



## **EMULGEL BASEADO EM QUITOSANA CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES VULVOVAGINAIS**

*Chitosan-based emulgel with red propolis extract for  
treatment of vulvovaginal infections*

*Amanda Araújo Vieira<sup>1</sup>, Milena Soares dos Santos<sup>1</sup>, André Luís Morais Ruela<sup>2\*</sup>*

<sup>1</sup>Campus Anísio Teixeira, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Vitória da Conquista, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil.

*\*Corresponding author. E-mail address: andre.ruela@ufop.edu.br*

### **RESUMO**

As abelhas coletam um produto natural resinoso a partir da planta *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie nativa de manguezais brasileiros do estado de Alagoas, que origina a própolis vermelha. Neste trabalho, prepararam-se diferentes extratos da própolis vermelha para desenvolver uma formulação tópica para tratamento de infecções vulvovaginais, como vaginose bacterianas e candidíase. Ensaios de atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos de referência *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 indicaram que o extrato preparado em polietilenoglicol 400 apresentou notável atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *S. aureus*. Prepararam-se formulações com baixo teor de componentes oleosos, do tipo emulgel, com incorporação do extrato que apresentou maior atividade antimicrobiana. A mistura de uma emulsão não iônica com um hidrogel de quitosana de baixo peso molecular na proporção 1:1 p/p originou o emulgel. Caracterizaram-se as propriedades reológicas da emulsão, do gel de quitosana e do emulgel. A incorporação do extrato no emulgel contendo quitosana resultou em uma atividade antimicrobiana *in vitro* aumentada, como uma alternativa terapêutica viável baseada em produtos naturais para



tratamento de infecções vulvovaginais. A realização de estudos clínicos ainda se faz necessária para caracterizar a segurança e eficácia destas formulações.

**Palavras-chave:** Própolis. Creme. Reologia. Candidíase Vulvovaginal. Produtos com Ação Antimicrobiana.

## ABSTRACT

Red propolis is a natural resinous product collected by bees from the *Dalbergia ecastophyllum* plant, a species native to Brazilian mangroves in the state of Alagoas. In this work, different extracts of red propolis were prepared, aiming at the development of a topical formulation for the treatment of vulvovaginal infections, such as bacterial vaginosis and candidiasis. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against the reference microorganisms *Candida albicans* ATCC 90028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The extract prepared in polyethylene glycol 400 was selected based on its antimicrobial activity against *C. albicans* and *S. aureus*, and it was incorporated in a formulation with low content of oily components, of the emulgel type. The emulgel was prepared by mixing a nonionic emulsion with a low molecular weight chitosan hydrogel in a 1:1 w/w ratio. The rheological properties of the emulsion, chitosan gel and emulgel were characterized. The incorporation of the extract in the emulgel with chitosan resulted in an increased *in vitro* antimicrobial activity, as a feasible therapeutic alternative based on natural products for the treatment of vulvovaginal infections. Clinical studies must be performed to characterize the safety and efficacy of these formulations.

**Keywords:** Propolis. Cream. Rheology. Vulvovaginal Candidiasis. Products with Antimicrobial Action.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de formulações mucoadesivas para administração tópica apresenta grande potencial de inovação. Formas farmacêuticas mucoadesivas que tenham maior afinidade pelo tecido podem contribuir para aumentar a eficácia do medicamento no local de ação. No tratamento tópico de infecções na mucosa vaginal,



a mucoadesão é interessante para aumentar o tempo de permanência de ação do ativo em contato com a mucosa. Neste contexto, os polímeros são componentes importantes para garantir a bioadesão da formulação (AHMED; ALJAEID, 2016; ASANE *et al.*, 2008; DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos, que no caso de formulações vaginais tendem a interagir com polissacarídeos do muco cervical. Como consequência da bioadesão, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser melhorada e o número de doses administradas pode ser reduzido (ASANE *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010).

A quitina é um biopolímero abundante na natureza, sendo extraída do exoesqueleto de crustáceos como caranguejos e camarões. A desacetilação parcial deste polissacarídeo produz a quitosana, um copolímero com diversas aplicações descritas no desenvolvimento de medicamentos, especialmente formulações mucoadesivas (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012; ALVAREZ-LORENZO *et al.*, 2013; CAMELLA *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de um medicamento incorporando produtos naturais para tratamento tópico de infecções vaginais, como vaginose bacterianas e candidíase vulvovaginal, pode apresentar vantagens em relação aos fármacos sintéticos administrados para esta finalidade, seja por via oral ou tópica. A resistência de fungos e bactérias aos fármacos limita a eficácia do tratamento, enquanto produtos naturais podem emergir como uma nova alternativa clínica. Esta importância ainda é maior ao considerar pacientes imunocomprometidos e com episódios recorrentes de infecções vaginais. Neste sentido, os emulgéis são formulações interessantes para a via de administração vaginal, podendo apresentar diversas vantagens, como propriedades mucoadesivas, a depender do tipo de agente gelificante; permitir incorporação de ativos hidrofílicos ou lipofílicos e apresentar um baixo teor de componentes oleosos, não alterando significativamente a fisiologia vaginal (SMART, 2005; ASANE *et al.*, 2008; CAMELLA *et al.*, 2015; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

A própolis vermelha é um produto natural resinoso coletado por abelhas de fontes vegetais a partir dos caules e galhos da espécie vegetal *Dalbergia*



*ecastophyllum*, planta nativa de manguezais brasileiros do estado de Alagoas. Os principais bioativos da própolis vermelha são os compostos fenólicos, representados pelos flavonoides (flavonas, flavonois e isoflavonas) e ácidos fenólicos, os quais são relacionados às propriedades antimicrobianas, incluindo ação contra microrganismos patogênicos (BANSKOTA *et al.*, 1998; BURDOCK, 1998; HAYACIBARA *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019; FASOLO *et al.*, 2020; MARTORANO-FERNANDES *et al.*, 2020). Entre os componentes já reportados na própolis vermelha, destacam-se isoflavonas, sendo que algumas nunca foram encontradas anteriormente reportadas em outros tipos de própolis brasileiras, tais como 4,7-dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4,7-dimetóxi-2-isoflavonol. Estes compostos estão relacionados à sua potencial atividade antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (ALENCAR *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2007; FREIRES *et al.*, 2016).

O objetivo deste trabalho foi preparar de extratos da própolis vermelha sem álcool etílico, e incorporá-lo em formulações farmacêuticas tópicas do tipo emulgel com quitosana, potencialmente mucoadesivas, destinadas ao tratamento de infecções vaginais.

## **METODOLOGIA**

### **Própolis vermelha e preparo dos extratos**

A amostra de própolis vermelha foi obtida em março de 2017, sendo coletada em uma apiário localizado em Maceió, Alagoas, município do Nordeste brasileiro (cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SisGen: A373F9E). A própolis foi conservada sob refrigeração até o momento do preparo do extrato.

Os extratos de própolis vermelha foram preparados conforme descrito na Tabela 1, sem incluir álcool etílico na sua composição.

**Tabela 1** – Composição e preparo dos extratos de própolis vermelha.

Extrato	Própolis vermelha (%, p/p)	Solvente	Extração
A	10	PEG 400: Água destilada (1:1, v/v)	70 °C/ 15 min.
B	10	PEG 400 e Água destilada 20: 80, % v/v	70 °C/ 15 min.  Estufa: 75 °C/ 1h. Maceração inicial: 2 dias/ temperatura ambiente.
C	20	PEG 400	Aquecimento: 70 °C/ 2h. Maceração final: 7 dias/ temperatura ambiente.
D	10	Óleo de coco e miristato de isopropila 60: 40, % p/p	70 °C/ 15 min. Maceração: 24h/ temperatura ambiente.
E	10	PEG 400: Água destilada: Kolliphor® EL* 20:75:5, % p/p/p	70 °C/ 15min.

\* Kolliphor® EL (Sigma-Aldrich), tensoativo não-iônico usado para solubilizar compostos hidrofóbicos e/ou insolúveis em água; PEG 400, polietilenoglicol 400.

### Preparo da emulsão

As emulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases. Ambas as fases foram aquecidas separadamente até 75±5°C. A fase aquosa foi lentamente vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante, com auxílio de um agitador mecânico (Biomixer modelo 78HW-1). A agitação foi mantida até a formulação alcançar a temperatura ambiente (25±2°C). Na fase oleosa, utilizou-se a cera autoemulsionante Uniox C® (Chemunion®) (de 6 a 10% m/m para selecionar uma



emulsão fluida), óleo de coco (Copra, 92% de gorduras saturadas, índice de acidez 0,26 mg/KOH) como emoliente (10% m/m), monoestearato de glicerila (Chemax®) como agente emulsionante secundário (2% m/m), butilhidroxitolueno como antioxidante (0,05% m/m) e propilparabeno como conservante antimicrobiano (0,05% m/m). Na fase aquosa, foi utilizada a glicerina como umectante (5% m/m), ácido etilenodiamino tetra-acético como quelante de metais (0,2% m/m), metilparabeno como conservante antimicrobiano (0,1% m/m), metabissulfito de sódio como antioxidante (0,05% m/m) e água destilada como veículo (q.s.p. 100%). Demais reagentes: grau P. A. da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda®. Após a manipulação, as formulações foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 72 h. Posteriormente, realizou-se a diluição da formulação em água destilada (1:50 p/p), de modo a caracterizar se a emulsão formada é uma dispersão óleo-em-água (O/A).

### **Preparo dos géis e dos emulgéis com extrato de própolis vermelha**

O gel de quitosana de baixa viscosidade (Êxodo Científica®, 75% de desacetilação determinada experimentalmente, metais pesados <10 ppm) (gel catiônico) foi preparado a 5% p/p usando ácido acético a 3% como solvente a temperatura ambiente. Os componentes permaneceram em agitação constante até completa dispersão da quitosana. O gel de Natrosol™ ou hidroxietilcelulose (gel não-iônico) foi preparado a 1,5% p/p, em água destilada previamente aquecida a 60°C, sob agitação constante, até completa dispersão do polímero. O gel não-iônico foi preparado um comparativo ao gel iônico. Os emulgéis foram preparados a partir da mistura do gel (catiônico ou não-iônico) na emulsão nas proporções 1:1 p/p. Após o preparo, procedeu-se a incorporação do extrato C no emulgel, a partir da sua mistura simples, nas proporções 1:9 p/p.



### **Avaliação da estabilidade física dos emulgéis**

Os emulgéis foram avaliados quanto às características organolépticas, antes e após submetê-los ao teste de centrifugação. Amostras de 5 g das formulações foram pesadas, acondicionadas em tubos de centrífuga e submetidas à centrifugação (Centrífuga Centribio) com rotação de 171,36 RCF por 15 minutos. Os testes foram realizados em triplicata, à temperatura ambiente. A análise macroscópica das formulações permitiu verificar a sua homogeneidade, permitindo detectar instabilidades visíveis (sedimentação, coalescência, alterações de cor ou presença de grumos). Somente as formulações classificadas como estáveis macroscopicamente foram avaliadas por meio de outros testes.

As formulações foram diluídas em água destilada nas proporções 1:10 v/v e as medidas de pH foram realizadas inserindo o eletrodo do peagâmetro diretamente na amostra diluída. O ensaio foi realizado em triplicata a temperatura ambiente.

A avaliação do perfil reológico dos emulgéis foi realizada utilizando reômetro Brookfield modelo LVDV-III ULTRA e *spindle* SC4-25. As medidas foram realizadas a velocidades de rotação crescentes para caracterizar as curvas ascendentes. Em seguida, o procedimento foi realizado no sentido inverso e foram obtidas as curvas descendentes. As velocidades de rotação foram definidas de acordo com a capacidade de leitura do equipamento e a consistência das formulações. Para o gel catiônico, gel não-iônico e emulgel com quitosana, usaram-se rotações no intervalo de 10 a 150 rpm com incrementos de 20 rpm, enquanto que para a emulsão contendo 8 % p/p de cera autoemulsiva usou-se rotações de 10 a 70 rpm com incrementos de 12 rpm. A partir dos resultados foram calculados os valores de índice de fluxo e de consistência de acordo com a Lei de Ostwald, descrita na equação 1:

$$\tau = K \gamma^\eta, \quad (\text{equação 1})$$

Em que:

$\tau$  = tensão de cisalhamento (*Shear stress*) (dina/cm<sup>2</sup>); K = índice de consistência (cP);

$\gamma$  = taxa de cisalhamento (*Shear rate*) (1/seg);  $\eta$  = índice de fluxo.



### **Estabilidade acelerada**

Amostras de 50 g das formulações foram pesadas e acondicionadas em tubos de plástico com tampa e armazenadas nas temperaturas de  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, em refrigerador e estufa. A avaliação da estabilidade física das formulações foi avaliada após 30, 60 e 90 dias.

### **Microrganismos testados e preparo do inóculo**

Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90028. Com o auxílio de alça bacteriológica, foram coletadas quatro a cinco colônias semeadas em cultura de 24 horas em ágar sangue ou em ágar Sabourad-Dextrose 4% e inoculadas em tubo contendo 3 mL de solução salina estéril a 0,9%. Esta suspensão microbiana foi homogeneizada e sua turvação comparada com a escala 0,5 de McFarland, equivalente a uma suspensão de aproximadamente  $0,5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis vermelha**

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis vermelha foi analisada pelo método de disco difusão contra os controles *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 90028 e *S. aureus* ATCC 25923 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). A semeadura foi realizada com auxílio de um *swab* estéril em Agar *Müller-Hinton* (Himedia Laboratories PVT® Ltda) em três direções diferentes. O preparo dos discos foi realizado a partir da inoculação de 10  $\mu\text{L}$  da solução do extrato em discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro. Os discos, previamente impregnados com o extrato, foram colocados sobre o meio de cultura sólido com o microrganismo a ser testado já semeado. A disposição dos discos ocorreu evitando sobreposição. Na





mesma placa de Petri, inocularam-se os controles negativos usando discos impregnados com os solventes de cada extrato e os controles positivos, usando discos de ampicilina (10 µg, Sensifar®), ceftriaxona (30 µg, Sensifar®), e sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg, Sensifar®). As placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos com auxílio de uma régua milimétrica. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média e desvio padrão.

### **Determinação da concentração inibitória mínima do extrato e dos emulgéis**

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em duplicata usando microplacas de 96 poços. O extrato de própolis vermelha selecionado e os emulgéis (catiônico e não-iônico) em que foi incorporado foram avaliados. As suspensões de *S. aureus* (ATCC 25923) e *C. albicans* (ATCC 90028) foram preparadas em solução salina 0,9% estéril e comparadas com a escala McFarland 0,5. Adicionou-se 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) em cada poço da microplaca.

Na linha A de cada placa foram adicionados 100 µL do extrato puro e 100 µL da suspensão bacteriana. Homogeneizou-se e fez-se a diluição seriada nos demais poços até a coluna 10. As concentrações finais foram 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256 e 1/512 da concentração inicial. Para as linhas B até a F foram realizadas as mesmas adições e diluições, mudando apenas a amostra analisada. Na linha B de cada placa foi adicionado o emulgel com Natrosol™, na linha C o emulgel com quitosana e nas linhas D, E e F foram feitas as duplicatas.

A linha G foi usada como controle negativo, contendo BHI e a suspensão bacteriana, e a linha H contendo apenas o meio BHI. Os controles positivos foram adicionados na coluna 11 de cada placa. Como controle positivo para *S. aureus* foi utilizado o antimicrobiano amoxicilina diluída em PEG 400 na concentração de 10 mg/mL e para o controle positivo da *C. albicans* utilizou-se o antimicrobiano cetoconazol na proporção 1:10 p/v.



Após o preparo das amostras, as microplacas foram incubadas em estufa a 35°C por 18-24 h, sem agitação. A CIM do crescimento bacteriano foi considerada como a menor concentração evidenciada pelo aspecto límpido nos poços.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antimicrobiana dos controles positivos e dos extratos de própolis vermelha estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3. O extrato C apresentou atividade antimicrobiana significativa frente à cepa da bactéria gram-positiva *S. aureus*. É interessante mencionar que a atividade antibacteriana da própolis vermelha é diretamente relacionada aos compostos fenólicos e flavonoides na sua composição, e que uma maior concentração desses compostos bioativos relaciona-se à uma maior atividade antibacteriana (ALENCAR *et al.*, 2007). O PEG 400 é um solvente não aquoso, do tipo poliálcool, que pode favorecer a extração deste bioativos a partir da própolis vermelha, visto que muitos compostos fenólicos apresentam baixa solubilidade em água.

**Tabela 2** – Atividade antimicrobiana dos controles positivos. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Microrganismos testados	Ceftriaxona (Halo em mm)	Sulfa/trim* (Halo em mm)	Ampicilina (Halo em mm)	Cetoconazol (Halo em mm)	Itraconazol (Halo em mm)
<i>Candida albicans</i>	21 $\pm$ 2	26 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	32 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	-	-
<i>Escherichia coli</i>	30 $\pm$ 1	25 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	-	-

\* Sulfametoazol/ trimetoprima.



Os extratos de própolis vermelha não apresentaram atividade antibacteriana significativa frente à cepa de bactéria gram-negativa *E. coli*. Por outro lado, os extratos A, B e C apresentaram atividade antifúngica frente à cepa de levedura *C. albicans* (Tabela 3). Um estudo *in vitro* realizado por Siqueira *et al.* (2015) demonstrou que extratos da própolis vermelha tem efeito fungistático e fungicida contra cepas de *Candida* sp., incluindo *C. albicans* (SIQUEIRA *et al.*, 2015). Neves *et al.* (2016) estudaram quais componentes da própolis vermelha relacionam-se à sua atividade antifúngica, evidenciando que a isoflavona formononetina é o bioativo com maior potencial de inibição da *Candida* sp. (NEVES *et al.*, 2016).

**Tabela 3** - Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis vermelha. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos halos de inibição (n=3).

<b>Microrganismos testados</b>	<b>Extrato A (Halo em mm)</b>	<b>Extrato B (Halo em mm)</b>	<b>Extrato C (Halo em mm)</b>	<b>Extrato D (Halo em mm)</b>	<b>Extrato E (Halo em mm)</b>
<i>Candida albicans</i>	9 $\pm$ 1	12 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	18 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1
<i>Escherichia coli</i>	-	-	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1

O Uniox C<sup>®</sup> é uma cera autoemulsiva não-iônica, composta por uma mistura de álcool cetosteárfílico (agente de consistência) e polissorbato 60 (agente emulsivo não-iônico). É tipicamente usada no preparo de emulsões O/A, apresentando compatibilidade com eletrólitos em concentrações moderadas e assegurando a estabilidade física da emulsão perante uma ampla faixa de pH (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2009). Sendo assim, emulsões foram preparadas usando diferentes concentrações de Uniox C<sup>®</sup> (Tabela 4). Em todos os casos, as emulsões foram facilmente diluídas em água, confirmando a formação de dispersões do tipo O/A.



**Tabela 4** – Estabilidade física das diferentes composições de emulsões

<b>Formulação</b>	<b>Cera autoemulsiva (%, p/p)</b>	<b>Estabilidade física*</b>	<b>Viscosidade aparente</b>
<b>A</b>	10	Não separou	Baixa fluidez
<b>B</b>	8	Não separou	Fluidez intermediária
<b>C</b>	7	Separou/ produto homogêneo após agitação	Fluidez intermediária
<b>D</b>	6	Separou/ difícil redispersão após agitação	Alta fluidez

\* Após centrifugação por 15 minutos a 171,36 RCF.

Variando-se a concentração da cera autoemulsiva, de 6 a 7% p/p, observou-se uma maior instabilidade física das formulações. As emulsões com 8 a 10% p/p de Uniox C<sup>®</sup> apresentaram maior estabilidade física após a centrifugação, mas é importante considerar a viscosidade aparente das formulações para administração vaginal, que não deve ser muito elevada, de modo a permitir seu escoamento pelo dispositivo aplicador. Sendo assim, a emulsão com concentração de Uniox C<sup>®</sup> igual a 8% p/p foi selecionada, alcançando uma viscosidade aparente classificada como intermediária, ou seja, ainda apresentando fluidez que facilite a sua administração com o uso de um aplicador vaginal.

Os resultados do comportamento reológico (Tabela 5) indicaram que o gel catiônico apresentou menor viscosidade aparente que o gel não-iônico, determinada pelo índice de consistência. Ambas preparações apresentaram comportamento não-newtoniano do tipo pseudoplástico, com redução gradual da viscosidade ao empregar velocidades de cisalhamento crescentes. Conforme a lei da Potência, valores de  $\eta$  iguais a 1 são indicativos de fluidos newtonianos, enquanto que valores de  $\eta$  inferiores a 1 indicam comportamento pseudoplástico, o que foi mais evidente no gel não-iônico ( $\eta$  variou de 0,58 a 0,59) do que no gel catiônico ( $\eta$  igual a 0,98).

Estes resultados podem ser justificados, considerando que o gel catiônico foi preparado a partir de quitosana de baixo peso molecular, que em baixas concentrações resultam em preparações de baixa viscosidade. Por outro lado, a

hidroxietilcelulose é polímero um derivado de celulose e, mesmo em baixas concentrações, permite consideravelmente aumentar a viscosidade das preparações.

Em ambos os casos, as concentrações dos polímeros empregadas (quitosana ou hidroxietilcelulose) no preparo dos géis foram baixas e, provavelmente por este motivo, não foram encontradas diferenças entre as curvas ascendentes e descendentes ( $p > 0,05$ ) durante a análise reológica, não sendo caracterizado o fenômeno da tixotropia.

**Tabela 5** – Análise reológica das formulações a 25 °C (n=5)

<b>Formulação</b>	<b>Curva ascendente</b>	<b>Curva descendente</b>	<b>p-valor*</b>
<b>Emulsão B</b>	K = 15434 ± 753 cP $\eta = 0,64 \pm 0,01$	K = 11130 ± 310 cP $\eta = 0,76 \pm 0,01$	0,0028
<b>Gel catiônico</b>	K = 1432 ± 133 cP $\eta = 0,98 \pm 0,01$	K = 1475 ± 185 cP $\eta = 0,98 \pm 0,02$	0,6841
<b>Gel não-iônico (contendo hidroxietilcelulose)</b>	K = 10551 ± 1294 cP $\eta = 0,58 \pm 0,02$	K = 9991 ± 1133 cP $\eta = 0,59 \pm 0,01$	0,4873
<b>Emulgel catiônico (contendo quitosana)</b>	K = 4827 ± 344 cP $\eta = 0,65 \pm 0,04$	K = 3147 ± 320 cP $\eta = 0,76 \pm 0,01$	< 0,0001
<b>Emulgel catiônico após 60 dias a 4 °C</b>	K = 1619 ± 181 cP $\eta = 0,37 \pm 0,03$	K = 986 ± 101 cP $\eta = 0,50 \pm 0,02$	0,0001
<b>Emulgel catiônico após 60 dias a 40 °C</b>	K = 2560 ± 157 cP $\eta = 0,30 \pm 0,03$	K = 1486 ± 115 cP $\eta = 0,44 \pm 0,01$	< 0,0001

\*, conforme o teste t de Student a 5% de significância; K, índice de consistência;  $\eta$ , índice de fluxo.

Os emulgéis foram preparados a partir da mistura do gel (não-iônico ou catiônico) com a emulsão, incluindo a incorporação do extrato de própolis vermelha C. Os resultados da caracterização dos emulgéis foram apresentados na Tabela 6. Os emulgéis apresentaram aparência de semissólido, com viscosidade aparente menor que as emulsões, e ainda com coloração levemente avermelhada e odor característico da própolis vermelha (Figura 1). O pH da mucosa vaginal em condições normais é

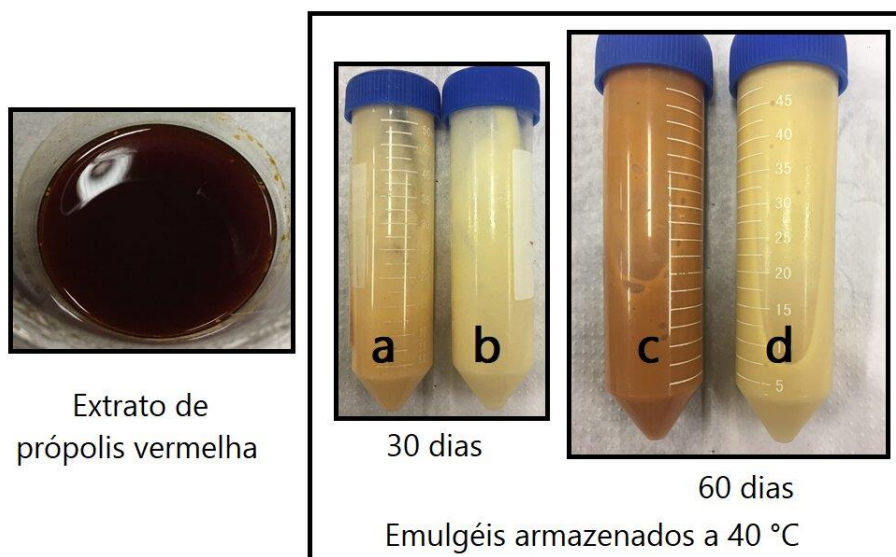
ligeiramente ácido, em torno de 4, sendo por isso o pH dos produtos ajustado nesta faixa, de modo a não causar irritação na mucosa ou levar à alteração na proliferação de microrganismos presentes na microbiota vaginal (CARAMELLA *et al.*, 2015).

**Tabela 6** – Caracterização dos emulgéis (n=3).

Formulação	Características organolépticas	pH	Estabilidade física*	Viscosidade aparente
<b>Emulgel não-iônico (contendo hidroxietilcelulose)</b>	Media viscosidade, cor avermelhada, odor característico	4,3 ± 0,1	30 dias: estável 60 dias: estável 90 dias: estável	Fluidez intermediária
<b>Emulgel catiônico (contendo quitosana)</b>	Media viscosidade, cor avermelhada, odor característico	4,0 ± 0,1	30 dias: estável 60 dias: separação de fases reversível 90 dias: separação de fases reversível	Alta fluidez

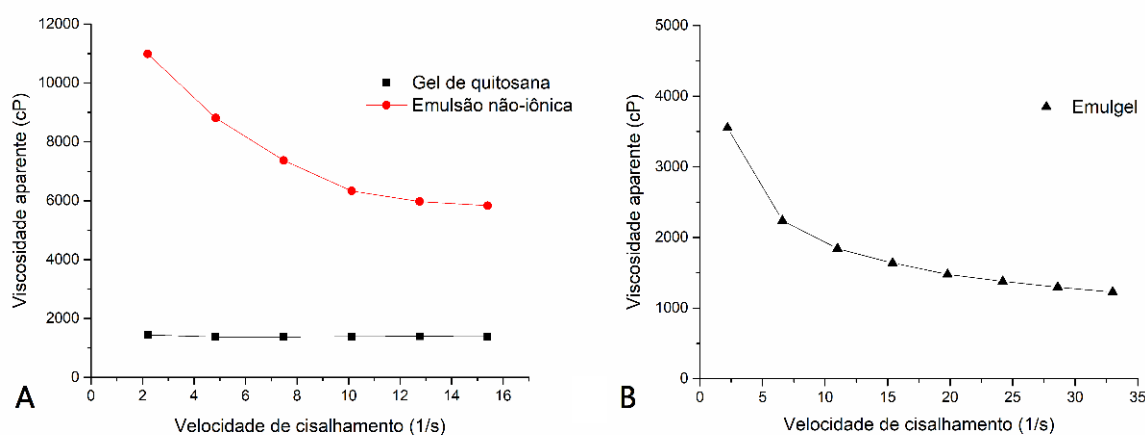
\* Após centrifugação por 15 minutos a 171,36 RCF.

**Figura 1** – Aspecto do extrato de própolis vermelha C, do emulgel catiônico após 30 (a) e 60 dias (c) armazenado a 40 °C e do emulgel não-iônico após 30 (b) e 60 dias (d) armazenado a 40 °C.



A emulsão e o emulgel catiônico apresentaram  $\eta$  variando de 0,64 a 0,76, indicando comportamento não-newtoniano, do tipo pseudoplástico (Tabela 5 e Figura 2). Em ambas preparações, houve diferenças significativas entre as curvas ascendentes e descendentes ( $p < 0,05$ ), com maior viscosidade aparente na análise inicial (velocidades crescentes), seguida pelo decaimento da viscosidade aparente na análise usando velocidades decrescentes, caracterizando comportamento tixotrópico. A viscosidade aparente do emulgel catiônico foi menor do que a emulsão, o que é reflexo da incorporação da quitosana no emulgel. Estes resultados são importantes para demonstrar que após agitação ou processamento, a viscosidade da preparação tende a diminuir, tornando-a mais fluida, o que pode facilitar o envase na embalagem primária ou a administração vaginal, com maior espalhabilidade na mucosa.

**Figura 2** – Análise reológica das formulações (curvas ascendentes).



O emulgel não-iônico apresentou maior estabilidade física após centrifugação que o emulgel catiônico, apresentando aspecto homogêneo sem separação de fases. Devido à natureza não-iônica do Natrosol™, a tendência de incompatibilidade entre os componentes da formulação é reduzida, principalmente entre agente emulsivo (tensoativo), agente gelificante (polímero) e compostos do extrato de própolis vermelha. Isto está diretamente relacionado à ausência de cargas elétricas no polímero e no tensoativo, pois enquanto o polímero aumenta a viscosidade da fase





externa, o tensoativo forma um filme interfacial altamente hidratado ao redor das gotículas de fase oleosa, colaborando para mantê-las dispersas na formulação. Ambos os fatores favorecem o aumento da estabilidade do sistema disperso. É importante considerar que emulsões convencionais se apresentam como sistemas termodinamicamente instáveis com tendência à separação de fases. Para alcançar uma maior estabilidade cinética, se faz necessária a apropriada seleção dos componentes da formulação e/ou processo de produção.

O gel catiônico levou à separação de fases do emulgel após 60 dias de armazenamento, provavelmente devido à uma incompatibilidade de cargas da quitosana com outros componentes da formulação ou extrato. A carga elétrica do polímero pode de alguma forma interagir com o tensoativo polissorbato 60, presente na cera autoemulsiva, bem como pode interagir de alguma forma com outros componentes da formulação ou oriundos do extrato, promovendo a desestabilização do sistema no médio prazo, com conseqüente coalescência.

Os emulgéis não-iônico e catiônico, assim como o extrato C, que em análise preliminar indicaram uma maior atividade antimicrobiana frente às cepas *S. aureus* e *C. albicans*, foram avaliados pelo ensaio de microdiluição. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Concentração inibitória mínima dos emulgéis (n=3).

<b>Amostra</b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>C. albicans</i></b>
<b>Extrato de própolis vermelha C</b>	1/8	1/4
<b>Emulgel não-iônico (hidroxietilcelulose)</b>	1/4	1/4
<b>Emulgel catiônico (quitosana)</b>	1/16	1/8

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7, o emulgel catiônico apresentou maior potencial de inibição do crescimento microbiano do que o extrato puro, seja para *S. aureus* ou para *C. albicans*. Estes resultados são relacionados à quitosana, um polímero catiônico que possui notável atividade antimicrobiana. A sua





ação antimicrobiana já foi reportada, e relaciona-se à interação das cargas positivas do polímero com lipopolissacarídeos e outros sítios aniônicos presentes na parede celular microbiana (SMART, 2005; ASANE *et al.*, 2008; BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012).

Deste modo, pode-se sugerir um efeito sinérgico da quitosana e do extrato de própolis vermelha no emulgel catiônico, com maior atividade antimicrobiana desta formulação ao apresentar valores de CIM inferiores ao do extrato puro ou do emulgel não-iônico. Sugere-se também que a presença de tensoativo na formulação do emulgel pôde aumentar a permeabilidade das membranas celulares microbianas aos bioativos, aumentando assim o efeito antimicrobiano dos emulgéis. Finalmente, a quitosana pode promover a mucoadesão da formulação, aumentando o tempo de permanência dos bioativos na mucosa vaginal, o que também contribuiria para aumentar a eficácia do produto.

Apesar do emulgel catiônico apresentar potencial para tratamento de infecções vaginais, a formulação apresentou menor estabilidade física, com separação de fases após 60 dias. Sendo assim, novos estudos podem ser realizados na busca de uma formulação com maior estabilidade física, ainda incluindo a quitosana como agente gelificante, de modo a otimizar os esquemas terapêuticos para tratamento de infecções vaginais. Mesmo assim, a formulação na sua presente forma poderia ser usada como uma preparação extemporânea, em que a mistura do gel de quitosana na emulsão é realizada logo no início do tratamento, ou ainda, na forma de um medicamento manipulado em farmácias magistrais, em que o prazo de validade do medicamento é menor, limitado ao período de tratamento.

## **CONCLUSÃO**

Diante da emergência da resistência microbiana frente aos fármacos usualmente empregados nos tratamentos tópicos da vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal, este trabalho buscou uma alternativa baseada em produtos naturais para tratamento de infecções vaginais. Sendo assim, um extrato de própolis vermelha



sem álcool etílico, usando PEG 400 como solvente, foi selecionado, demonstrando notável atividade antimicrobiana frente à *C. albicans* e *S. aureus*. Posteriormente, foi possível incorporá-lo em emulgéis contendo quitosana, de modo a obter formulações potencialmente mucoadesivas. O extrato incorporado neste emulgel demonstrou atividade antimicrobiana *in vitro*, podendo ser preparado como uma preparação extemporânea ou uma especialidade magistral. Estudos clínicos ainda devem ser realizados, de modo a caracterizar a segurança e a eficácia destas formulações após administração vaginal.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483–507, 2016.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALVAREZ-LORENZO, C. *et al.* Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1148–1171, 2013.
- ASANE, G. S. *et al.* Polymers for mucoadhesive drug delivery system: A current status. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 11, p. 1246–1266, 2008.
- BANSKOTA, A. H. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896–900, 1998.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A., DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463–469, 2012.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.
- CARAMELLA, C. M. *et al.* Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 39–52, 2015.



CARVALHO, F. C. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CASTRO, M. L. *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 10 ed, Wayne, 2015.

DUDHANI, A. R., KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 243–251, 2010.

FASOLO, D. *et al.* Topical delivery of antifungal Brazilian red propolis benzophenones-rich extract by means of cationic lipid nanoemulsions optimized by means of Box-Behnken Design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101573, 2020.

FREIRES, I. A., ALENCAR, S. M. de, ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.

HAYACIBARA, M. F. *et al.* In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 110–115, 2005.

MARTORANO-FERNANDES, L., CAVALCANTI, Y. W., DE ALMEIDA, L. D. F. D. Inhibitory effect of Brazilian red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

NEVES, M. V. M. das *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016.

PRISTOV, K. E., GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London, The Pharmaceutical Press, 2009.

SANTOS, D. A. dos, *et al.* Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 120–130, 2019.



SIQUEIRA, A. B. S., *et al.* Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2015.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 2005.

**Received:** 07 July 2020

**Accepted:** 08 July 2020

**Published:** 02 January 2021