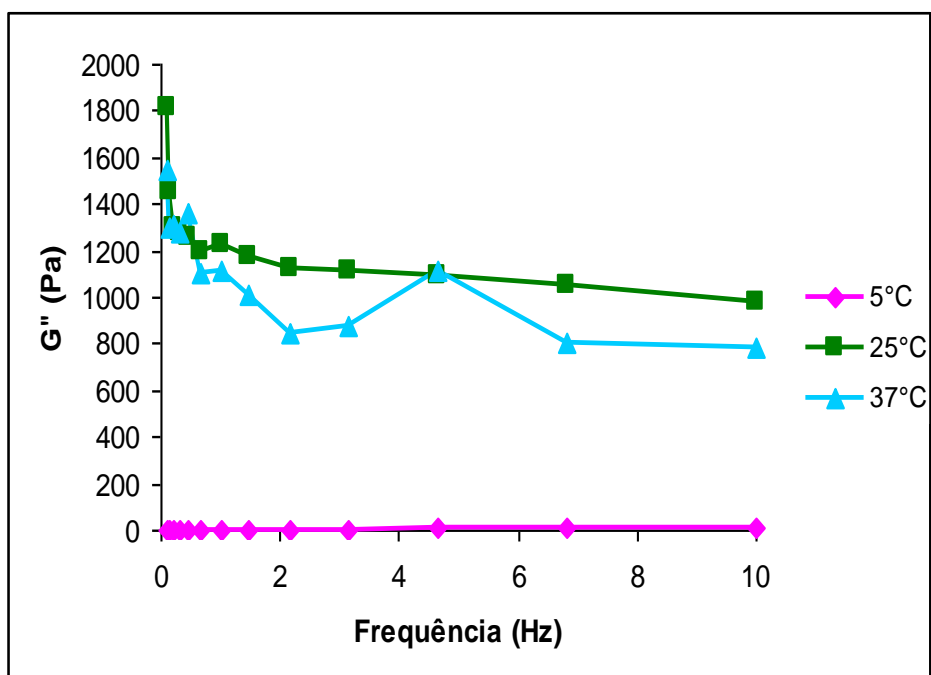
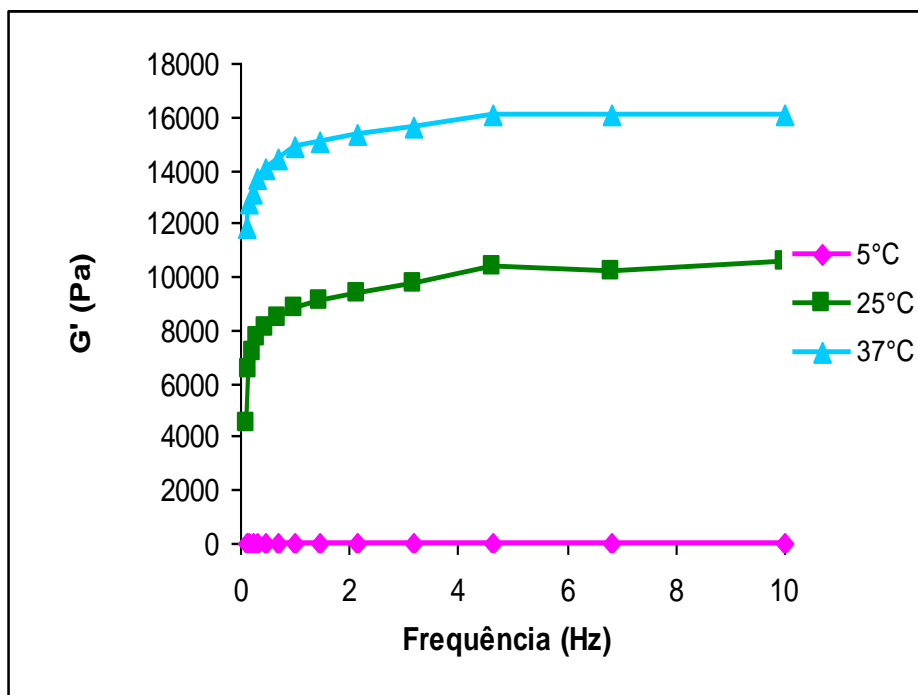
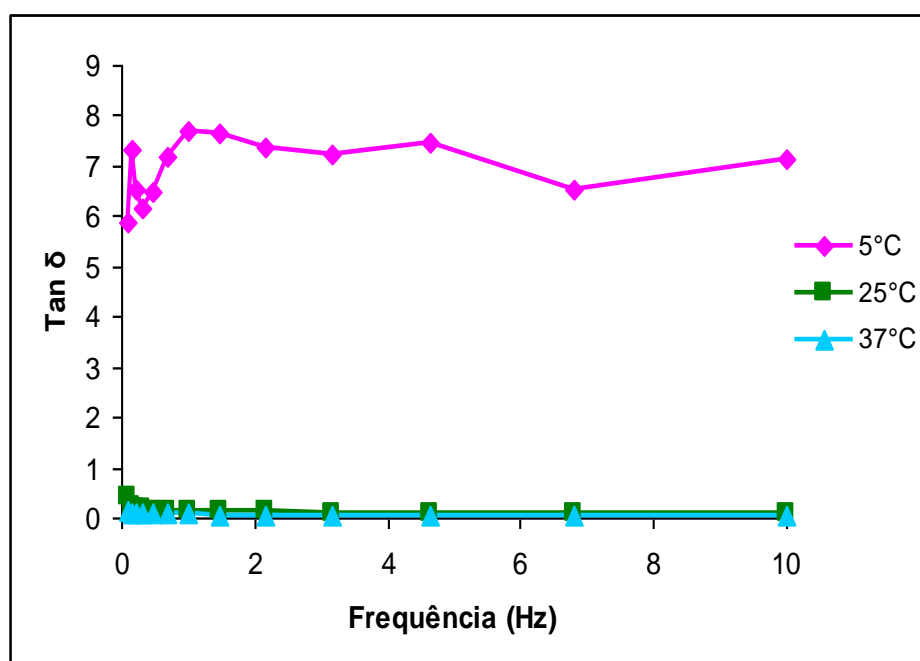
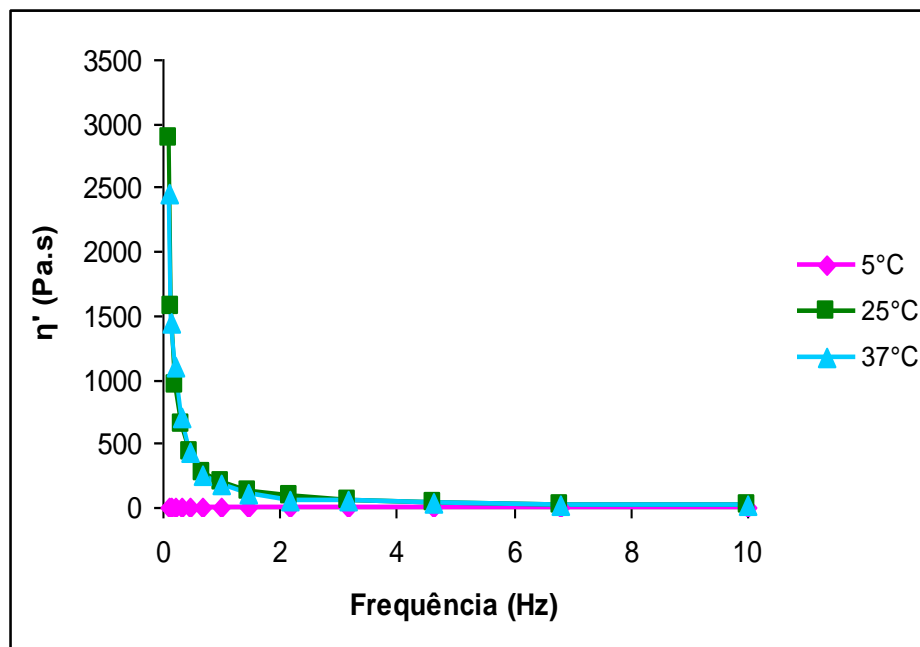


Figura 21 – Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-2 sem micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.



As propriedades viscoelásticas das formulações SMTS-1 e SMTS-2 foram dependentes da concentração polimérica, da temperatura e da frequência oscilatória. Aumentado a frequência significativamente diminuiu a viscosidade η' e aumento o módulo G' . O módulo G'' desses sistemas também foi significativamente aumentado com o aumento da frequência. Em altas frequências não houve diferença significativa na $\tan \delta$ de ambos os sistemas.

Aumentando a temperatura significativamente aumentou a viscosidade η' e o módulo G' de ambos os sistemas. Além disso, com o aumento da temperatura o módulo G'' do SMTS-1 aumentou significativamente, porém significativamente diminuído para o SMTS-2 a 37 °C. A $\tan \delta$ para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 também foi significativamente diminuída com o aumento da temperatura.

Os efeitos das concentrações poliméricas dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 também foram significantes. O aumento da concentração de P407 aumentou significativamente a viscosidade η' e os módulos G' e G'' . A $\tan \delta$ foi significativamente diminuída com o aumento da concentração de P407.

As propriedades viscoelásticas proporcionam informação a respeito da natureza estrutural da formulação e a resposta reológica a forças sub-destrutivas, propriedade estas que influenciam diretamente na performance de sistemas semissólidos (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009).

Comparando-se os dois sistemas, verificou-se que o sistema com maior concentração de P407 (SMTS-2) apresentou viscosidade η' e os módulos G' e G'' significativamente maior. Esse comportamento pode ser creditado diretamente ao aumento do emaranhado polimérico, que resulta em resistência aumentada à deformação polimérica (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Além disso, pode ser o resultado de uma forte associação do emaranhado de moléculas de P407 com as de C934P, devido à formação de ligações secundárias. Esse fenômeno físico foi previamente observado para sistemas compostos de poloxamer com ácido poliacrílico, principalmente via ligações de hidrogênio e interação iônica (BRUSCHI, 2006).

A viscosidade η' é comumente empregada para caracterizar a natureza viscosa de sistemas viscoelásticos (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; JONES et al., 2009). Nesse estudo, a viscosidade η' dos sistemas foi dependente da frequência oscilatória, de acordo com o modelo de Maxwell para a resposta de materiais viscoelásticos frente a tensões oscilatórias (BRUSCHI, 2006). Assim em

altos valores de frequência, as propriedades viscosas de cada formulação dominaram, enquanto, em baixos valores de frequência, a contribuição elástica para a resposta viscoelástica foi considerável. Com o aumento da frequência oscilatória, a magnitude da viscosidade η' diminuiu devido ao relativamente curto período de tempo disponível durante cada ciclo de oscilação para deformações viscosas (tempo dependentes). Além disso, o sistema SMTS-2 (maior concentração de P407) apresentou um aumento significativo na viscosidade η' comparado ao SMTS-1, refletindo os efeitos desses polímeros na viscosidade das formulações.

5.5.7 Determinação da temperatura de gelificação

A propriedade termossensível das formulações binárias foi avaliada pela temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 sem micropartículas de própolis^a.

Sistema	$T_{\text{sol/gel}}$ (°C)
SMTS-1	32,03 ± 0,54
SMTS-2	23,22 ± 0,28

^a Valores representam a média (± desvio padrão) de três replicatas.

Os dois sistemas SMTS-1 e SMTS-2 aumentaram significativamente a viscosidade η' com o aumento da temperatura, apresentando $T_{\text{sol/gel}}$. O valor do módulo G' dessas formulações foi baixo no estado de solução, mas aumentou significativamente no estado gel. Para ambos os sistemas, no final da transição sol/gel, o módulo G' apresenta-se independente ao longo de uma faixa variável de temperatura e, depois, diminui. A temperatura de transição das formulações diminuiu com o aumento da concentração de P407.

A $T_{\text{sol/gel}}$ corresponde à temperatura caracterizada por uma drástica mudança no comportamento reológico e no G' (CHANG et al., 2002; BRUSCHI, 2006). O módulo G' , uma medida da energia estocada e recuperada por ciclo de deformação, reflete o componente sólido do comportamento elástico (BRUSCHI, 2006). Antes do

ponto de gelificação, G' é baixo e a amostra é caracterizada como um líquido elástico. A partir do ponto de gelificação, ele aumenta e a amostra é caracterizada com gel (sólido viscoso). A última fase consiste de uma estabilização dos valores do módulo G' (BRUSCHI, 2006).

A $T_{\text{sol/gel}}$ das formulações demonstrou-se adequada, podendo garantir o comportamento de gel no interior da cavidade vaginal. Ambas as formulações contendo 15 e 20% (p/p) de P407 existiram na forma líquida em temperatura inferior a 20 °C e gelificaram na temperatura da cavidade vaginal (34 a 37 °C). As formulações apresentaram valores de $T_{\text{sol/gel}}$ na faixa de 23,22 a 32,03 °C, sendo que o sistema que apresentou valor maior que 25 °C foi aquele contendo 15% (p/p) de P407 (SMTS-1).

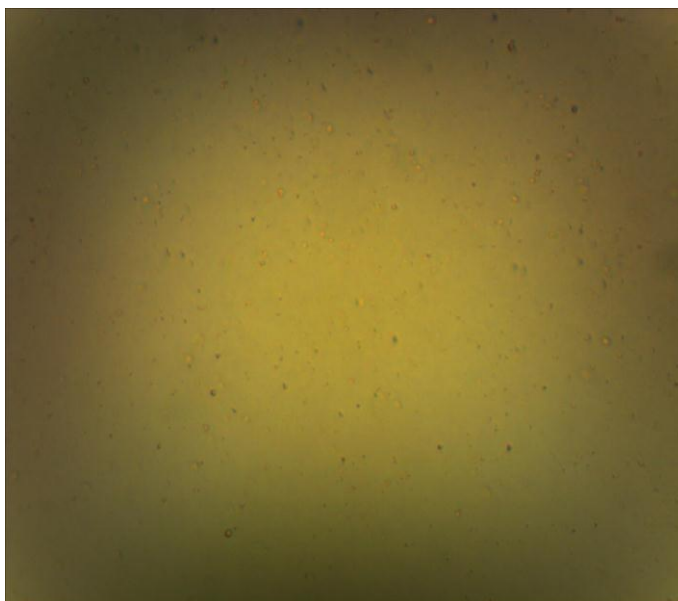
5.6 Preparação e caracterização do sistema semissólido termossensível contendo micropartículas de própolis

A partir dos resultados obtidos com as avaliações dos sistemas poliméricos binários, foram selecionadas a formulação contendo 15% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P e a formulação contendo 20% (p/p) de P407 com 0,15% (p/p) de C934P, para o desenvolvimento do sistema contendo micropartículas de própolis. Estes sistemas foram escolhidos por apresentarem os menores valores de temperatura de gelificação na avaliação preliminar dos sistemas que possuíam 15 e 20% de P407, garantindo assim uma temperatura de transição sol/gel na faixa de 21,83 a 28,17 °C, adequada para administração na cavidade vaginal.

5.6.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas de extrato de própolis preparadas na temperatura de 20 °C foi realizada por microscopia óptica com a captação de imagens, utilizando-se microscópio óptico Kozo Optics®. Segundo Bruschi (2006), há uma maior formação de micropartículas com pouca aglomeração quando estas são preparadas *in situ* à temperatura de 20 °C (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semissólido mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis SMTS-1



A preparação de micropartículas *in situ* de extrato de própolis nos sistemas utilizando temperatura de 20 °C, segundo Bruschi (2006) possibilitou a obtenção de maior quantidade com pouca agregação das mesmas, sendo, portanto escolhida na produção destas para esse trabalho.

Figura 23 - Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema mucoadesivo semissólido termossensível contendo micropartículas de própolis SMTS-2



5.6.2 Análise granulométrica

A análise de distribuição de tamanho de partículas de própolis nos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 foram realizados por microscopia óptica, utilizando-se, como parâmetro de medição, a medida do diâmetro segundo Feret.

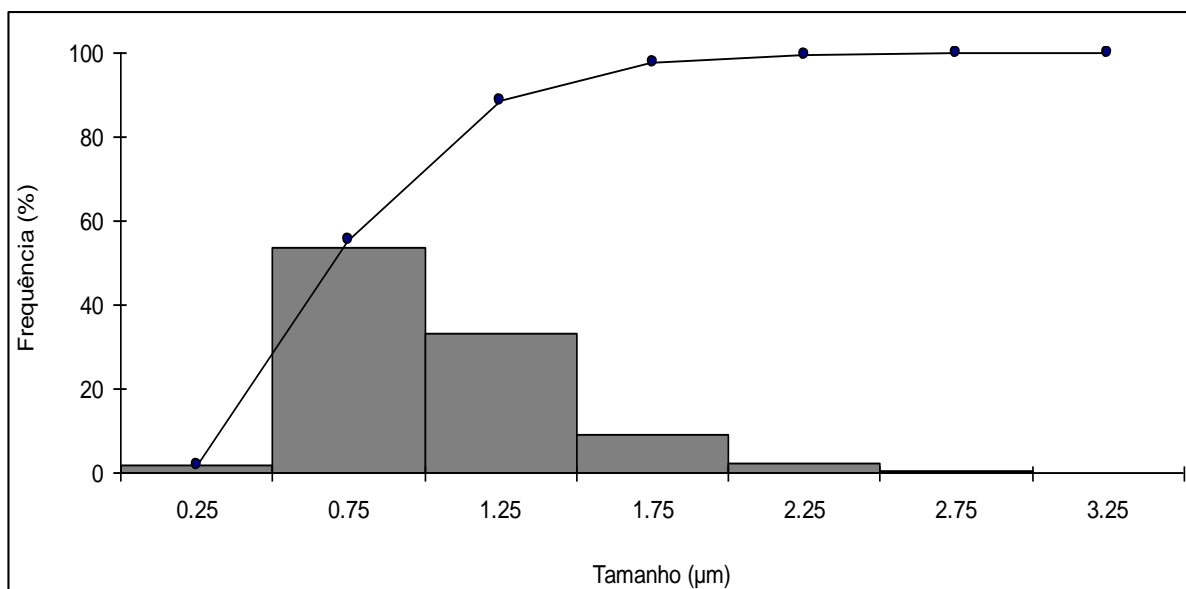
A Tabela 26 e a Figura 24 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas presentes no SMTS-1.

Tabela 26 – Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível SMTS-1

Classe (μm)	Ponto médio (μm)	Frequência	Frequência
			Relativa (%)
$0,0 < X \leq 0,5$	0,25	21	1,75
$0,5 < X \leq 1,0$	0,75	643	53,58
$1,0 < X \leq 1,5$	1,25	399	33,25
$1,5 < X \leq 2,0$	1,75	107	8,92
$2,0 < X \leq 2,5$	2,25	25	2,08
$2,5 < X \leq 3,0$	2,75	3	0,25
$3,0 < X \leq 3,5$	3,25	2	0,17
Total		1200	100,00

O diâmetro médio das partículas foi de $1,15 \pm 0,38 \mu\text{m}$, onde 53,58% das partículas apresentam tamanho entre 0,5 e $1,0 \mu\text{m}$.

Figura 24 - Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível SMTS-1: (■) histograma dos intervalos de classe e (-.-) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.



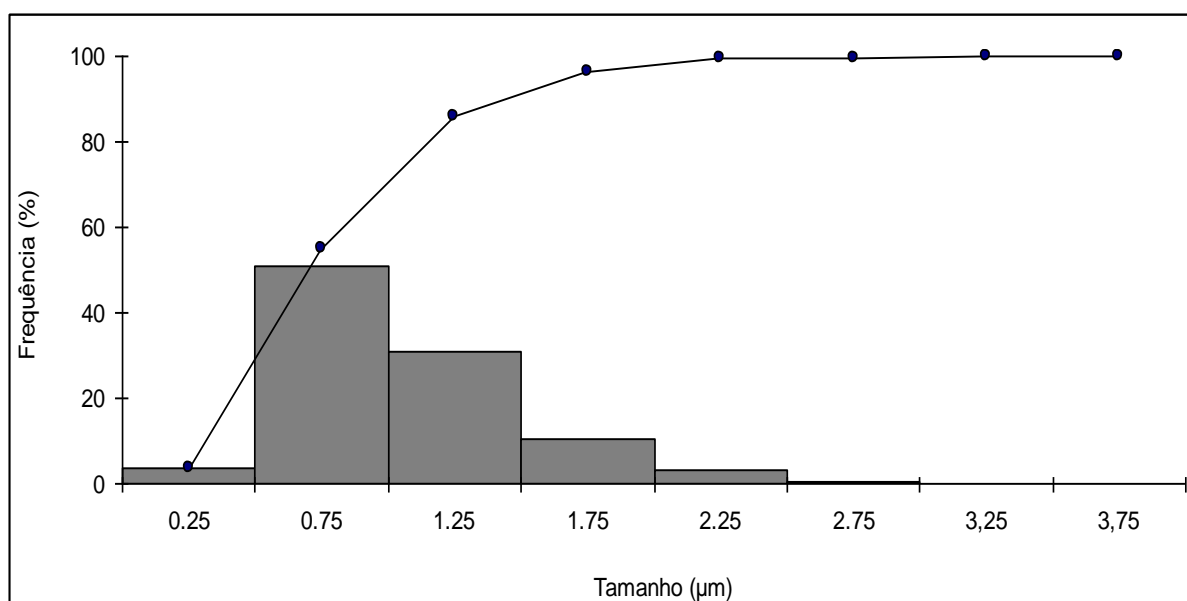
A Tabela 27 e a Figura 25 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas presentes no SMTS-2.

Tabela 27 - Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível SMTS-2.

Classe (µm)	Ponto médio (µm)	Frequência	
		Frequência	Relativa (%)
0,0 < X ≤ 0,5	0,25	45	3,75
0,5 < X ≤ 1,0	0,75	613	51,08
1,0 < X ≤ 1,5	1,25	371	30,92
1,5 < X ≤ 2,0	1,75	126	10,50
2,0 < X ≤ 2,5	2,25	38	3,17
2,5 < X ≤ 3,0	2,75	4	0,33
3,0 < X ≤ 3,5	3,25	2	0,17
3,5 < X ≤ 4,0	3,75	1	0,08
Total		1200	100,00

O diâmetro médio das partículas foi de $1,26 \pm 0,50 \mu\text{m}$, onde 51,08% das partículas apresentam tamanho entre 0,5 e $1,0 \mu\text{m}$. O sistema SMTS-2 apresentou distribuição ligeiramente maior ao que a do sistema SMTS-1 (Tabela 26), estando de acordo com o encontrado por Bruschi (2006) para o mesmo sistema polimérico.

Figura 25 - Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema mucoadesivo termossensível SMTS-2: (■) histograma dos intervalos de classe e (-.-) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.



A análise de distribuição de tamanho de partículas preparadas *in situ* nos sistemas demonstrou que as micropartículas formadas apresentaram diâmetro médio próximo de $1 \mu\text{m}$, apresentando pouca variação de tamanho, sendo que o SMTS-2 apresentou uma distribuição ligeiramente maior das micropartículas presentes no sistema. As diferentes viscosidades dos sistemas podem explicar essas diferenças entre as micropartículas dos sistemas. Por outro lado, a uniformidade do tamanho das partículas em cada formulação está relacionada com a agitação constante e as condições empregadas durante a preparação *in situ* (BRUSCHI, 2006).

5.6.3 Determinação do pH

Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis apresentaram pH levemente ácidos, sendo, portanto compatíveis com pH da mucosa vaginal.

Tabela 28 - pH dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis SMTS sem e com micropartículas de própolis^a

SMTS	Concentração (% p/p)		EPRP	pH
	P407	C934P		
15/0,20	15	0,20	4,0	5,83 ± 0,29
15/0,20	15	0,20	-	7,00 ± 0,00
15/0,25	15	0,25	4,0	6,00 ± 0,00
15/0,25	15	0,25	-	7,00 ± 0,00
20/0,10	20	0,10	4,0	7,00 ± 0,00
20/0,10	20	0,10	-	7,00 ± 0,00
20/0,15	20	0,15	4,0	6,00 ± 0,00
20/0,15	20	0,15	-	7,00 ± 0,00

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de pelo menos três replicatas

5.6.4 Determinação da densidade relativa

Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis apresentaram densidade relativa entre $1,0123 \pm 0,0003$ e $1,0197 \pm 0,0003$ conforme apresentado na tabela 29.

Tabela 29 - Densidade relativa dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis SMTS contendo micropartículas de própolis^a

SMTS	Concentração (% p/p)		EPRP	Densidade (g/mL)
	P407	C934P		
SMTS-1	15	0,25	4,0	1,0124 ± 0,0007
SMTS-2	20	0,15	4,0	1,0197 ± 0,0003

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de pelo menos três replicatas

Na avaliação de densidade, os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis apresentaram, assim como os sistemas sem micropartículas, valores muito próximos da densidade da água, sendo que com a adição do EPRP houve uma ligeira diminuição da densidade. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que ambos os sistemas sejam constituídos por cerca de 80% (p/p) de água, onde nota-se que o sistema SMTS-2, que possui uma

quantidade ligeiramente inferior de água (79,85%) em relação ao SMTS-1 (84,75%), apresentou valor de densidade ligeiramente maior.

5.6.5 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação

Os sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis foram avaliados previamente através de método mecânico para determinação da temperatura de transição sol-gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Temperatura de gelificação ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida por meio de método mecânico (preliminar) dos SMTS contendo micropartículas de própolis ^a

SMTS	Concentração (% p/p)		EPRP	$T_{\text{sol/gel}}$ (°C)
	P407	C934P		
SMTS-1	15	0,25	4,0	27,00 ± 0,00
SMTS-2	20	0,15	4,0	19,10 ± 0,17

^a Cada valor representa a média (± desvio padrão) de pelo menos três replicatas

Na avaliação preliminar da temperatura de gelificação dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 observou-se que a adição de micropartículas de própolis interferiu na $T_{\text{sol/gel}}$. Sabe-se que a transição sol/gel é induzida por um aumento na temperatura, embora seja dependente também da concentração de polímero e presença de sais e outros polímeros, com o aumento em suas concentrações, há um aumento da força do gel e uma diminuição da $T_{\text{sol/gel}}$ (EDSMAN; CARLFORS; PETERSSON, 1998; BRUSCHI, 2066). Com a incorporação do extrato etanólico de própolis, foi observada uma diminuição de 1,17 °C na $T_{\text{sol/gel}}$ do sistema SMTS-1 (4,15%) e de 2,73 °C na $T_{\text{sol/gel}}$ do sistema SMTS-2 (12,50%), o que não prejudica a administração na cavidade vaginal dos mesmos.

5.6.6 Análise do perfil de textura

As propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade, adesividade, elasticidade e coesividade) dos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis foram determinados por análise do perfil de textura e estão demonstradas na Tabela 31.

Tabela 31 - Propriedades mecânicas dos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis determinadas por análise de textura^a

Propriedades	Sistemas com micropartículas de EPRP			
	SMTS-1		SMTS-2	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
Dureza (N)	0,21 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,89 ± 0,03	0,95 ± 0,01
Compressibilidade (N.mm)	0,94 ± 0,03	1,28 ± 0,05	4,49 ± 0,14	4,79 ± 0,08
Adesividade (N.mm)	0,66 ± 0,05	1,03 ± 0,04	3,89 ± 0,16	4,19 ± 0,22
Elasticidade (mm)	14,61 ± 0,30	14,75 ± 0,20	14,87 ± 0,09	14,76 ± 0,18
Coabilidade (N.mm)	0,89 ± 0,02	0,90 ± 0,01	1,11 ± 0,05	1,09 ± 0,01

^a Valores representam a média (± desvio padrão) de seis replicatas.

A administração de sistemas semissólidos na cavidade vaginal requer a utilização de um aplicador vaginal, assim às propriedades mecânicas desses sistemas são fundamentais para o bom desempenho clínico dos mesmos (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). A análise do perfil de textura demonstrou que em todas as propriedades mecânicas avaliadas dureza, compressibilidade, adesividade, elasticidade e coabilidade houve uma diminuição não significativa com a adição de micropartículas de própolis nos sistemas, em relação aos respectivos sistemas sem o ativo.

5.6.7 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A adição de própolis nas formulações promoveu um aumento na força necessária para quebrar a ligação mucoadesiva com o disco de mucina dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 quando comparada aos mesmos sistemas sem o ativo.

Tabela 32 - Força mucoadesiva dos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis ^a

Sistema	EPRP (%. p/p)	Força (N)
SMTS-1	4,0	0,37 ± 0,02
SMTS-2	4,0	0,66 ± 0,03

^aValores representam a média (± desvio padrão) de cinco replicatas.

Embora os valores da adesividade tenham sido menores nos sistemas com micropartículas de própolis em comparação aos mesmos sem o ativo, estes apresentaram mucoadesividade a 37 °C, tendo, portanto suas propriedades mucoadesivas avaliadas. Em ambos os sistemas foram observados um aumento na força mucoadesiva com a adição de micropartículas de própolis, ao contrário do que ocorreu com a avaliação da adesividade. Podendo-se concluir que provavelmente os componetes do extrato de própolis interagiram com as cadeias poliméricas dos sistemas, aumento a habilidade das mesmas de interpenetrarem nas cadeias de mucina.

5.6.8 Análise reológica de cisalhamento contínuo

A incorporação de micropartículas de própolis nas formulações poliméricas binárias contendo P407 e C934P pode alterar o comportamento reológico das mesmas. Chang et al. (2002) observaram que diferenças na composição de géis mucoadesivos termossensíveis podem levar a alterações dramáticas no comportamento reológico. Nesse sentido, o estudo do comportamento de fluxo de sistemas SMTS pode prever a estabilidade física, o comportamento quando da administração, o espalhamento por todos os locais do interior da cavidade vaginal e a recuperação da estrutura dos mesmos após a administração (JONES; BROWN, WOOLFSON, 2001; BRUSCHI, 2006). Portanto, as propriedades reológicas dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis, desenvolvidos para administração vaginal, foram caracterizados por técnicas destrutivas (reometria de fluxo) e não-destrutivas (reometria oscilatória).

Na reometria de cisalhamento contínuo os sistemas contendo de micropartículas de própolis exibiram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com vários graus de valor de rendimento e área de histerese (Figuras 26 e 27). Tixotropia e valor de rendimento foram mais marcantes no SMTS-2 que possui uma maior concentração de P407. Além disso, com o aumento da temperatura, o sistema SMTS-1 apresentou pequena área de reopexia, principalmente nas temperaturas de 25 e 37°C.

Figura 26 - Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

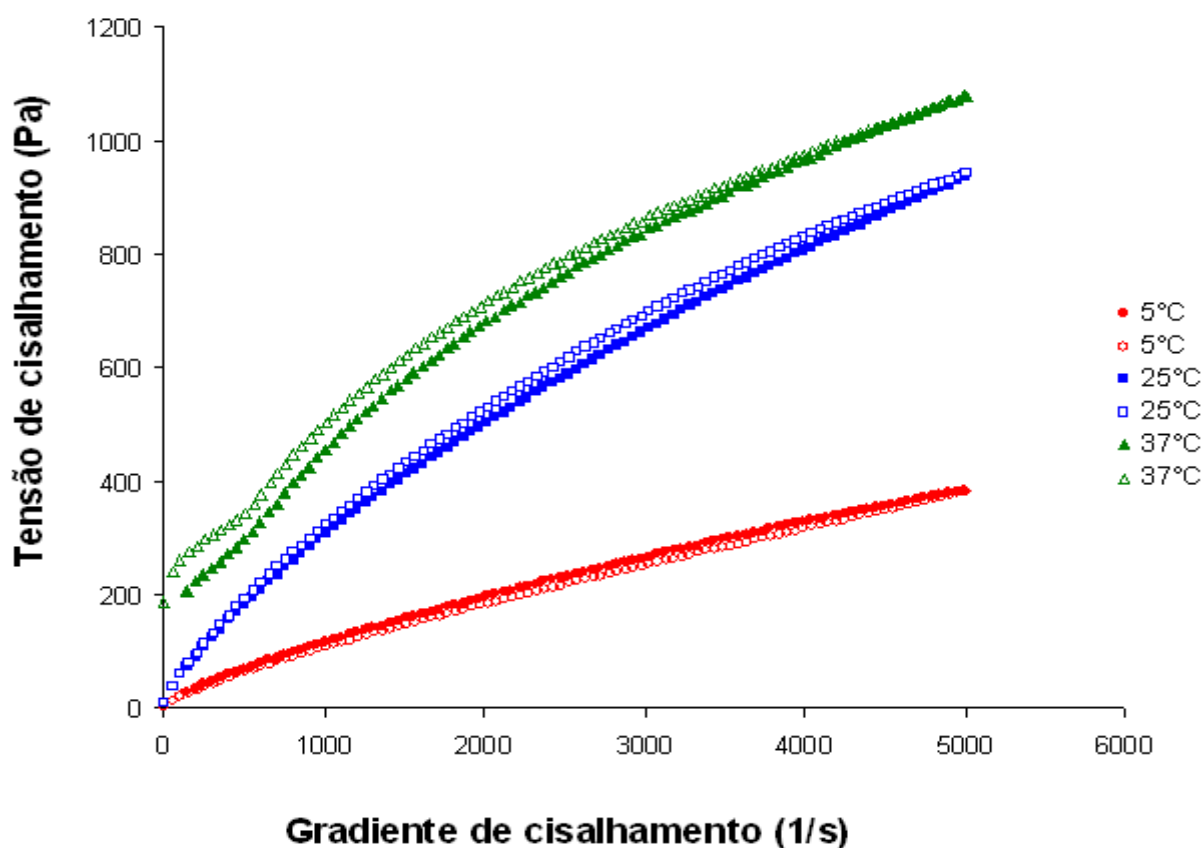
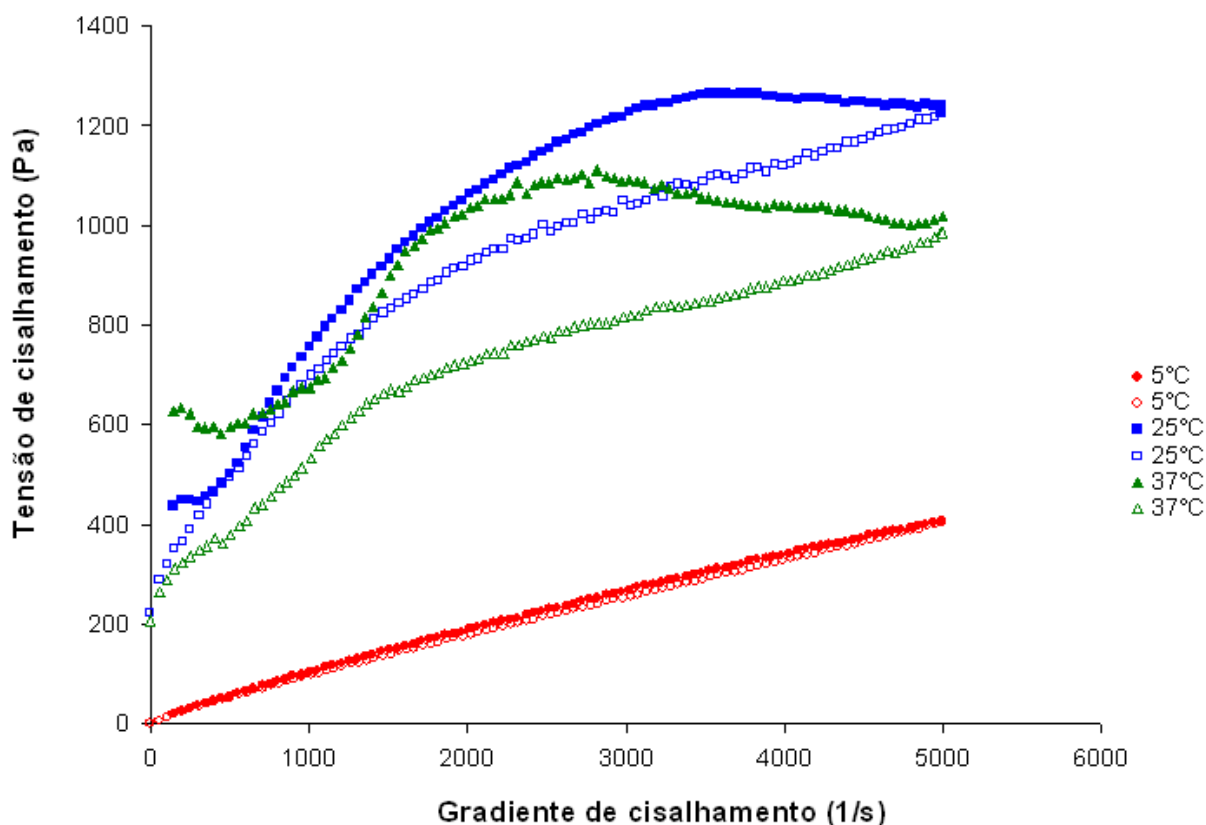


Figura 27 - Reogramas de fluxo dos sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.



Para possibilitar comparações estatísticas dos efeitos de cada componente polimérico nas propriedades de fluxo das formulações, a curva de ida e volta de cada reograma foi matematicamente definida por meio do modelo da Lei da Potência (BRUSCHI, 2006, JONES et al., 2009), do qual os índices k e η de cada formulação foram obtidos e estão apresentados nas Tabelas 33 e 34, respectivamente.

Tabela 33 - Valores obtidos para o índice de consistência (k) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis^a

Sistema	k (Pa.s)		
	5°C	25°C	37°C
SMTS-1	0,69 ± 0,02	1,89 ± 0,06	91,37 ± 4,67
SMTS-2	0,22 ± 0,00	102,04 ± 3,11	297,37 ± 10,79

^a Valores representam a média (\pm desvio padrão) de cinco replicatas.

O comportamento de cisalhamento contínuo de SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis foi influenciado pela temperatura e o conteúdo de P407 e de C934P. Houve um aumento significativo no índice k com o aumento da concentração polimérica e da temperatura. Além disso, o índice η foi diminuído significativamente com o aumento das temperaturas e não houve diferença significativa com o aumento da concentração polimérica.

Tabela 34 - Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (η) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis^a

Sistema	η (adimensional)		
	5°C	25°C	37°C
SMTS-1	0,74 ± 0,00	0,73 ± 0,00	0,29 ± 0,00
SMTS-2	0,89 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,02

^a Valores representam a média (\pm desvio padrão) de cinco replicatas.

A presença de extrato de própolis nos sistemas não aumentou significativamente os índices k e η . Não houve diferença significativa nos valores do índice k em relação a presença de micropartículas de própolis comparando-se os sistemas com e sem micropartículas. Assim como, não houve diferença significativa nos valores do índice η em relação a presença de micropartículas de própolis e concentração polimérica comparando-se os sistemas com e sem micropartículas.

Os resultados obtidos a partir da reometria de cisalhamento contínuo demonstraram que o comportamento de fluxo dos sistemas SMTS continuou sendo pseudoplástico, com de área de histerese e baixo valor de rendimento. O valor de rendimento aumentou principalmente a partir de 25 °C.

Na temperatura de 5 °C, os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 exibiram índices de consistência baixos (Tabela 33), existindo na forma líquida. Porém, nas temperaturas maiores (25 e 37 °C), eles exibiram índices de consistência maiores, existindo como uma forma sólida. Por outro lado, levando em consideração o gradiente de cisalhamento aproximada para a administração por meio de um aplicador vaginal (SCHRAMM, 1998), os valores de rendimento e de índice k observados para os dois sistemas não dificultam a administração (NORLING et al., 1992) e favorecem o espalhamento dos mesmos na cavidade vaginal.

Os valores de índice k obtidos, levando em consideração a temperatura e o gradiente de cisalhamento, estão de acordo com os relatados por Bruschi (2006) e contribuem para a manutenção dos géis no sítio de aplicação. O k dos sistemas não apresentou aumento significativo com a presença de micropartículas de própolis (Tabela 33). No entanto, na temperatura de 37 °C o k diminuiu nos sistemas SMTS-1 com micropartículas. Esses resultados e os observados para as áreas de histerese (Figuras 26 e 27) indicam a influência dos compostos do extrato de própolis e da concentração polimérica na viscosidade dos sistemas. Pode-se inferir que em temperaturas próximas de 37 °C a influência na queda de consistência dos componentes da própolis (resina, cera de abelhas, entre outros) foi maior no sistema.

5.6.9 Análise reológica oscilatória

Os efeitos da concentração polimérica e da temperatura nas propriedades oscilatórias (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis em seis frequências oscilatórias representativas foram avaliadas e estão apresentadas nas Figuras 28 a 31.

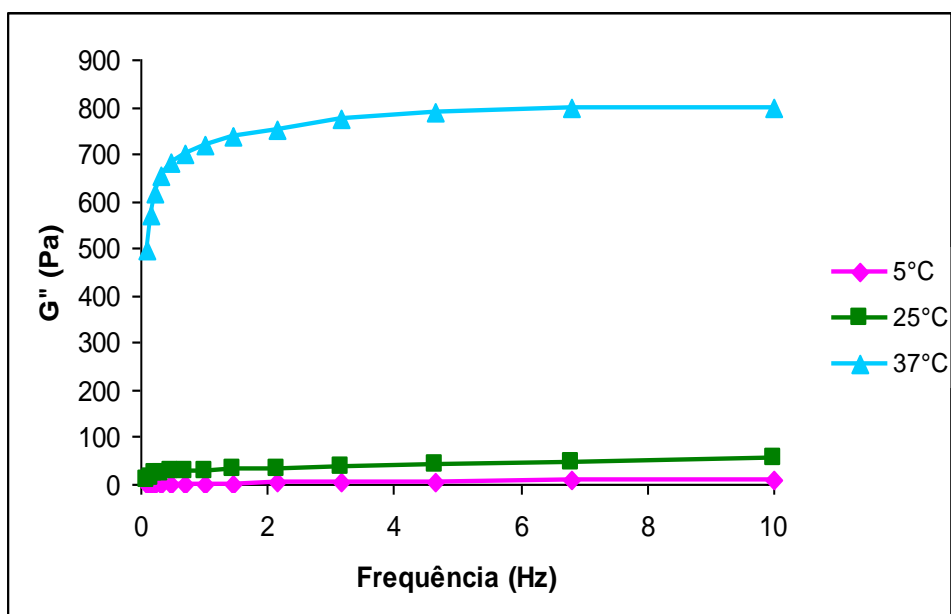
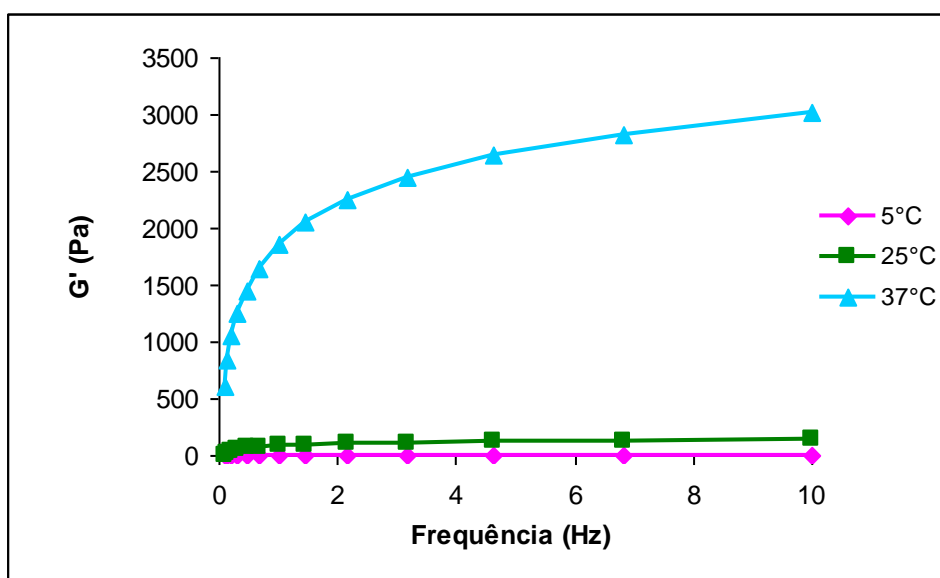
As propriedades viscoelásticas das formulações SMTS-1 e SMTS-2 foram dependentes da concentração polimérica, da temperatura, da presença de micropartículas de própolis e da frequência oscilatória. Aumentado a frequência significativamente diminuiu a viscosidade η' e aumentou o módulo G' . O módulo G'' desses sistemas também foi significativamente aumentado com o aumento da frequência. Em altas frequências não houve diferença significativa na $\tan \delta$ de ambos os sistemas.

Os efeitos das concentrações poliméricas dos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 também foram significantes. O aumento da concentração de P407 aumentou significativamente a viscosidade η' e os módulos G' e G'' . A $\tan \delta$ foi significativamente diminuída com o aumento da concentração de P407.

Aumentando-se a temperatura significativamente aumentaram a viscosidade η' e o módulo G' de ambos os sistemas. Além disso, com o aumento da temperatura o módulo G'' do SMTS-1 aumentou significativamente, porém significativamente diminuído para o SMTS-2 a 37 °C. A $\tan \delta$ para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis também foi significativamente diminuída com o aumento da temperatura.

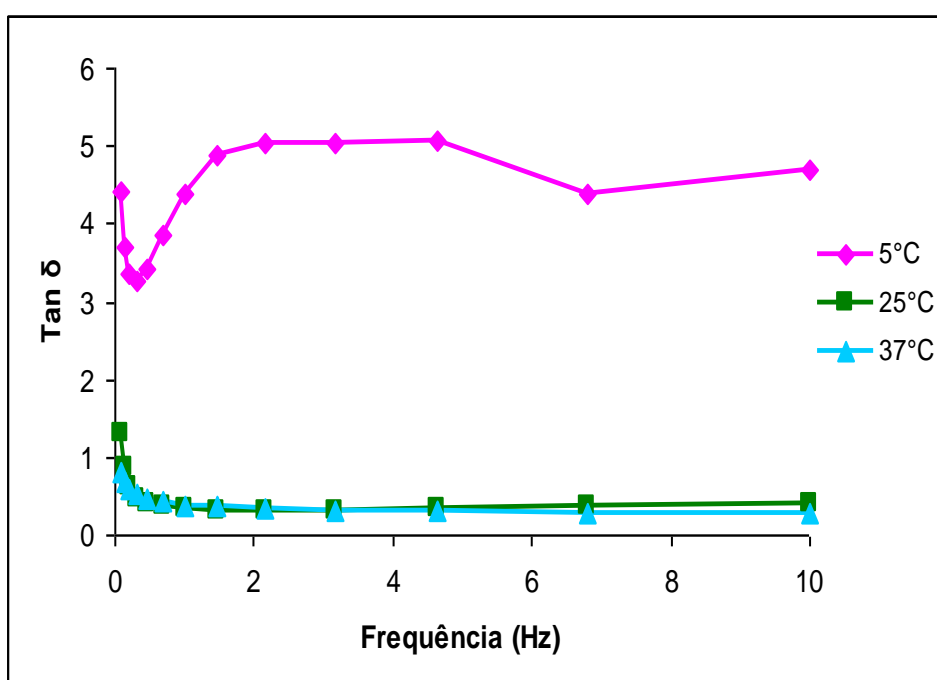
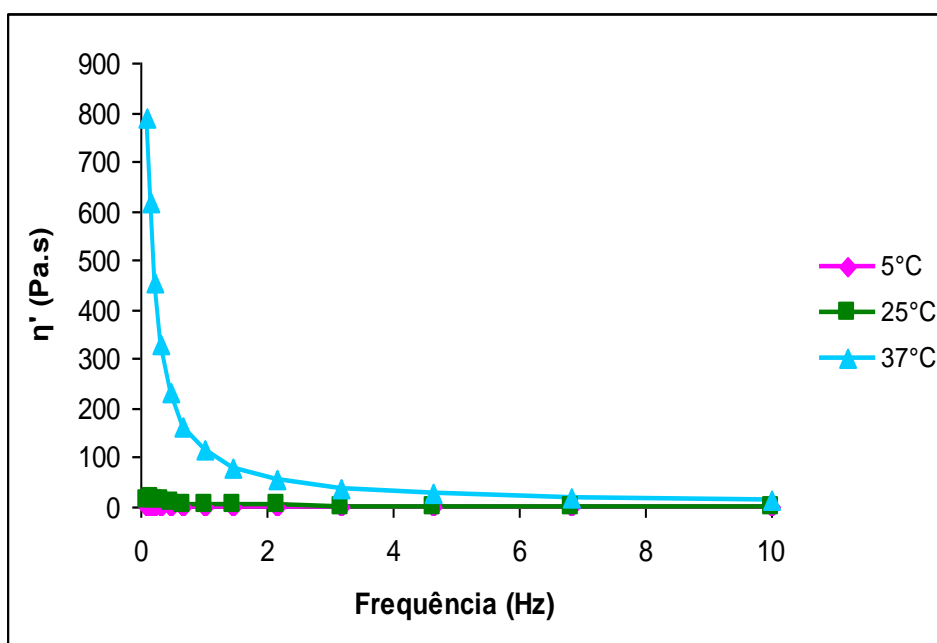
A presença de micropartículas de própolis nos sistemas aumentou significativamente os módulos G' e G'' e a viscosidade η' , mas diminuiu significativamente a $\tan \delta$, dos sistemas nas temperaturas de 25 e 37 °C. Em contraste, na temperatura de 5 °C, a presença de própolis diminuiu significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' , mas aumentou significativamente a $\tan \delta$.

Figuras 28 - Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

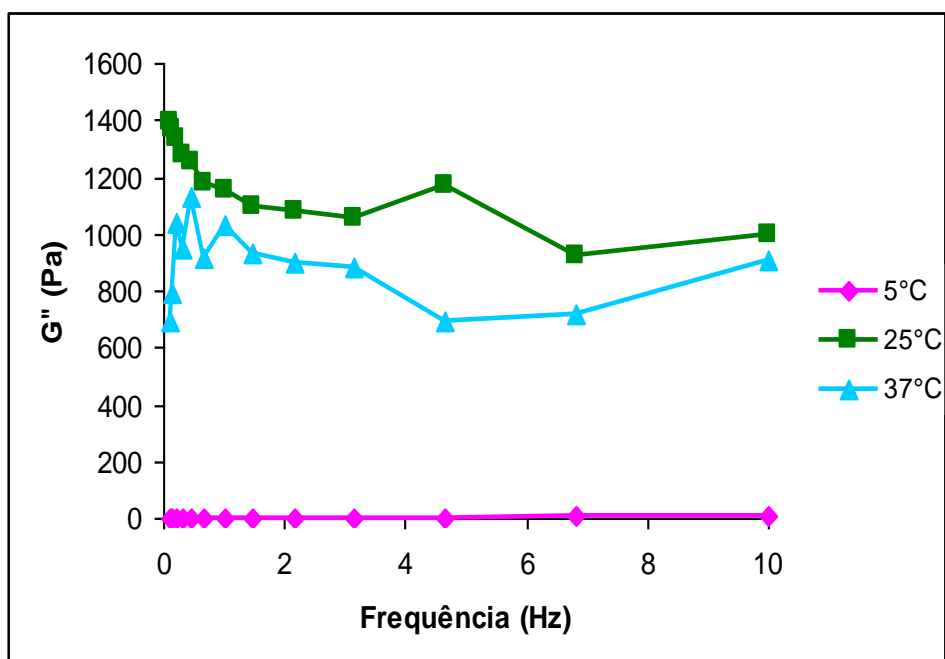
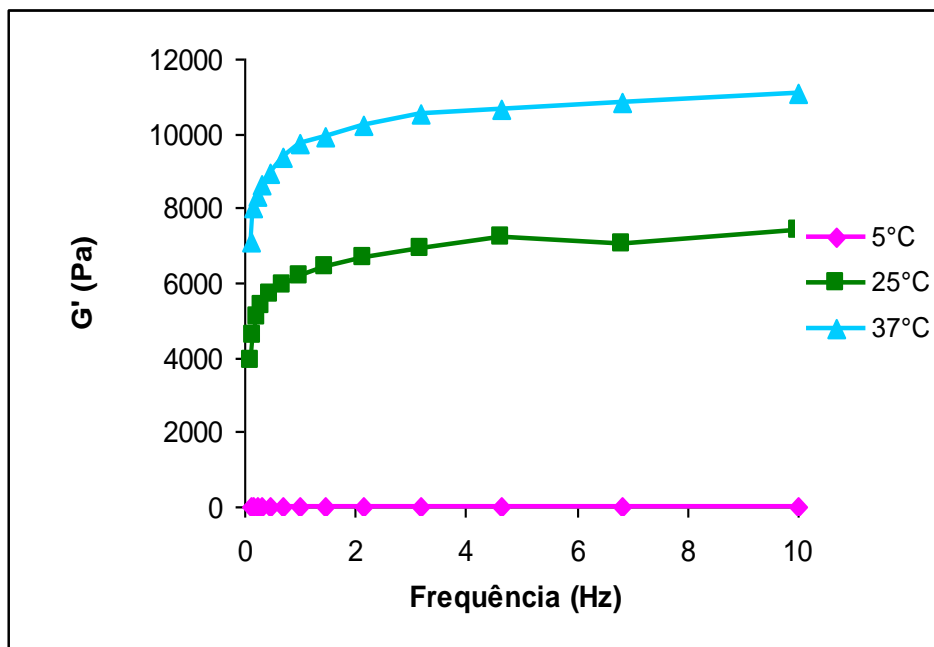


Na temperatura de 5 °C, e em todas as frequências, o módulo G'' dos sistemas excedeu o módulo G' . Em contraste, nas temperaturas de 25 e 37 °C, a $\tan \delta$ foi menor que um através de toda a faixa de frequência utilizada.

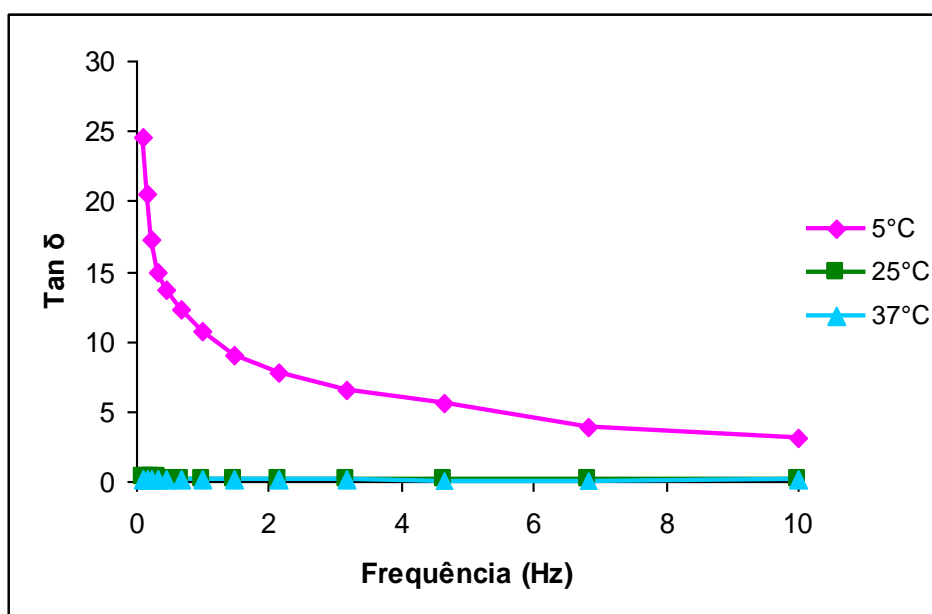
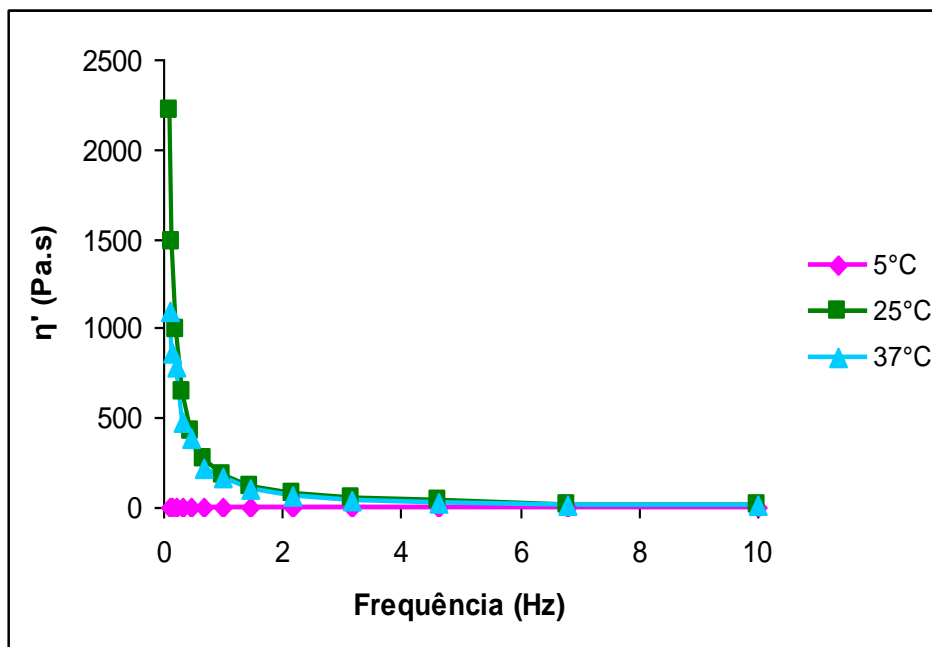
Figuras 29 – Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-1 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.



Figuras 30 - Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência para os sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.



Figuras 31 – Viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) em função da frequência para os sistemas SMTS-2 contendo micropartículas de própolis nas diferentes temperaturas de 5, 25 e 37°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.



Por meio da análise oscilatória, foi observado que a presença de micropartículas de própolis aumentou os módulos G' e G'' e a viscosidade η' , nas temperaturas de 25 e 37 °C, com o aumento resultante da resistência à deformação. Além disso, somente na temperatura de 5 °C os sistemas SMTS apresentaram características elastoviscosas ($G'' > G'$). Por outro lado, em todas as outras condições, o G' excedeu o G'' sobre toda a faixa de frequência aplicada, sendo os sistemas descritos como viscoelásticos (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Considerando a proposta de utilização clínica desses sistemas, a elasticidade dos mesmos na temperaturas de 25 e 37 °C é importante para assegurar resistência a deformação, proporcionando uma boa retenção dentro da cavidade vaginal (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; BRUSCHI, 2006).

Nas temperaturas de 25 e 37 °C, a viscosidade η' foi dependente da frequência oscilatória para os dois sistemas, concordando com as respectivas formulações sem micropartículas de própolis e com o modelo de Maxwell para a resposta de materiais viscoelásticos frente a tensões oscilatórias (BRUSCHI, 2006; JONES et al., 2009). Além disso, nessas mesmas temperaturas, a viscosidade η' foi aumentada com o aumento da concentração de P407 ou com a presença de micropartículas de própolis, indicando, mais uma vez, a influência destes na viscosidade dos sistemas.

5.6.10 Determinação da temperatura de gelificação

A propriedade termossensível dos sistemas com micropartículas de própolis foi avaliada pela temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 - Temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida para os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis^a.

Sistema	$T_{\text{sol/gel}}$ (°C)	
	Método preliminar	Método reológico
SMTS-1	27,00 ± 0,00	32,35 ± 0,04
SMTS-2	19,10 ± 0,17	24,04 ± 0,62

^a Valores representam a média (± desvio padrão) de três replicatas.

A adição das micropartículas de própolis interferiu na $T_{\text{sol/gel}}$ dos sistemas SMTS (Tabela 35). A transição sol/gel é induzida por um aumento na temperatura, mas depende da concentração de polímero e presença de aditivos tais como sais e outros polímeros. O aumento da concentração destes proporciona um aumento da força do gel e pode proporcionar uma diminuição da $T_{\text{sol/gel}}$ (EDSMAN et al., 1998). Entretanto, com a incorporação do extrato etanólico de própolis, foi observado um pequeno aumento de 0,32 °C na $T_{\text{sol/gel}}$ do sistema SMTS-1 e de 0,82 °C na $T_{\text{sol/gel}}$ do sistema SMTS-2. Choi et al. (1999) relataram que o etanol aumenta $T_{\text{sol/gel}}$ de dispersões aquosas de P407. Considerando o sensível aumento da $T_{\text{sol/gel}}$ pode se concluir que o etanol influenciou na temperatura de transição sol/gel dos sistemas.

5.6.11 Determinação do teor de própolis

Os resultados obtidos para a determinação do teor de própolis nos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis estão descritos na Tabela 31.

Tabela 36 - Resultados do teor de própolis nos sistemas mucoadesivos termossensíveis SMTS-1 e SMTS-2 contendo micropartículas de própolis por quantificação teor de polifenóis totais^a

	Teor (média ± s)	
	SMTS-1	SMTS-2
Teor de polifenóis totais em gramas por 100 mL de gel (%)	0,0114 ± 0,0002	0,0077 ± 0,0002
Teor de polifenóis totais em gramas por 100 g de gel (%)	0,0115 ± 0,0002	0,0076 ± 0,0002
Teor de polifenóis totais em gramas por 100g de extrato (%)	0,2840 ± 0,0047	0,1889 ± 0,0038
Teor de polifenóis totais em gramas por 100 ml de extrato (%)	0,2476 ± 0,0041	0,1646 ± 0,0033

^aValores representam a média (± desvio padrão) de seis replicatas.

O teor de própolis, obtido por meio da quantificação em polifenóis totais, nos sistemas SMTS-1 e SMTS-2 apresentaram valores adequados, sendo que o sistema SMTS-2 apresentou um teor menor de própolis do que SMTS-1, isso provavelmente

é devido a alguma interação polímero-reagente durante a complexação que diminui a quantidade de polifenóis livres, o que explica o menor teor encontrado para esse sistema que possui uma maior concentração polimérica.

5.6.12 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da própolis a partir das preparações

O perfil de liberação do extrato etanólico de própolis disperso 4% (V/V) em água e dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis SMTS-1 e SMTS-2 em função do tempo está apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Perfil de liberação a partir da dispersão 4% (V/V) do extrato e dos sistemas semissólidos mucoadesivos termossensíveis contendo micropartículas de própolis SMTS-1 e SMTS-2.

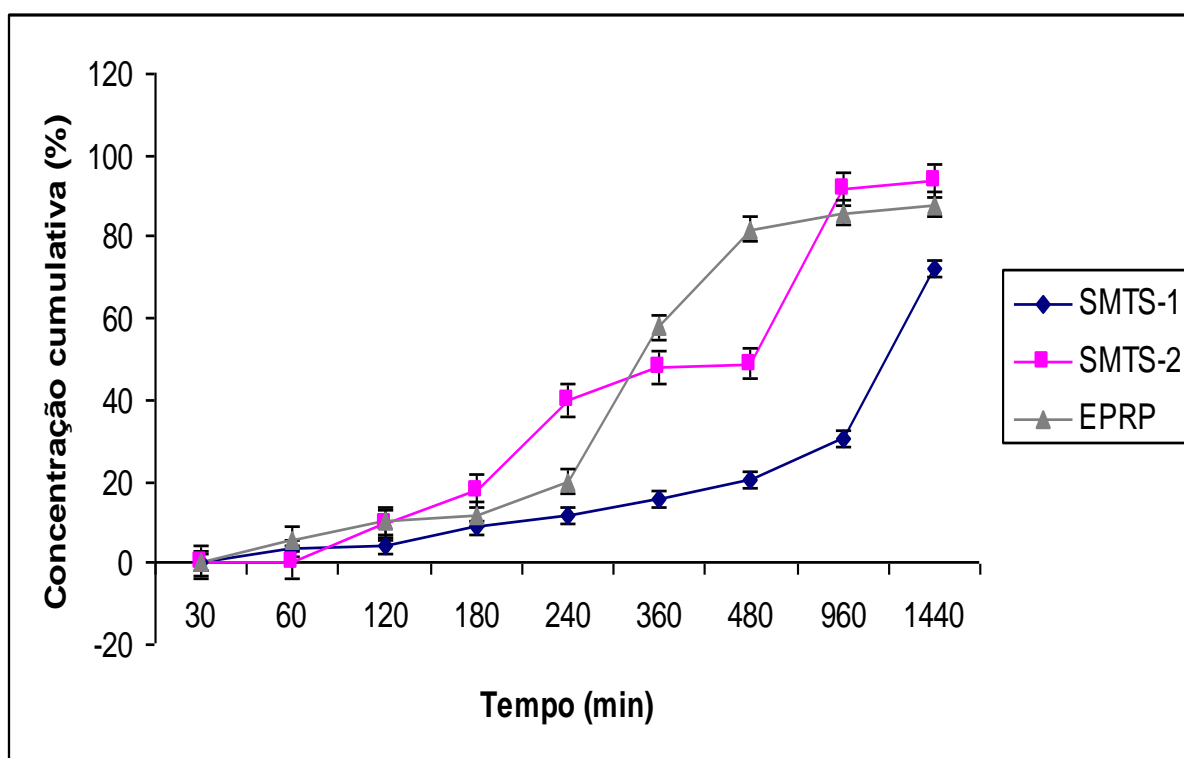


Tabela 37 - Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação *in vitro* a partir dos sistemas com micropartículas

Sistemas	Parâmetros (média ± s)		
	n	K (min ⁻ⁿ)	r ²
SMTS-1	0,9327 ± 0,0119	0,0649 ± 0,0054	0,9696 ± 0,0027
SMTS-2	0,8726 ± 0,0111	0,2177 ± 0,0172	0,8812 ± 0,0058

Os tempos requeridos para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir de cada sistema foram calculados e comparados. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 - Tempo necessário para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir dos sistemas com micropartículas^a

Sistemas	Tempo (min)		
	10%	30%	50%
SMTS-1	43,24 ± 0,72	242,97 ± 5,25	542,13 ± 12,99
SMTS-2	234,29 ± 3,75	699,91 ± 8,40	1164,25 ± 12,21

^aValores representam a média (± desvio padrão) de seis replicatas.

Os testes *in vitro* fornecem condições apropriadas para a realização de medidas de liberação reproduzíveis e precisas, importantes para distinguir diferentes formulações com o mesmo fármaco, a mesma formulação após o envelhecimento ou mudança de processo, como também durante o processo de produção. Quando estes são realizados de maneira adequada, podem ser utilizados no monitoramento das etapas de fabricação durante a fase de desenvolvimento e otimização de formulações, e após a aprovação do produto, além de prever o comportamento do sistema *in vivo* e diminuir o risco de falta de bioequivalência entre lotes do mesmo (BRUSCHI, 2006). Entretanto, esses testes não substituem a necessidade de trabalho clínico, mas podem localizar com precisão, durante o desenvolvimento da formulação, os fatores que determinam a cinética de liberação do fármaco (BRUSCHI, 2006). Nesse contexto, foi realizado o teste de liberação *in vitro* para as preparações contendo própolis.

A forma comumente encontrada na terapêutica para utilização de extrato de própolis é sua dispersão 4% (V/V) (PAMPLONA, 1997; BURDOCK, 1998; FRANCO, 2001; BRUSCHI, 2006).

Para o desenvolvimento de um sistema de liberação para administração vaginal, a avaliação do perfil de liberação *in vitro* é uma etapa fundamental (BRUSCHI, 2006), sendo que o sucesso do método é atingido quando as condições experimentais, como temperatura e agitação ou fluxo, são adequadas, simulando ao máximo as condições *in vivo* (BRUSCHI, 2006).

Os sistemas de liberação utilizando células de difusão de Franz modificadas é uma variação dos métodos de dissolução que não usa cesta nem pá. O perfil de liberação é obtido pela coleta de solvente por meio de um canal de comunicação e o monitoramento contínuo de concentração liberada de fármaco. O resultado concentração-tempo é dependente do volume do solvente, da temperatura e agitação ou fluxo e da membrana de acetato de celulose, buscando mimetizar a mucosa vaginal, que limita a concentração de ativo liberado. Portanto, os sistemas foram avaliados *in vitro* quanto à liberação do extrato de própolis em células de difusão de Franz modificadas para avaliação de preparações semissólidas, com agitação e temperatura controlados, simulando o máximo possível as condições no interior da cavidade vaginal.

As preparações SMTS-1 e SMTS-2 apresentaram liberação prolongada (Figura 32) com perfis diferentes, onde o sistema SMTS-1 apresentou liberação mais lenta (71,96%) quando comparado a liberação total do SMTS-2 (93,92%) em 24 horas. Dessa forma, pode-se inferir que a variação da concentração polimérica e do teor de água influenciou no perfil de liberação das formulações.

O mecanismo de liberação de própolis a partir dos sistemas foi investigado por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983; BRUSCHI, 2006), utilizando transformações logarítmicas e análise dos quadrados. Nesse contexto, $n = 0,5$ indica liberação controlada por difusão fickiana (HIGUCHI, 1963; BRUSCHI, 2006) e $n = 1$ indica uma liberação controlada puramente pelo relaxamento das cadeias poliméricas (transporte Caso II). Os valores intermediários entre 0,5 e 1, indicam um comportamento anômalo (cinética não fickiana correspondente aos fenômenos de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987;

BRUSCHI, 2006). Eventualmente verificam-se valores de $n > 1$ que estão relacionados com cinéticas do tipo Super Caso II (BRUSCHI, 2006).

Os valores de n para o sistemas SMTS-1 (Tabela 37) foi muito próximo de 1, indicando um comportamento muito próximo da cinética de primeira ordem, o que concorda com a composição da matriz que é constituída por 98,36% de P407 e apenas 1,64% de C934P. A associação de P407 e C934P é um processo endotérmico que ocorre para um ganho de entropia quando a interação entre os polímeros permite a restauração da estrutura de ligações de hidrogênio livres de água, reestruturando o processo de micelização (BRUSCHI, 2006). Portanto, o C934P não teve grande influência na cinética de liberação dos polifenóis a partir do sistema semissólido SMTS-1.

A associação de P407 com outros polímeros tem também apresentado que a liberação de fármaco a partir dessas matrizes pode seguir a cinética de raiz quadrada do tempo, onde $n = 5$ (BRUSCHI, 2006). Para o sistema SMTS-2 foi obtido um n com valor intermediário entre 0,5 e 1, indicando um comportamento anômalo (RITGER; PEPPAS, 1987; BRUSCHI, 2006) com a cinética de liberação dos polifenóis totais sendo governada pela difusão através da matriz e pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Assim, pode ser observado que a maior concentração de P407 no sistema SMTS-2 alterou o modelo da cinética de liberação.

Adicionalmente, foi verificado que houve diferença entre os tempos requeridos para liberar 10, 30 ou 50% de própolis a partir dos sistemas. O sistema SMTS-1 exibiu liberação mais lenta em relação ao sistema SMTS-2, principalmente no tempo requerido para liberar 50% do teor original de própolis. A Figura 32 ilustra o perfil de liberação dos polifenóis totais expresso em massa por volume de meio coletado em cada amostragem.

5.6.13 Avaliação antifúngica *in vitro* dos sistemas mucoadesivos termossensível contendo micropartículas de própolis

5.6.13.1 Determinação da CIM e CFM dos sistemas contendo própolis

A CIM do SMTS foi determinada frente a 21 leveduras, as quais apresentaram condições de cultivos compatíveis com as exigências para a execução do teste. A CIM para SMTS-1 em todas as leveduras testadas foi a mesma de 46,02 mg/mL.

Para SMTS-2 a CIM foi de 50,99 mg/mL para todas as leveduras testadas. Os resultados obtidos para os controles positivo, negativo e SMTS sem micropartículas controlaram os ensaios e asseguraram a eficácia do experimento.

A partir do teste para determinação da CIM realizou-se o teste para determinação da CFM para comprovação da atividade fungicida. O teste da CFM apresentou os mesmos valores encontrados para CIM concordando, portanto com o teste anterior (Tabelas 39 e 40). A partir desse resultado foi calculado a CFM em polifenóis totais (principal grupo responsável pela atividade antifúngica da própolis).

A CFM para SMTS-1 foi de 5,23 mg/mL em polifenóis totais para todas as leveduras tanto as cepas de referência, como também os isolados clínicos (Tabela 39). Assim como para o SMTS-2 que apresentou uma CFM de 3,85 mg/mL em polifenóis totais para todas as leveduras tanto as cepas de referência, como também os isolados clínicos (Tabela 40).

Portanto, os sistemas SMTS-1 e SMTS-2 apresentaram atividade antifúngica *in vitro*, apresentando-se como um potencial tratamento para CVV e CVVR.

Tabela 39 - Concentração fungicida mínima (CFM) do SMTS-1 contendo micropartículas de própolis

Micro-organismo	Número de leveduras	CFM mg. mL ⁻¹	CFM em Polifenóis totais µg. mL ⁻¹
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	2	46,02	5,23
<i>Candida albicans</i> CVV	3	46,02	5,23
<i>Candida albicans</i> CVVR	3	46,02	5,23
<i>Candida albicans</i> ASS	3	46,02	5,23
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	1	46,02	5,23
<i>Candida glabrata</i>	3	46,02	5,23
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	46,02	5,23
<i>Candida parapsilosis</i>	1	46,02	5,23
<i>Candida tropicalis</i>	2	46,02	5,23
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	46,02	5,23
Total	21		

Tabela 40 - Concentração fungicida mínima (CFM) do SMTS-2 contendo micropartículas de própolis

Micro-organismo	Número de leveduras	CFM mg. mL ⁻¹	CFM em Polifenóis totais µg. mL ⁻¹
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	2	50,99	3,85
<i>Candida albicans</i> CVV	3	50,99	3,85
<i>Candida albicans</i> CVVR	3	50,99	3,85
<i>Candida albicans</i> ASS	3	50,99	3,85
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	1	50,99	3,85
<i>Candida glabrata</i>	3	50,99	3,85
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	50,99	3,85
<i>Candida parapsilosis</i>	1	50,99	3,85
<i>Candida tropicalis</i>	2	50,99	3,85
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	50,99	3,85
Total	21		

6. CONCLUSÕES

- ✓ A amostra de própolis apresentou boa qualidade, com características semelhantes às de outras coletadas na mesma região.
- ✓ O extrato produzido apresentou qualidade e se mostrou adequado para utilização na produção de micropartículas *in situ* nos sistemas.
- ✓ A validação das metodologias analíticas para flavonóides totais e polifenóis totais demonstrou que as metodologias apresentaram linearidade, precisão e exatidão para as concentrações utilizadas, confirmando que os métodos são válidos.
- ✓ O extrato etanólico de própolis 30% (p/p) demonstrou atividade antifúngica *in vitro* tanto em relação às cepas de referência quanto em relação aos diversos isolados clínicos de pacientes com candidíase vulvovaginal, candidíase vulvovaginal recorrente e assintomáticas.
- ✓ Desenvolveu-se um sistema semissólido mucoadesivo termossensível para liberação de micropartículas de própolis.
- ✓ O sistema mucoadesivo termossensível, formado pelo polímero termossensível poloxamer 407 e pelo polímero mucoadesivo Carbopol 934P[®], possibilitou a preparação de micropartículas de própolis *in situ*. Além disso, os dois sistemas, com diferentes proporções dos polímeros, apresentaram temperatura de gelificação, comportamento reológico e mecânico, de mucoadesão e teor de própolis adequadas para a liberação na cavidade vaginal.
- ✓ Os sistemas contendo micropartículas de própolis apresentaram atividade antifúngica *in vitro* tanto em relação as cepas de referência quanto em relação aos diversos isolados clínicos de pacientes com candidíase vulvovaginal, candidíase vulvovaginal recorrente e assintomáticas.
- ✓ A determinação do perfil de liberação *in vitro* a partir dos sistemas desenvolvidos demonstrou que a própolis pode ser liberada de forma controlada por um período de no mínimo 24 horas na mucosa vaginal.

REFERÊNCIAS

ACQUARONE, M.; BLASI, N.; CASELLA, M.; CIANGHEROTTI, F.; CONFORTI, M.; CORRADINI, E.; DELLA SALA, M.R.; MANNU, L.; SBRIGNADELLO, C.; SENATORI, R.; STIGLIANO, C.M. Efficacy and tolerability of a 0.25% chlorhexidine-based vaginal gel (Clomirex[®]) in non-pregnant women with bacterial vaginosis. Results of a multicenter, open-label trial. **Eur. Bull. Drug Res.**, v.16(1), 1-4, 2008.

AHMAD, F.J.; ALAM, M.A.; KHAN, Z.I.; KHAR, R.K.; ALI, M. Development and *in vitro* evaluation of an acid buffering bioadhesive vaginal gel for mixed vaginal infections. **Acta Pharm.**, v. 58, 407-419, 2008.

AHUJA, A.; KHAR, R.K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.23(5), 489-515, 1997.

ALAM, M.A.; AHMAD, F.J.; KHAN, Z.I.; KHAR, R.K.; ALI, M. Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.8 (4), Article 109, 2007.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N. DI SABATINO, M.; VITALI, B.; BRIGIDI, P.; RODRIGUEZ, L. Polymer–lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 36, 591–601, 2009.

ALMEIDA F., G.L.; PASSOS, M.R.L.; GOUVÊA, T.V.D. Candidíase. *In*: PASSOS, M.R.L. **Doenças sexualmente transmissíveis**. 4.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1995.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43(5), p. 319-327, 2007.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T.P.; JONES, D.S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, n.3, p.505-518, 2009.

ANSEL, H.C. **Farmacotécnica. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6.ed. São Paulo: Premier, 2000.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.

BACHHAV, Y.; PATRAVALE, V.B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 365, 175-179, 2009.

BALOGLU, E.; SENYIGIT, Z.A.; KARAVANA, S.Y.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Strategies to prolong the intravaginal residence time of drug delivery systems. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.12(3): 312-336, 2009.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2, 29-32, 2005.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **J. Chromat.**, v. 607, p.150-153, 1992a.

BANKOVA, V.S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, I.; PUREB, O.; ZANJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v.23, p.79 - 85, 1992b

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, C.M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.

BENNET, J.E. Antifungal agents In: GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics.** 9.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996.

BHOWMIK, B.B.; NAYAK, B.S.; CHATTERJEE, A. Formulation development and characterization of metronidazole microencapsulated bioadhesive vaginal gel. **Int J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v.1(1), 240-257, 2009.

BILENSOY, E.; ÇIRPANLI, Y.; ŞEN, M.; DOĞAN, L.; ÇALIŞ, S. Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Flu: cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, 2007.

BILENSOY, E.; MOROY, P.; ÇIRPANLI, Y.; BILENSOY ÇALIŞ, S.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. A double-blind placebo-controlled study of 5-fluorouracil: cyclodextrin complex loaded thermosensitive gel for the treatment of HPV induced condyloma. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, 2010.

BILENSOY, E.; ROUF, M.A.; VURAL, I.; ŞEN, M.; HINCAL, A.A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.7 (2), Article 38, 2006.

BOGATAJ, M. Influence of physicochemical and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa. **Int. J. Pharm.**, v. 177, p. 211–220, 1999.

BONACUCINA, G. Rheological, mucoadesiva and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvent. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p. 115–130, 2004.

BONFERONI, M.C.; GIUNCHEDI, P.; SCALIA, S.; ROSSI, S.; SANDRI, G.; CARAMELLA, C. Quitosana gels for the vaginal delivery of lactic acid: relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.7(4), Article 104, 2006.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and from South America. **Z. Naturforsch.**, v. 49c, 712-718, 1994.

BORIS, S.; SUÁREZ, J.E.; VÁZQUEZ, F.; BARBÉS, C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. **Infect. Immun.**, v. 66, 1985-1989, 1998.

BRUSCHI, M.L.; JONES, D.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; DE FREITAS, O.; LARA, H.G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal

disease: in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Sci.**, 96(8), 2074-2089, 2007.

BRUSCHI, M.L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BRUSCHI, M.L.; CARDOSO, M.L.C.; LUCCHESI, M.B.; GREMIÃO, M.P.D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **Int. J. Pharm.**, v. 264, p.45-55, 2003.

BRUSCHI, M.L.; KLEIN, T.; LOPES, R.S.; FRANCO, S.L.; GREMIÃO, M.P.D. Contribuição ao protocolo de controle de qualidade da própolis e de seus extratos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.23 (2), p.289-306, 2002.

BRUSCHI, M.L.; LOPES, R.S.; FRANCO, S.L.; GREMIÃO, M.P.D. In vitro release of propolis from gelatin microparticles prepared by spray-drying technique, **J. Basic. Appl. Pharm. Sci.**, v.25, n.2, p.79-84, 2004.

BRUSCHI, M.L.; PANZERI, H.; DE FREITAS, O.; LARA, E.H.G.; GREMIÃO, M.P.D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.42, n.1, p. 29-47, 2006.

BRUSCHI, M.L.; DE FREITAS, O. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 31, p. 293–310, 2005.

BULLETTI, A.; DE ZIEGLER, D.; FLAMIGNI, C.; GIACOMUCCI, E.; POLLI, V.; BOLELLI, G.; FRANCESCHETTI, F. Targeted drug delivery in gynaecology: the first uterine pass effect. **Hum. Reprod.**, 12(5), 1073-1079, 1997.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, p.347-363,1998.

CANDIDO, R.C.; TORQUETI TOLOI, M.R.; FRANCESCHINI, S.A.; RAMOS GARCÍA, F.; ZAROR, L. Fosfolipasa, proteinasa y morfotipos de *Candida albicans* aisladas de vagina y ano. **Rev. Chil. Cienc. Méd. Biol.**, v.8 (1), p.25-29, 1998.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46 (1), p.1-18, 2010.

CARVALHO, R.J.V.; CUNHA, C.M.; SILVA, D.A.O.; SOPELETE, M.C.; URZEDO, J.E.; MOREIRA, T.A.; MORAES, P.S.A.; TAKETOMI, E.A. IgA, IgE e subclasses de IgG Anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** v.49(4), p. 434-438, 2003.

CESCHEL, G.C.; MAFFEI, P.; SFORZINI, A.; LOMBARDI BORGIA, S.; YASIN, A.; RONCHI, C. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenetylester (CAPE) from a topical mucoadesiva gel containing própolis. **Fitoterapia**, v. 73 (1), p.44–52, 2002.

CHANG, J.Y.; OH, Y-K.; KONG, H.S.; KIM, E.J.; JANGD, D.D.; NAMD, K.T.; KIMA, C-K. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **J. Control. Rel.**, 82, 39-50, 2002

CHIDAMBARAM, N.; SRIVATSAVA, A. K. Buccal drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 21(9), p. 1009-1036, 1995.

CHOPRA, C.; MOTWANI, S.K.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K. Optimisation of polyherbal gels for vaginal drug delivery by Box-Behnken statistical design. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 67, 120-131, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne: CLSI; 2008.

CORRIGAN, E.M.; CLANCY, R.L.; DUNKLEY, M.L.; EYERS, F.M.; BEAGLEY, K.W. Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.111 (3), p.574-578, 1998.

CURRAN, R.M.; DONNELLY, L.; MORROW, R.J.; FRASER, C.; JONES, D.S.; CRANAGE, M.; MALCOLM, R.K.; SHATTOCK, R.J.; WOOLFSON, A.D. Vaginal delivery of the recombinant HIV-1 clade-C trimeric gp140 envelope protein CN54gp140 within novel rheologically structured vehicles elicits specific immune responses. **Vaccine**, 27(48), 6791-6798, 2009.

CVEK, J.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M.; JASPRICA, I.; ZUBČIĆ, S.; VITALI, D.; MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I.; TOMIĆ, S. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian propolis tinctures. **Phytochemical Analysis** 18, 451-459, 2007.

D'CRUZ, O.J.; SAMUEL, P.; UCKUN, F.M. Conception, a Novel Noncontraceptive Vaginal Vehicle for Lipophilic Microbicides. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, 6(1), Article 11, 2005.

DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. **Med. Mycol.**, v.40 (4), p.383-386, 2002.

DAS NEVES, J.; AMARAL, M.H.; BAHIA, M.F. Performance of an *in vitro* mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 69, 622-32, 2008.

DE CASTRO, S.L.. Propolis: biological and pharmacological activities. **Arbs. Amn. Rev. Biomed. Sci.**, v.3, p. 49-83, 2001.

DE FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **J. Ethnopharm.** 111, 206-212, 2007.

DEUTSCHES Arzneibuch. 10. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DIAS, A.; SOARES SOBRINHO, J.L.; NUNES, L.C.C.; LA ROCA, M.F.; CUNHA FILHO, M.S.S.; ROLIM NETO, P.J. Sistema de liberação prolongada a partir de comprimidos matriciais bioadesivos vaginais contendo metronidazol. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 26(3), 217-220, 2005.

DOTA, K.F.D.; CONSOLARO, M.E.L., SVIDZINSKI, T.I.E; BRUSCHI, M.L. Antifungal Activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **eCAM Advance Access.**, v.12, p. 1-8, 2010.

DRAKE, R.L.; VOGL, W.; MITCHELL, A.W.M. **Gray's Anatomia para Estudantes**. 39. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms. **Biomaterials**, 13(10), 709-714, 1992.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J.L.; AGNELY F.; CHAUMEIL J.C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm. Res.**, v. 23(12), p. 2709-2728, 2006.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 6, 105-112, 1998.

EL-KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMA, S.A. Chitosan and Sodium Alginate-Based Bioadhesive Vaginal Tablets. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 4(4), Article 44, 2002.

FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 273, 195-202, 2006.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERNANDES, F.F.; DIAS, A.L.T.; RAMOS, C.L.; IKEGAKI, M.; SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C. The “*in vitro*” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 49(2), p. 93-95, 2007.

FERNANDES, C.E.; MACHADO, R.B. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **RBM Gin. Obstet.**, v.7, p.100-104, 1996.

FERRAZZA, M.H.S.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BATISTA, M.R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Bras. Gin. Obstet.**, v. 27(2), p. 58-63, 2005.

FERRIS, D.G.; NYIRJESY, P.; SOBEL, J.D.; SOPER, D.; PAVLETIC, A.; LITAKER, M.S. Over-the-Counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. **Obstet. Gyn.**, v. 99(3), 2002.

FIDEL JR, P.L.; CUTRIGHT, J.L.; SOBEL, J.D. Efficacy of D0870 Treatment of Experimental *Candida* Vaginitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41(7), p. 1455-1459, 1997.

FIDEL JR., P.L. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. **Med Mycol.**, v. 40(4), p.359-375, 2002.

FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. **Dermatología en Medicina General**. 4.ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, p. 2519-2545, 1997.

FRANCO, S.L. **Própolis: Otimização do processo extrativo. Desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida**. 2001. 157f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

FRANCOIS, M.; SNOECKX, E.; PUTTEMAN, P.; WOUTERS, F.; DE PROOST, E.; DELAET, U.; PEETERS, J.; BREWSTER, M.E. A mucoadhesive, cyclodextrin-based vaginal cream formulation of itraconazole. **AAPS Pharm. Sci. Tech**, 5(1), Article 5, 2003.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 281-288, 1998.

GARCÍA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. **Z. Naturforsch.**, v. 47C, p. 634-637, 1992.

GARG, S.; VERMANI, K.; GARG, A.; ANDERSON, R.A.; RENCHER, W.B.; ZANEVELD, L.J.D. Development and characterization of bioadhesive vaginal films of Sodium Polystyrene Sulfonate (PSS), a novel contraceptive antimicrobial. **Agent Pharm. Res.**, v. 22(4), 584-595, 2005.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-80, 1979.

GOODSELL, A.; ZHOU, F.; GUPTA, S.; SINGH, M.; MALYALA, P.; KAZZAZ, J.; GREER, C.; LEGG, H.; TANG, T.; MEGEDE, J.; SRIVASTAVA, R.; BARNETT, S.W.; DONNELLY, J.J.; LUCIW, P.A.; POLO, J.; O'HAGAN, D.T.; VAJDY, M. B7-Integrin-independent enhancement of mucosal and systemic anti-HIV antibody responses following combined mucosal and systemic gene delivery. **Immunology**, v. 123, 378-389, 2007.

GUPTA, H.; SHARMA, A. Ion activated bioadhesive *in situ* gel of clindamycin for vaginal application. **Int. J. Drug Del.**, v. 1(1), 32-40, 2009.

HAN, I-K.; KIM, Y.B.; KANG, H-S.; SUL, D.; JUNG, W-W.; CHO, H.J.; OH, Y-K. Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems of mucosal vaccines. **Methods**, v. 38, 106-111, 2006.

HARRISON, P.F. Microbicides: forging scientific and political alliances. **AIDS Patient Care STDs**, v.14, 1-7, 2000.

HOLANDA, A.A.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. **Rev. Bras. Gin. Obstet.**, v. 29(1), p.3-9, 2007.

HADY, F.K.A.E.; HEGAZI, A.G. Egyptian Propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. **Z. Naturforsch.** v. 57c, p. 386 - 394, 2002.

HU, J.; GARDNER, M.B.; MILLER, C.J. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. **J. Virol.**, v. 74(13), 6087-6095, 2000.

HU, F.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S.E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, p. 276 - 283, 2005.

HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **J. Control. Rel.**, v. 103, 301-13, 2005.

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Validation of analytical procedures: **Text on validation of analytical procedures Q2(R1)**, 2005.

IMHOF, M.; LIPOVAC, M. ; KURZ, CH.; BARTA, J.; VERHOEVEN, H.C.; HUBER, J.C. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. **Int. J. Gyn. Obstet.**, v. 89, p.127-132, 2005.

ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 165-170, 2001.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M.L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.G.; ANDREWS, G.P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and

Carbopol 974P[®] designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int. J. Pharm.**, 372, 49-58, 2009.

JONES, D.S.; BROWN, A.F.; WOOLFSON, A.D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, p.1978-1990, 2001.

JONES, D.S.; IRWIN, C.R.; WOOLFSON, A.D.; DJOKIC, J.; ADAMS, V. Physicochemical characterization and preliminary *in vivo* efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for treatment of gingivitis. **J. Pharm. Sci.**, v. 88(6), p. 592-598, 1999.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **Int. J. Pharm.**, v.151, p.223-233, 1997.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F.; COULTER, W.A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C.R. Design, characterization and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadesiva topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. **J. Control. Rel.**, v. 67, p. 357-368, 2000.

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

KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v. 66(136), p.136-139, 1995.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.U.; BANKOVA, V.; HRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, p. 235–240,1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem.**, v. 84, 329-339, 2004.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107(2), 598-603, 2010.

LARA, E.H.G.; GARCIA, A.L.; PANZERI, H. Estudo de sistemas acrílicos bioadesivos para liberação sustentada *in vitro* de fluoreto. **Rev. Odont. Univ. São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 287-291, 1998.

LONGER, M.A.; ROBINSON, J.R. Systems de liberacion sostenida de fármacos. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.17, p. 2240-2264, 1985.

MALKIN, A.Y. A. Fundamental topics in rheology: Rheology fundamentals. Ontario: **Chem. Tec. Publishing**, 1994.

MANI, F.; DAMASCENO, H.C.R.; NOVELLI, E.L.B.; MARTINS, E.A.M.; SFORCIN, J.M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, p. 95-98, 2006.

MARCUCCI M.C. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.** v. 74, 105-112, 2001.

MARCUCCI M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutics activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARTIN, A.; BUSTAMENTE, P.; CHUN, A.H.C. **Physical Pharmacy**. 4.ed. London: Lea & Febiger, 1993.

MENEZES, A.A.; MENEZES, A.B.; MIURA, A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Violeta de genciana: Uma alternativa viável no tratamento de candidíase vaginal em serviços públicos de saúde. **Rev. Ciên. Saúde**, v.1(1), p 41-47, 2001.

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, 3418-3423, 2010.

MIRTH, D.B. Controlled-release therapeutic systems: Technology applicable to the treatment of oral disease. **Adv. Dent. Res.**, v.1(1), p. 109-118, 1987.

MOORE, K.L.; DALLEY, A.F. **Anatomia orientada para a clínica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MORAGUES, M.D. A monoclonal antibody directed against *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. **Infec. Immun.** v. 71, p. 5273-5279, 2003.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. Bras. Farmacog.** v.1(1), p.9-12, 1986.

MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Ethnopharmac.**, v. 79, 331-334, 2002.

NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chem.**, v.75, p. 237-240, 2001.

NDESENDO, V.M.K.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E.; DU TOIT, L.C.; BUCHMANN, E.; MEYER, L.C.R.; KHAN, R.A.; ROSIN, U. Investigation of the physicochemical and physicomechanical properties of a novel intravaginal bioadhesive polymeric device in the pig model. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 11(2), 793-808, 2010.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.L.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of própolis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101(5), 493-497, 2006.

PAMPLONA, B. Própolis: composição e atividades terapêuticas. **Rev. Racine**, v.7(37), p.49-53, 1997.

PATEL, D.B.; PATEL, J.K. Liposomal drug delivery of metronidazole for the local treatment of vaginitis. **Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.**, v. 2(1), 421-427, 2009.

PATEL, G.M.; PATEL, A.P. A novel effervescent bioadhesive vaginal tablet of ketoconazole: formulation band *in vitro* evaluation. **Int. J. Pharm.Tech. Res.**, v. 2(1): 656-667, 2010.

PATEL, V. M.; PRAJAPATI, B.G.; PATEL, M.M. Effect of hydrophilic polymers on buccoadhesive Eudragit patches of propranolol hydrochloride using factorial design. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 8 (2), Article 45, 2007.

PAVELIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N.; JALŠENJAK, I. Liposomal gel with chloramphenicol: Characterisation and *in vitro* release. **Acta Pharm.**, v. 54, 319-330, 2004.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; PAGANO, C.; MASSETTI, E.; ROSSI, C. New solid mucoadhesive systems for benzidamine vaginal administration. **Colloids Surf B: Biointerfaces**, v. 84, 413-420, 2011.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; PAGANO, C.; SCUOTA, S.; ROSSI, C. FG90 Chitosan as a new polymer for metronidazole mucoadhesive tablets for vaginal administration. **Int. J. Pharm.**, v. 377, 120-127, 2009a.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; VENEZIA, L.; GIOVAGNOLI, S.; PAGANO, C.; ROSSI, C. Formulation studies of benzydamine mucoadhesive formulations for vaginal administration. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 35 (7), 769-779, 2009b.

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

PIETTA, P.G.; GARDANA, C.; PIETTA, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**. v. 73(1), p. S7 – S20, 2002

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETKOV, V.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; MARCAZZAN, G.L.; BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type Propolis. **Phytochemical Analysis**, v.15, 235-240, 2004.

RAMADAN, A. A. Formulation and Evaluation of Bioadhesive Gels Containing Miconazole Nitrate. **J. App. Sci. Res.**, v. 4(9), 1052-1065, 2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RILEY, R.G.; SMART, J.D. ; TSIBOUKLIS , J. ; DETTMAR ,P.W. ; HAMPSON, F.; DAVIS, J. A. ; KELLY, G. ; WILBER, W. An investigation of mucus: polymer rheological synergism using synthesised and characterised poly(acrylic acid)s. **Int. J. Pharm.**, v.217, p. 87-100, 2001.

ROHAN, L.C.; SASSI, A.B. Vaginal drug delivery systems for HIV prevention. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.11(1), 78-87, 2009.

RYLANDER, E.; BERGLUND, A.L.; KRASSNY, C.; PETRINI, B. Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with orogenital sex and frequent pain at intercourse. **Sex. Transm. Infect.**, v.80 (1), p.54-57. 2004.

RYU, J.M.; CHUNG, S. J.; LEE, M. H.; KIM, C.K.; SHIM, C.K. Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum. **J. Control. Rel.**, v. 59, p. 163-172, 1999.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M.; CAMPOS, L.C.; MACHADO, D.G.; AQUINO NETO, F.R.; DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SANDRI, G.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M.C.; MUZZARELLI, C.; CAMELLA, C. Assessment of Chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 21 p.351-359, 2004.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JR., A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmac.**, v 73, 243-249, 2000.

SHAIKH, R.; SINGH, T.R.R.; GARLAND, M.J.; WOOLFSON, A.D.; DONNELLY, R.F. Mucoadhesive drug delivery systems. **J. Pharm. Bioall. Sci.**, 3(1), 89-100, 2011.

SHARMA, G.; JAIN, S.; TIWARY, A.K.; KAUR, G. Once daily bioadhesive vaginal clotrimazole tablets: Design and evaluation. **Acta Pharm.**, v. 56, 337-345, 2006.

SILICI, S.; KOC, A.N. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 318-324, 2006.

SIMÕES, J.A.; BAHAMONDES, L.G.; CAMARGO, R.P.S.; ALVES, V.M.N.; ZANEVELD, L.J.D.; WALLER, D.P.; SCHWARTZ, J.; CALLAHAN, M.M.; MAUCK, C.K. A pilot clinical trial comparing an acid-buffering formulation (ACIDFORM gel) with metronidazole gel for the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 61(2), 211-217, 2005.

SOBEL, J.D. Candidal vulvovaginitis. **Clin. Obstet. Gyn.**, v.36, p. 153-212, 1993.

SOBEL, J.D.; CHAIM, W. Update on treatment of vulvovaginal candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.13(2), p. 44-46, 1996.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Atmed, p. 591-757, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O. F. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, p. 365-425, 1999.

VALENTA, C.; KAST, C.E.; HARICH, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and *in vitro* evaluation of a mucoadhesive delivery system for progesterone. **J. Control. Rel.**, v. 77(3), 323-332, 2001.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, 1692-1712, 2005.

VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy swedish women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40(8), 2746-2749, 2002.

VITALI, B.; PUGLIESE, C.; BIAGI, E.; CANDELA, M.; TURRONI, S.; BELLEN, G.; DONDEERS, G.G.G.; BRIGIDI, P. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73(18), 5731-5741, 2007.

WAITE, J. Marine adhesive proteins: natural composite thermosets. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.12 (2), p. 139–144, 1990.

WANG, L.; TANG, X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: Design, *in vitro* and '*in vivo*' evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 350, 181-187, 2008.

WILKINSON, G.R. Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos In: GOODMAN & GILMAN'S. **As bases farmacológicas da terapêutica** 10.ed., 2003.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apicult. Res.**, v. 37, 99-105, 1998.

WONG, C.F.; YUEN, K.H.; PEH, K.K. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. **Int. J. Pharm.**, v.178, p.11-22, 1999.

YOO, J.W.; DHARMALA, K.; LEE, C.H. The physico-dynamic properties of mucoadhesive polymeric films developed as female controlled drug delivery system. **Int. J. Pharm.**, 309, 139-145, 2006.

ZAFFARONI, A. New approaches to drug administration. in: HEILMANN, K. **Therapeutic systems: rate-controlled drug delivery: concept and development**. 2. ed. New York: Thieme, 1984.

ZANEVELD, L.J.D.; WALLER, D.P.; AHMAD, N.; QUIGG, J.; KAMINSKI, J.; NIKURS, A.; DE JONGE, C. Properties of a new, long-lasting vaginal delivery system (LASRS) for contraceptive and antimicrobial agents. **J. Androl.**, v. 22(3), 481-490, 2001.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p.22-24, 2002.

ZUANAZZI, J.A.D.S. Flavonóides. in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Ed.), **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, p. 489-516, 2000.

APÊNDICE A – Trabalho 1

REVIEW ARTICLE

Vaginal mucoadhesive drug delivery systems

Raphaella Regina de Araújo Pereira¹, and Marcos Luciano Bruschi²

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Research and Development of Drug Delivery Systems, and

²Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Laboratory of Research and Development of Drug Delivery Systems, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

Abstract

Background: The vaginal mucosal cavity is a feasible, safe, very attractive site for drug delivery and highly dynamic with respect to absorption of drugs, their metabolism and their elimination. Compared with other mucosal application sites, the vagina has the following advantages as, a fall in the incidence and severity of gastrointestinal side effects, avoidance of the inconvenience caused by pain, tissue damage and risk of infections which are associated with parenteral routes, ease of self-insertion and removal of the dosage form is possible. In addition, a prolonged contact of a delivery system with the vaginal mucosa may be achieved more easily than at other absorption sites like rectum or intestinal mucosa. Mucoadhesive systems provide intimate contact between a dosage form and the vaginal mucosa, which may result in high concentration in a local area and hence high drug flux through the vaginal mucosa. The efficacy of vaginal mucoadhesive drug delivery systems (DDS) is affected by the biological environment and the properties of the polymer and the drug.

Objective: This article reviews systematically some relevant citations regarding the environment, strategies for vaginal drug delivery, evaluation, and utilization of the main polymers.

Conclusion: We provide a review of several vaginal mucoadhesive DDS currently in developmental stages or available in the market, immunization via the vagina and special emphasis on the challenges and difficulties associated with delivery of drugs via the vaginal route.

Keywords: Mucoadhesion, vaginal mucosa, vaginal route, vaginitis, drug delivery systems

Introduction

Since the last decades, a greater attention has been focused on development of controlled and/or sustained drug delivery systems (DDS). The number of products based on new DDS has significantly increased, and this growth is expected to continue in the near future. The purpose in designing these systems is to reduce the frequency of dosing or to increase effectiveness of the drug by localization at the site of the action, decreasing the dose required or providing uniform drug delivery, and to maximize the therapeutic effect while minimizing the potential for systemic side-effects^{1–6}.

Alternative non-oral routes, like vaginal, are currently assuming greater importance. The main advantages of

vaginal drug delivery over conventional drug delivery, as per oral administration, are the ability to bypass first-pass metabolism, ease of administration and high permeability for low molecular weight drugs^{2–4,7,8}.

The human vagina remains to be a relatively unexplored route of drug delivery despite its potential as a non-invasive route of drug administration^{5,7}. Moreover, the administration of drugs for systemic effects via vaginal is also feasible. This route has been traditionally used either to provide women with therapy for local disorders^{3,4,9}, for the administration of locally acting drugs such as antifungal^{1,5,9–18}, antibacterial^{8,19–23}, antimicrobial^{24–28}, anti-protozoal²⁹, antichlamydial, antiviral agents^{15,30,31}, labor-inducing agents, spermicidal agents, prostaglandins,

Address for Correspondence: Marcos Luciano Bruschi, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Laboratory of Research and Development of Drug Delivery Systems, State University of Maringá, Colombo Avenue, 5790, K80, S22, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil. Tel: +55 44 3011-4870. E-mail: mlbruschi@uem.br

(Received 03 April 2011; revised 07 September 2011; accepted 09 September 2011)