

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

ANDRÉS FELIPE CARTAGENA MOLINA

DESENVOLVIMENTO DE UM ADESIVO PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS
CONTENDO MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE NITRATO DE MICONAZOL:
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

PONTA GROSSA
2016

ANDRÉS FELIPE CARTAGENA MOLINA

DESENVOLVIMENTO DE UM ADESIVO PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS
CONTENDO MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE NITRATO DE MICONAZOL:
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor na Universidade Estadual de Ponta
Grossa, no Curso de Doutorado em
Odontologia – Área de concentração em
Clínica Integrada. Linha de Pesquisa em
Propriedades Físico-Químicas e Biológicas
de Materiais

Orientadora Prof^a. Dr^a. Nara Hellen
Campanha Bombarda
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M722 Molina, Andrés Felipe Cartagena
Desenvolvimento de um adesivo para
próteses removíveis contendo
micropartículas poliméricas de nitrato de
miconazol: síntese e caracterização/
Andrés Felipe Cartagena Molina. Ponta
Grossa, 2016.
117f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área
de Concentração: Clínica Integrada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nara Hellen
Campanha Bombarda.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

1.Nitrato de Miconazol. 2.Liberação
controlada de Fármacos. 3.Preparações
Farmacêuticas Odontológicas. 4.Adesivos a
Tecidos. 5.Estomatite sob Prótese.
I.Bombarda, Nara Hellen Campanha. II.
Farago, Paulo Vitor. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em

CDD: 617.6

ANDRÉS FELIPE CARTAGENA MOLINA

DESENVOLVIMENTO DE UM ADESIVO PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS
CONTENDO MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE NITRATO DE MICONAZOL:
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor no curso de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais.

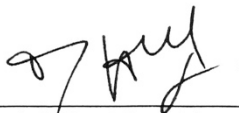
Ponta Grossa, 05 de fevereiro de 2016



Prof^a. Dr^a. Nara Hellen Campanha Bombarda - Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"



Prof. Dr. Daniel Rodrigo Herrera Morante
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

Andrés Felipe Cartagena Molina

NASCIMENTO 14.02.1987	Chaparral – Colômbia
FILIAÇÃO	Esperanza Molina Buitrago Felix Yimer Cartagena Valenzuela
2003 - 2008	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Nacional de Colômbia (UNAL) Bogotá D.C. – Colômbia
2010 - 2011	Curso de Especialização em Dentística EAP-ABOPG Ponta Grossa – Paraná
2010 – 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa - Paraná
2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) nível de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa – Paraná

Dedico esta obra, a Deus, por todas as oportunidades que tem colocado em meu caminho, e por ter me guiado a fazer escolhas que levaram a culminação deste processo e abrir constantemente novas perspectivas na minha vida...

Aos meus pais, que sempre procuraram meu bem-estar e sucesso. Serei eternamente agradecido pela vida, amor, ensinamentos e confiança...

A minha irmã, por sempre cuidar de mim e sempre me apoiar em meus sonhos. Ter uma parceira como você é uma das graças mais importantes da minha vida...

A minha namorada Sibelli Olivieri Parreiras pelo amor e apoio incondicional. Você é uma das pessoas mais maravilhosas que já conheci.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda, por ser um grande exemplo e inspiração em todos estes anos. Obrigado pela confiança, apoio e dedicação que me foi dada para a realização desta pesquisa; trabalhar ao lado de uma pessoa com sua integridade profissional e ética tem sido uma verdadeira honra.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pelo apoio fundamental e confiança que me proporcionou em cada etapa deste trabalho. Sem a infraestrutura de seu laboratório e conhecimentos não teríamos conseguido finalizar este trabalho. Muito obrigado Professor.

A Traudi Klein, por todos os ensinamentos e orientações no desenvolvimento de esta pesquisa. Sempre lembrarei da sua colaboração e gentileza.

Ao Dr. Milton Domingos Michél, e aos funcionários do CLABMU, muito obrigado pela ajuda, respeito e por sempre serem prestativos nas diferentes partes deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Esmerino, por contar sempre com sua ajuda, materiais e colaboração na elaboração dos diferentes testes microbiológicos desta tese.

A todos os estudantes de iniciação científica (Rogeyro, Alines, Giulia) e co-autores que fizeram possível a realização desta pesquisa. Muito obrigado por seu tempo e dedicação.

Aos professores Prof. Dr. João Carlos Gomes e Profa. Dra. Osnara Mongruel Gomes, pela oportunidade única que me foi dada. Vocês dois são sinônimo de dedicação, representando tudo aquilo que representa ser um professor universitário. Meu maior respeito e gratidão.

A todos meus amigos latinos (Eugenio, Daniel, Yileng, Alex, Lucho, Migueitol, Issis, Millan, Paula, Luisa, e Cindy) e brasileiros (Marcio, Stella, Vermelho, Marcelo, Noé, Leo, Lucas Scholz) com os quais tive a oportunidade de conviver e aprender todos

estes anos. Muito agradecido por me permitir ser parte de sua vida, sem dúvida vocês todos fazem parte da minha vida.

Aos meus companheiros do mestrado e doutorado em Odontologia (Thays, Viviane, Ana Cristina, Rosana, Reila, Antônio, Felipe Villa Verde, Juliana Schaia, Fabiana, Anna Luiza, Johana) e Ciências Farmacêuticas (Amanda Lyra, Amanda Urban, Jessica, Mona Lisa, Debora, Inês) foi uma grande oportunidade ter compartilhado com vocês tantos momentos de aprendizagem e conquistas. Desejo a todos vocês o maior sucesso.

Aos professores da Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial aos professores Prof. Dr. Alessandro Loguercio, Profa. Dra. Alessandra Reis, Prof. Dr. Fabio André do Santos e Prof. Dr. Abraham Lincoln Calixto. Muito obrigado pelos seus ensinamentos e amizade.

Aos funcionários da Pós-graduação em Odontologia (Morgana e Luiz), da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Betty e Jessica) e do Departamento de Odontologia pela ajuda e apoio em todos estes anos.

Aos meus grandes amigos e parceiros Camilo, Alfonso, Patrício, Benjamin, Edgar, Davila, Felipe Gutiérrez, Pailover, Miguel, Montenegro, Millan, Leandro e Milko. Levarei as melhores lembranças.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de ser um de seus estudantes. Será sempre uma grande satisfação ter sido parte desta grande Instituição.

Ao Programa PEC-PG da CAPES pela bolsa de estudos nos anos 2013-2016.

À Republica Federativa do Brasil, pela oportunidade única de realizar meus estudos de mestrado e doutorado em Odontologia.

Cartagena, AF. DESENVOLVIMENTO DE UM ADESIVO PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS CONTENDO MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE NITRATO DE MICONAZOL: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO. [Tese – Doutorado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Integrada – Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016]

RESUMO

A associação de próteses bem adaptadas com a presença tópica de antifúngicos é adequada abordagem terapêutica para estomatite protética (EP). Foi desenvolvido e avaliado um adesivo para prótese removível contendo nitrato de miconazol (NM) incorporado a micropartículas poliméricas muco-adesivas e/ou pH dependentes visando aumento de biodisponibilidade. Inicialmente, foram desenvolvidas micropartículas contendo 10% e 20% de NM, por *spray-drying*, utilizando os polímeros Gantrez MS-955 (G10, G20), Eudragit L-100 (E10, E20) ou ambos (EG10, EG20). Foi validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para se quantificar NM das micropartículas. Estas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios x, espectrometria de infravermelho por transformada em Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (CED), estudos de liberação *in-vitro* (porcentagem de dissolução/tempo e perfis de liberação) e atividade antifúngica. A seguir foram desenvolvidas formulações de um adesivo experimental para prótese (ACT) acrescido de 10% em peso das micropartículas (AE1, AG1, AEG1, AE2, AG2, AEG2) ou 2% do fármaco puro (AMN). Para todos adesivos determinou-se: concentração inibitória mínima (CMI) em *Candida albicans* (microdiluição em caldo e diluição em ágar); força adesiva (FA, entre superfícies acrílicas após 0,5, 1, 3, ou 6 h de imersão em água); e toxicidade em *Artemia salina* (24 h e 48 h), calculando-se concentração letal 50 (CL₅₀). O método de CLAE apresentou-se específico, linear ($r = 0,9992$), preciso, exato e robusto na faixa de 5 a 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com tempos de corrida e de retenção de 10,0 e 5,58 minutos, respectivamente. Todas as micropartículas mostraram aceitáveis valores de rendimento (37,22% – 55,36%) e de encapsulação (superiores a 89%). As micropartículas E10 e E20 apresentaram forma esférica e superfície lisa, enquanto EG20 possuíam a mesma forma, porém superfície rugosa. As micropartículas G10, G20 e EG20 apresentaram morfologia deprimida e crateras. Os diâmetros das micropartículas variaram entre 1,9 a 4,3 μm . Nenhuma ligação química foi observada entre o NM e os polímeros, através dos espectros de FTIR. A microencapsulação contribuiu para amorfizar o fármaco, segundo as análises térmicas e difração de raios X, reduzindo seu tempo de liberação. Ajustaram-se ao modelo cinético de liberação biexponencial o NM e as micropartículas G10, G20 e EG20, e ao modelo monoexponencial, as micropartículas E10, E20 e EG10. As micropartículas apresentaram eficiência antifúngica similar ao fármaco puro. Extratos dos adesivos contendo micropartículas e a formulação AMN apresentaram CMI entre 1,25 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (comparável a Daktarin®, 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foram verificadas diferenças significativas na FA para as formulações de adesivos avaliadas em função do tempo de imersão na água ($p < 0,001$), com tendência de aumento entre 1 h e 3 h, seguido de decréscimo ou estabilização até 6 h. A incorporação do NM e de micropartículas poliméricas não prejudicou a FA do adesivo experimental e AEG20 exibiu os melhores

resultados, apresentando elevados valores iniciais, e mantendo-os por 6 h. Todas as formulações de adesivos apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade (CL₅₀ de 349,53 a 931,00 µg.mL⁻¹). A formulação de adesivo para prótese removível proposta foi compatível com a incorporação de micropartículas poliméricas contendo NM.

Palavras-chave: Nitrato de Miconazol, Liberação controlada de Fármacos, Preparações Farmacêuticas Odontológicas, Adesivos a Tecidos, Estomatite sob Prótese, *Candida albicans*.

Cartagena, AF. DEVELOPMENT OF REMOVABLE DENTURE ADHESIVE CONTAINING MICONAZOLE NITRATE-POLYMERIC MICROPARTICLES: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION [Thesis – Doctorate in Dentistry - Integrate Clinic Area – State University of Ponta Grossa; 2016]

ABSTRACT

The combination of well-fitting dentures with topical antifungals is appropriate therapeutic approach for denture stomatitis (EP). It was developed and evaluated an adhesive for removable dentures containing miconazole nitrate (NM) incorporated into mucoadhesive and/or pH dependent polymer microparticles aiming at increasing bioavailability. Initially, microparticles have been developed containing 10% and 20% of NM, spray-drying, using Gantrez MS-955 polymer (G10, G20), Eudragit L-100 (E10, E20) or both (EG10, EG20). An analytical method by high-performance liquid chromatography (HPLC) to quantify NM of the microparticles was validated. Microparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), x-ray diffraction, Fourier-transformed infrared spectrometry (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), in-vitro release studies (percentage of dissolution / time, and release profiles) and antifungal activity. An experimental denture adhesive formulation (ACT) was developed containing 10% by weight of the microparticles (AE1, AG1, AEG1, AE2, AG2, AEG2) or 2% of pure drug (ANM). For all adhesives it was determined: minimum inhibitory concentration (MIC) for *Candida albicans* (microdilution and agar dilution); adhesive force (FA among acrylic surfaces after 0.5, 1, 3, or 6 h immersion in water); and toxicity to brine shrimp (24 h and 48 h) by calculating lethal concentration 50 (LC₅₀). The HPLC method was proven specific, linear ($r = 0.9992$), precise, accurate and robust in the range 5-90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, with running and retention times of 10.0 and 5.58 minutes, respectively. All microparticles showed acceptable performance (37.22% - 55.36%) and encapsulation (over 89%) values. E10 and E20 microparticles showed spherical and smooth surface, while EG20 had similar shape, but rough surface. G10, G20 and EG20 had depressed craters and morphology. The diameters of the microparticles ranged from 1.9 to 4.3 micrometers. No chemical bond was observed between the MN and the polymers through the FTIR spectra. Microencapsulation contributed to the drug amorphization, according to thermal analysis and X-ray diffraction, reducing the release time. NM and the G10, G20 and EG20 microparticles fitted the biexponential release kinetic model and the microparticles E10, E20 and EG10 fitted to mono-exponential model. The microparticles showed antifungal efficiency similar to pure drug. Extracts of the adhesives containing the microparticles and ANM showed MIC of 1.25 to 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (comparable to Daktarin®, 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Significant differences in AF for adhesive formulations evaluated as a function of immersion time in water were observed ($p < 0.001$), with an upward trend between 1 h and 3 h, followed by reduction or stabilization up to 6 h. The incorporation of NM and polymeric microparticles did not affect the FA of the experimental adhesive and AEG20 showed the best results, with high initial values, and holding them for 6 h. All adhesive formulations showed low or no toxicity (LC₅₀ 349.53 to 931.00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The proposed denture adhesive formulation was proven compatible with the incorporation of polymeric microparticles containing NM.

Key Words: miconazole nitrate, drug liberation, dental pharmaceutical-preparations, tissue adhesives, denture stomatitis, *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Merck-Hitachi Lachrom.	25
FIGURA 2	Estrutura química do fármaco e dos polímeros utilizados, (A) NM, (B) Eudragit L-100, (C) Gantrez MS-955 na obtenção das micropartículas poliméricas	27
FIGURA 3	Esquema de obtenção das soluções/suspensões das formulações contendo NM, Eudragit L-100 e/ou Gantrez MS-955.....	29
FIGURA 4	Esquema de obtenção de micropartículas poliméricas contendo NM pelo método de spray-drying.....	30
FIGURA 5	Dissolutor de cubas	33
FIGURA 6	Avaliação e mensuração dos halos de inibição em ágar Muller-Hinton com glucose 2%.....	35
FIGURA 7	Formulação de adesivo para prótese sendo desenvolvido em agitador mecânico a vácuo a 2400 rpm.....	37
FIGURA 8	Cilindros de resina acrílica posicionados em maquina de ensaios universais.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo NM	28
Tabela 2	Reagentes utilizados na preparação de saliva artificial.....	33
Tabela 3	Descrição da formulação de adesivo em creme para prótese..	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
±	Mais ou menos
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CED	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
E	Eudragit L-100
EP	Estomatite protética
G	Gantrez MS-955
g	Grama
h	Hora
H ₂ O	Água
ICH	International conference on harmonisation
°K	Graus kelvin
KBr	Bromuro de potássio
KCl	Cloreto de cálcio
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mA	Miliampere
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Newton
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Fosfato de sódio bibásico heptahidratado
NaF	Fluoreto de sódio
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
NM	Nitrato de miconazol
nm	Nanômetro
PTFE	Politetrafluoretileno
rpm	Revoluções por minuto
S	Declive
SCF	Sistema de classificação farmacêutica
UV	Ultra violeta
v	Volume
δ	Desvio padrão da resposta
λ	Longitude de onda
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	PROPOSIÇÃO.....	21
2.1	PROPOSIÇÃO GERAL.....	21
2.2	PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	EXPERIMENTO 1.....	23
3.1.1	Materiais.....	23
3.1.2	Equipamentos e condições cromatográficas.....	24
3.1.3	Preparo das micropartículas poliméricas contendo NM.....	24
3.1.4	Preparo das solução padrão.....	24
3.1.5	Validação do método analítico.....	25
3.1.6	Eficiência de encapsulação.....	26
3.2	EXPERIMENTO 2.....	27
3.2.1	Obtenção de sistemas de micropartículas poliméricas.....	27
3.2.2	Rendimento.....	30
3.2.3	Determinação do conteúdo de NM.....	30
3.2.4	Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados.....	31
3.2.4.1	Análises morfológicas e de superfície.....	31
3.2.4.2	Difração de raios x.....	31
3.2.4.3	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho.....	32
3.2.4.4	Análise térmica.....	32
3.2.5	Estudo de liberação in vitro.....	32
3.2.6	Avaliação dos perfis de liberação.....	33
3.2.7	Atividade antifúngica.....	35

3.3	EXPERIMENTO 3.....	36
3.3.1	Desenvolvimento de adesivo para prótese.....	36
3.3.2	Incorporação de micropartículas poliméricas de NM.....	37
3.3.3	Avaliação Microbiológica.....	37
3.3.4	Avaliação de Força Adesiva.....	38
3.3.5	Avaliação da Toxicidade.....	39
4	CAPÍTULOS	41
4.1	CAPITULO 1.....	42
4.2	CAPITULO 2.....	58
4.3	CAPITULO 3.....	82
5	DISCUSSÃO.....	99
6	CONCLUSÕES.....	106
7	REFERÊNCIAS.....	108

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis (Emami et al.¹ 2012, Barbeau et al.² 2003). Os pacientes acometidos podem-se queixar de sensação de queimação, paladar desagradável e desconforto, mas a maioria dos casos é assintomática encontrando-se muitas vezes indivíduos sem conhecimento da doença. Apresenta três diferentes manifestações clínicas classicamente categorizadas de acordo com a severidade da inflamação: inflamação localizada ou pontos hiperêmicos (tipo I); eritema difuso (tipo II); e hiperplasia papilar do palato (tipo III) (Newton³ 1962).

O desenvolvimento da EP apresenta uma característica multiparamétrica: idade avançada, doenças sistêmicas, tabagismo, uso das próteses durante o sono, redução do fluxo salivar, trauma provocado pela falta de retenção e estabilidade da prótese. Além destes fatores locais, a utilização de materiais de base, reembasamento e adesivos para próteses têm sido considerados como fatores associados à EP devido a colonização de espécies do gênero *Candida*, com posterior aumento da rugosidade superficial e acúmulo de exotoxinas e produtos metabólicos no material. (Barbeau et al.² 2003, Sanita et al.⁴ 2012, Iacopino e Wathen⁵ 1992, Budtz-Jorgensen⁶ 1974, Radford et al.⁷ 1999, Webb et al.⁸ 1998). Apesar de todos esses fatores contribuintes, o fungo *Candida albicans* se caracteriza como o principal fator etiológico de EP. Apesar da predominância da *C. albicans* (Sullivan et al.⁹ 1999, Rodrigues et al.¹⁰ 2004), espécies não-albicans de *Candida* tais como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* têm emergido como colonizadores e patógenos causando infecções orais superficiais e sistêmicas (Sullivan et al.⁹ 1999, Coleman et al.¹¹ 1993, Jabra-Rizk et al.¹² 1999, Gutierrez et al.¹³ 2002, Vargas e Joly¹⁴ 2002).

A incidência de infecção por *Candida spp.* tem aumentado nos últimos anos devido ao aumento do uso, por vezes indiscriminado, de antibióticos de amplo-espectro e ao número aumentado de indivíduos infectados por HIV e imunossuprimidos (Vargas e Joly¹⁴ 2002, Crist et al.¹⁵ 1996, Latouche et al.¹⁶

1997, Heelan et al.¹⁷ 1998, Badoc et al.¹⁸ 2002). O Nitrato de Miconazol (NM) é um antifúngico triazol de amplo espectro, de primeira eleição que tem sido empregado em tratamentos de candidíases desde 1970 (Sawyer et al.¹⁹ 1975, Bouckaert et al.²⁰ 1992, Mandal²¹ 2000). Este antimicrobiano é catalogado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCF) como classe II, apresentando baixa solubilidade em água e alta permeabilidade. Este antifúngico inibe a enzima citocromo P450 14 α -desmetilase, o que leva à inibição da síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana da célula fúngica (Yoshida²² 1988). Microbiologicamente tem demonstrado atividade in vitro contra várias espécies de *Candida*. Entretanto, resistência tem sido relatada em até 17% para *C. albicans* e 45% para as espécies não albicans (Manfredi et al.²³ 2006). Atualmente, é um antifúngico indicado para o tratamento da EP para uso tópico na formulação em gel a 2% (Neppelenbroek et al.²⁴ 2008).

Nas áreas médica e odontológica, micropartículas poliméricas tem sido bem estudadas para a liberação controlada de fármacos. Sistemas de liberação baseados em encapsulação encontram-se como solução as necessidades de terapia farmacológica tais como, aumento da meia-vida de circulação sistêmica, liberação controlada, disposição prioritária do fármaco aos tecidos ou baixa solubilidade como no caso do NM (Akhter et al.²⁵ 2013, Davis e Illum²⁶ 1988). Fármacos encapsulados em microcápsulas são liberados por difusão através da barreira de polímero, por erosão deste material, ou por uma combinação de ambos (Sosnik, Alejandro e Seremeta²⁷ 2015, Vehring²⁸ 2008). Esta liberação pode ser melhorada pela utilização de polímeros funcionais que sejam dependentes do pH, inibidores de enzimas, altamente permeáveis, e/ou possuam propriedades muco-adesivas (Quan et al.²⁹ 2008, Rizi et al.³⁰ 2011). Entretanto, polímeros pH dependentes e muco-adesivos mostram-se de maior interesse para terapias na cavidade oral.

Clinicamente, a dosagem convencional para a entrega de agentes ativos como o NM e outros antifúngicos na cavidade oral são muitas vezes impedidas pelo tempo de permanência da formulação aplicada (Steinberg e Friedman³¹ 1999, Nafee et al.³² 2003). Fatores como a salivação, o reflexo da deglutição, a fala, a mastigação, e a passagem do bolo alimentar podem afetar o

deslocamento ou a diluição da dosagem (Cardot et al.³³ 2004, Madgulkar et al.³⁴ 2009, Chinna Reddy et al.³⁵ 2011). Assim, os tempos curtos de permanência de formulações no seu local de ação podem resultar em biodisponibilidade reduzida do agente ativo (Gupta et al.³⁶ 1993). Em vista disto, a ingestão constante, além de ser desnecessária por sua baixa absorção sistêmica, poderia levar a terapias antifúngicas crônicas em doses elevadas, potencializando seus efeitos adversos e a resistência dos agentes causais na terapia (Cardot et al.³³ 2004). Formulações bio-adesivas (géis, adesivos, filmes, e pomadas) tem sido uma alternativa estudada com grande interesse nos últimos 30 anos para solucionar estes inconvenientes. Estas formulações são propostas para atuar em áreas específicas da mucosa, incrementando assim a absorção do princípio ativo e posteriormente o aumento do seu efeito local, pela prolongação do tempo e o melhor contato entre a formulação na área específica (Madgulkar et al.³⁴ 2009).

Atualmente, a utilização de adesivos para próteses removíveis é indicada para pacientes que apresentam grande perda de osso alveolar, diminuição na salivagem ou novos portadores de próteses removíveis (Papadiochou et al.³⁷ 2015). Quando esses materiais são adequadamente indicados e utilizados, fornecem ao paciente melhor adaptação, conforto, habilidade mastigatória e segurança (Papadiochou et al.³⁷ 2015, Adisman³⁸ 1989, Coates³⁹ 1995, Grasso⁴⁰ 1996). Comercialmente encontram-se várias opções de adesivos para prótese, entretanto o cirurgião dentista encontra-se mais familiarizado para indicar a utilização da formulação em creme (Han, J. M. et al.⁴¹ 2014). Estes cremes muco-adesivos são compostos por uma mistura de ingredientes ativos que lhes conferem propriedades adesivas (gomas naturais, pectinas, gelatina, metil celulose, carboximetil celulose de sódio e polímeros sintéticos) e não ativos (vaselina líquida e sólida e óxido de polietileno) que agem como materiais de ligação para facilitar sua aplicação (Han, J. M. et al.⁴¹ 2014). A resistência adesiva e tempo de permanência são as características mais importantes dos adesivos para prótese. Usualmente é indicado seu uso entre 12 e 16 horas sem reaplicação, tempo no qual deveria conservar suas qualidades adesivas (Adisman³⁸ 1989). Alguns estudos relatam que adesivos em creme para prótese são realmente efetivos até 8 horas, estando seu pico máximo de retenção entre 2-4 horas seguidas a sua aplicação (Grasso⁴⁰ 1996, Ozcan et al.⁴² 2005).

Entretanto, apenas um estudo explorou a capacidade dos adesivos para prótese como formulações para o carregamento de agentes antimicrobianos no tratamento da EP, tirando proveito do tempo de permanência na área afetada, em comparação às formulações convencionais (géis) (Scher et al.⁴³ 1978).

Alguns estudos investigaram o efeito de adesivos para próteses sobre a colonização por micro-organismos e não encontraram efeitos inibitórios sobre bactérias orais de amostras de saliva ou culturas puras (Bartels⁴⁴ 1945, Stafford e Russell⁴⁵ 1971). Makihiro et al. (Makihiro et al.⁴⁶ 2001) verificaram que duas, de seis marcas comerciais de adesivos para próteses avaliadas, inibiram o crescimento de *C. albicans* e uma delas inibiu *C. tropicalis*. Ozcan et al. (Ozcan et al.⁴² 2005) investigaram a microbiota do palato, da prótese e da saliva de indivíduos saudáveis que receberam novas próteses totais, metade dos quais foram instruídos a utilizar um adesivo para próteses em pó durante dois meses. Os autores verificaram que o uso de adesivos não promoveu alterações significativas na microbiota bucal. Além disso, a utilização de gomas naturais ou adesivos poliméricos sintéticos eliminou quase a totalidade das irritações teciduais inicialmente presentes em alguns pacientes (Pradies et al.⁴⁷ 2009). Nesse último estudo citado, os autores sugerem que o efeito positivo dos adesivos não foi obtido pela inibição do crescimento do micro-organismo “per se”, mas sim que a melhora da inflamação promoveu a redução da contagem microbiológica. Em uma observação in vivo, Scher et al. (Scher et al.⁴³ 1978) investigaram o efeito da incorporação de anfotericina ao adesivo para próteses sobre a *C. albicans* e a EP, a qual foi reduzida nos pacientes que utilizaram os adesivos com ou sem o antifúngico. Foi verificado que o uso regular desses materiais por portadores de próteses removíveis não foi associado ao aumento da incidência de irritação tecidual da fibromucosa bucal, além de prover benefícios físicos e psicológicos para os indivíduos.

Os resultados anteriormente relatados indicam uma associação entre EP e falta de estabilidade e retenção das próteses. Assim, abordagens terapêuticas que associem a disponibilidade de antifúngicos no local acometido pela EP à melhoria da retenção, estabilidade e suporte das próteses podem

potencialmente ser bem sucedidas (Milton Rocha Gusmao e Pereira⁴⁸ 2013). Devido ao fato de que a disponibilidade de antifúngicos na cavidade bucal, é limitada pelos motivos expostos anteriormente, uma opção potencialmente viável para o tratamento da EP nesses pacientes seria a incorporação temporária de antifúngicos aos adesivos para próteses. Assim, a utilização de formulações de liberação controlada que permitam uma adequada biodisponibilidade do agente antimicrobiano, a utilização de formulações muco-adesivas para permitir um maior tempo de contato do antifúngico na área afetada, ou a combinação de ambas estratégias, são opções que poderiam ser de interesse no tratamento da EP que até o momento não foram estudadas.

Neste sentido, o presente trabalho foi delineado para o desenvolvimento de sistemas poliméricos de micropartículas de NM objetivando um aumento da solubilidade quando incorporados a adesivos em creme para prótese, visando aumentar a eficiência clínica no tratamento da EP, sem afetar sua eficiência adesiva ou aumentar sua toxicidade.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

2.1.1 Desenvolver e avaliar um adesivo em creme para prótese, contendo nitrato de miconazol (NM) incorporado em micropartículas poliméricas muco-adesivas e/ou pH dependentes visando um aumento da biodisponibilidade do princípio ativo.

2.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

2.2.1 Desenvolver micropartículas poliméricas de NM utilizando polímero dependente do pH 6,8 (Eudragit L-100) e/ou bioadesivo (Gantrez MS-955) pelo método de secagem por pulverização (*spray-drying*);

2.2.2 Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de NM;

2.2.3 Quantificar o NM contido em micropartículas poliméricas de Eudragit L-100 e Gantrez MS-955 obtidas por *spray-drying*, utilizando o método de CLAE validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco.

2.2.4. Caracterizar as micropartículas poliméricas obtidas por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;

2.2.5 Avaliar o perfil de liberação in vitro do NM encapsulado nas micropartículas poliméricas de Eudragit L-100 e Gantrez MS-955, por meio de ensaios de dissolução;

2.2.6 Avaliar o efeito antifúngico das micropartículas poliméricas por meio de testes microbiológicos in vitro.

2.2.7. Desenvolver uma formulação de adesivo em creme para prótese compatível com a incorporação de micropartículas poliméricas para liberação controlada de NM.

2.2.8 Avaliar a influência da incorporação de micropartículas poliméricas de NM no efeito antifúngico, adesivo e tóxico de uma nova formulação de adesivo para prótese como terapia na estomatite protética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido didaticamente em três experimentos:

- Experimento 1: Desenvolvimento e validação de um método analítico usando cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de nitrato de miconazol em micropartículas poliméricas obtidas pelo método *spray-drying*.
- Experimento 2: Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas bio-adesivas e pH dependentes, obtidas pelo método *spray-drying* contendo nitrato de miconazol.
- Experimento 3: Efeito da incorporação de micropartículas bio-adesivas e pH dependentes de nitrato de miconazol em adesivos para prótese: atividade antifúngica, resistência adesiva e toxicidade.

3.1 EXPERIMENTO 1 - Desenvolvimento e validação de um método analítico usando cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de nitrato de miconazol em sistemas de micropartículas poliméricas obtidas pelo método *spray-drying*.

3.1.1 Materiais

Todos os materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento e validação do método cromatográfico, bem como os utilizados no preparo das formulações das micropartículas NM podem ser observados a seguir:

- Nitrato de miconazol, 1-(2,4-dicloro- β -[(2,4-diclorobencil)oxi]fenetil) imidazol, ($C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$) (98,0% de pureza, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA)
- Poli (ácido metacrílico-co-metacrilato de metilo) 1:1 (Eudragit L-100) (M_w 125.000 g.mol⁻¹, Evonik Industries, Essen, Alemanha)
- Ácido 2-butenodióico (2Z) -, polímero com eteno de metilo, sal de sódio de cálcio (Gantrez MS-955) (M_w 790.000 g.mol⁻¹, ISP, Wilmington, Delaware, EUA)
- Álcool metílico grau HPLC (CH₃OH) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA)

- Acetonitrila grau HPLC (CH₃CN) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA)
- Álcool etílico P.A. (EtOH) (99,8% de pureza, SYNTH, Diadema, Brasil)

3.1.2 Equipamento e condições cromatográficas

No desenvolvimento deste método analítico por CLAE foi utilizado o equipamento Merck-Hitachi Lachrom (Hitachi High Technologies America, Inc. Tóquio, Japão) (Figura 1) equipado com uma bomba quaternária L-7100, módulo detector UV L-74000 e uma interface D-7000 integrada com degassificador. Utilizou-se um sistema de injeção manual (Rheodyne, Rohnert Park, Califórnia, EUA) equipado com um injetor de 20 µL e uma seringa de 100 µL. O software de cromatografia ChromQuest 5.0 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foi usado para a coleta de dados e cálculo. A separação foi realizada numa coluna analítica de fase reversa GL Sciences Inertsil® ODS3 (GL Science, Torrance, California) (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100Å) e um sistema de pré-coluna GL Sciences Inertsil® ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 µm, 100Å) à temperatura ambiente. A fase móvel consistiu em metanol, acetonitrila e água (60:30:10) a uma taxa de fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A fase móvel foi filtrada através de um filtro de membrana politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, 0,45 mm x 25 mm, Machery-Nagel, Düren, Alemanha) de 0,45 µm e desgaseificada antes do uso.

O comprimento de onda selecionado para o estudo de CLAE foi 232 nm. Assim, as condições cromatográficas foram otimizadas para a resolução do pico de NM fazendo variar a composição e a proporção da fase móvel e fluxo.

3.1.3 Preparo das micropartículas poliméricas contendo NM

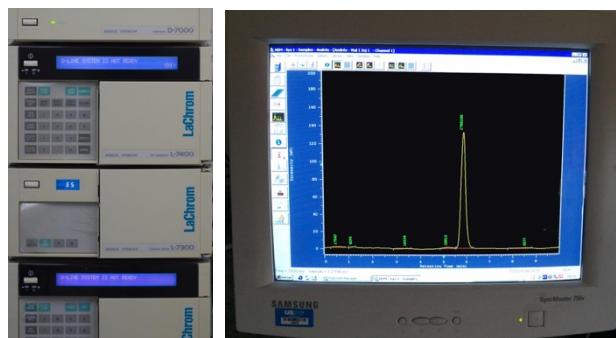
O método de obtenção das micropartículas poliméricas de NM por *spray-drying* será relatado no experimento 2 (seção 3.2.1)

3.1.4 Preparo das solução padrão

A solução padrão de estoque de NM (500,0 µg.mL⁻¹) foi preparada diariamente por dissolução de uma quantidade apropriada de NM (5 mg) na fase móvel. Adicionalmente, esta solução de estoque foi diluída novamente em uma quantidade de fase móvel para obter seis soluções padrão de trabalho diferentes

entre 5,0 a 90,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Seguindo a isto, todas as soluções foram filtradas através de um filtro de membrana de PTFE antes da injeção no sistema do CLAE.

Figura 1 -.Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Merck-Hitachi Lachrom (Hitachi High Technologies America, Inc. Tóquio, Japão).



Fonte: o autor

3.1.5 Validação do método analítico

A validação foi realizada de acordo com as diretrizes para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos publicadas pela ANVISA ⁽⁴⁹⁾ 2003) e o *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH⁵⁰ 1996) seguindo-se os critérios de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas da solução de micropartículas sem fármaco (controle negativo) em comparação com os obtidos para as formulações que contêm o NM. Assim, o objetivo desta análise foi confirmar que nenhum dos polímeros (Eudragit L-100, e/ou Gantrez MS-955) interferem com a quantificação do medicamento.

A linearidade foi determinada pela curva de calibração obtida a partir da análise de CLAE das soluções padrão de NM (5,0-90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, n = 3). Os resultados experimentais foram graficamente traçados, obtendo-se uma curva de calibração. Análises por regressão linear e de variância (ANOVA) foram realizadas para obter a inclinação e outras estatísticas das curvas de calibração.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão da resposta (δ) e a inclinação (S) ("slope"), da curva de calibração utilizando a Equação 1 e 2.

$$LD = 3,3 \times \frac{\delta}{S}$$

(Equação 1)

$$LQ = 10 \times \frac{\delta}{S}$$

(Equação 2)

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária. O desvio-padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) de seis injeções na concentração de ensaio ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas e avaliadas intra-dia, inter-dia e com a colaboração de um analista diferente.

A exatidão foi realizada utilizando nove soluções em três níveis de concentração: baixa, intermédia e alta ($20,0$, $40,0$ e $60,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata. O valor da concentração média foi comparado com o valor teórico (100%).

A robustez foi determinada após variações na taxa de fluxo no equipamento: $0,995$ e $1,005 \text{ mL.min}^{-1}$ e a influência de variações na composição da fase móvel: metanol, acetonitrila, água (v:v:v) $61:29:10$, e $59:31:10$. Com os dados obtidos foram realizados ANOVA e teste de Tukey para avaliar o efeito da variação do fluxo nos resultados da análise por CLAE.

3.1.6 Eficiência de encapsulação

Quantidade apropriada de micropartículas equivalente a 5 mg de NM foi colocada em balão volumétrico contendo 10 mL da fase móvel. A solução obtida foi agitada num agitador magnético por 12 h e posteriormente submetida a ultrasson por 30 min . Esta solução foi então filtrada através de um filtro de membrana PTFE e diluída para $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com a fase móvel. A eficiência de encapsulação (EE) das micropartículas de NM foi então calculada utilizando a Equação 3 a partir dos resultados da CLAE fornecidas após as injeções das amostras, em triplicata (Li, M. et al.⁵¹ 2008).

$$EE (\%) = \frac{\text{massa do nitrato do miconazol nas partículas}}{\text{mass inicial (teórica) do nitrato de miconazol}} \times 100$$

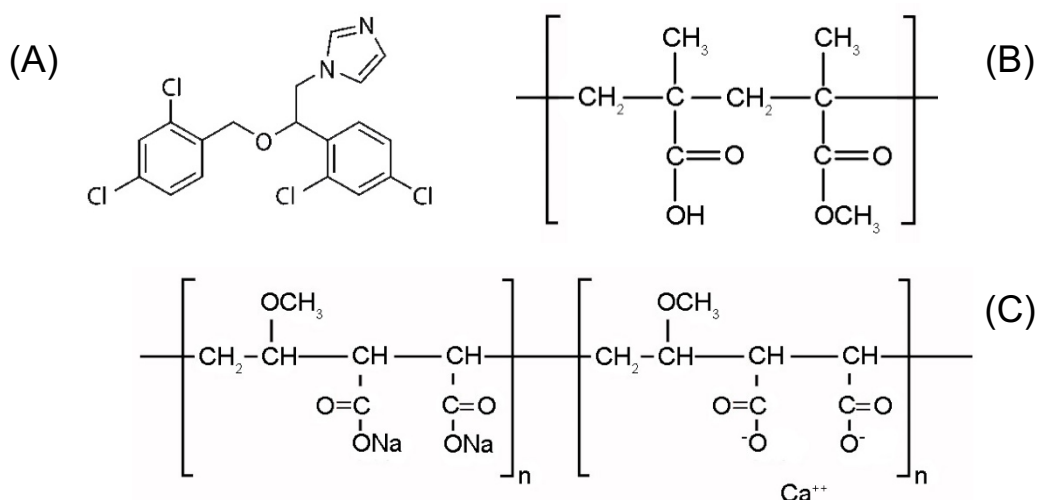
(Equação 3)

3.2 EXPERIMENTO 2 - Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas bio-adesivas e pH dependentes, obtidas pelo método do *spray-drying* contendo Nitrato de miconazol

3.2.1 Obtenção de sistemas de micropartículas poliméricas

Micropartículas poliméricas contendo nitrato de miconazol (NM) (Figura 2A) foram preparadas pelo procedimento de *spray-drying*. A partir dos polímeros Eudagrit L-100 (copolímero do ácido metacrílico Tipo A) (E) (Figura 2B) e Gantrez MS-955 (copolímero de sódio e sal de cálcio de metil vinil éter/anidrido maleico) (G) (Figura 2C) e a mistura dos mesmos (EG 1:1) foram conformadas nove formulações de micropartículas poliméricas, segundo a concentração do NM incorporado: formuladas sem (0), com 10% (10), e com 20% de fármaco (20). As formulações das micropartículas estão indicadas na Tabela 1.

Figura 2 - Estrutura química do fármaco e dos polímeros utilizados, (A) NM, (B) Eudragit L-100, (C) Gantrez MS-955 na obtenção das micropartículas poliméricas.



Fonte: o autor

Para o preparo dos sistemas poliméricos E0, E10 e E20, o polímero Eudragit L-100 e o NM foram dissolvidos lentamente no solvente orgânico sob agitação mecânica ($5.000 \text{ rev.min}^{-1}$). Após realizada a diluição do polímero e fármaco, a fase aquosa foi adicionada, formando assim uma solução/suspensão (Figura 3).

Para o preparo dos sistemas poliméricos contendo o polímero Gantrez MS-955 (G0, G10 e G20), o polímero foi dissolvido na fase aquosa (5.000 rev.min⁻¹), e o fármaco NM foi dissolvido separadamente na fase orgânica (5.000 rev.min⁻¹). Uma vez realizada a diluição completa do polímero, esta solução foi acrescentada lentamente na fase orgânica (Figura 3).

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo NM.

Composição	Formulação								
	E0	E10	E20	G0	G10	G20	EG0	EG10	EG20
Fase Aquosa									
Água (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Fase orgânica									
NM (g)	--	0,8	1,6	--	0,8	1,6	--	0,8	1,6
Eudagrit L-100 (g)	4,0	7,2	6,4	--	--	--	4,0	3,6	3,2
Gantrez MS-955	--	--	--	4,0	7,2	6,4	4,0	3,6	3,2
Etanol (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0

NM: nitrato de miconazol

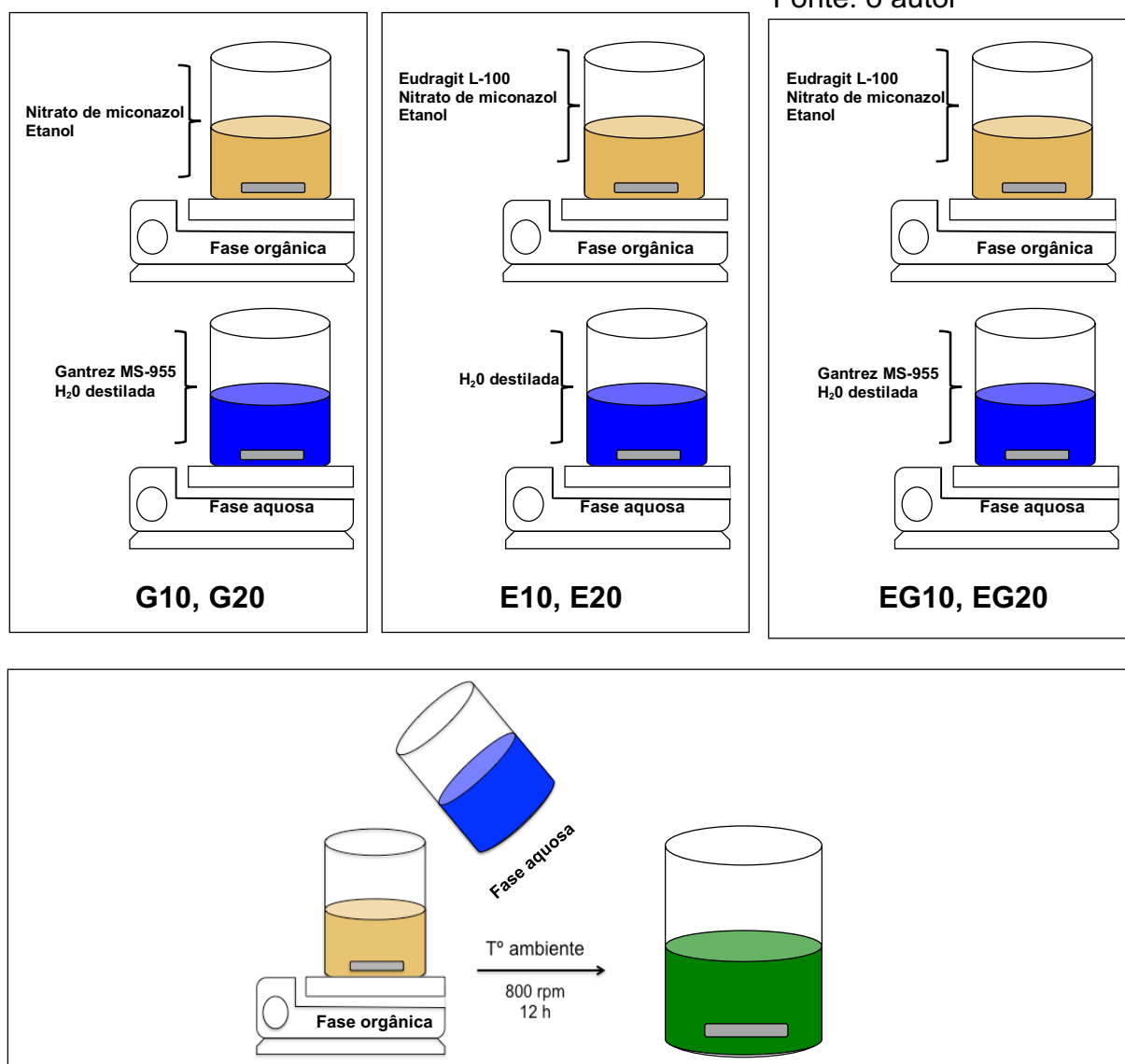
Fonte: o autor

Na preparação das formulações EG0, EG10 e EG20, o polímero Eudragit L-100 foi dissolvido na fase orgânica junto com o agente antifúngico, e de forma separada foi dissolvido o polímero Gantrez MS-955 na fase aquosa. Uma vez realizada a diluição dos polímeros nos seus respectivos solventes, foi realizada a mistura das fases orgânica e aquosa sob agitação mecânica.

Para todas as formulações realizadas neste estudo, a solução/suspensão obtida foi mantida em agitação mecânica (800 rev.min⁻¹) e protegidas da luz, à temperatura ambiente, por 4 horas (Figura 3).

Figura 3 - Esquema de obtenção de soluções/suspensão de formulações contendo NM, Eudragit L-100 e/ou Gantrez MS-955.

Fonte: o autor

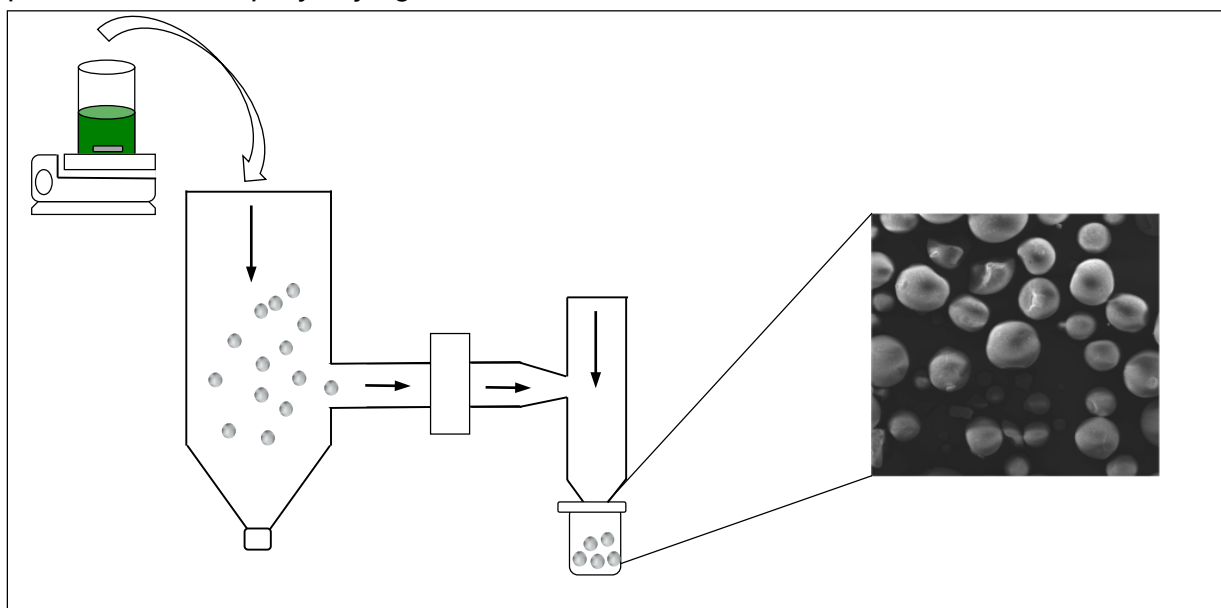


Transcorrido o tempo de agitação, a solução de micropartículas foi levada ao equipamento de *spray-dryer* MSD-0,5-mini-secador por pulverização (Labmaq do Brasil Ltda, Brasil) com um bico de 0,5 milímetros padrão. A temperatura de entrada foi mantida a 60 °C, a taxa de fluxo entre 5-6 mL.min⁻¹, o fluxo de ar comprimido de pulverização a 40 L.min⁻¹ e pressão do ar a 1,5 m³.min⁻¹ (Figura 4). As formulações obtidas foram mantidas em estufa a 35 ± 2 °C. Após isso, as formulações foram armazenadas em temperatura ambiente. Todas as formulações foram desenvolvidas em triplicata.

Misturas físicas entre os polímeros utilizados e o NM foram preparadas para uma caracterização comparativa dos sistemas microparticulados em

estudo. Dessa forma ambos foram pesados e misturados com auxílio de uma espátula na proporção, em massa, de 1:5 (20%) e 1:10 (10%) (NM:polímeros) conformando uma mistura simples e homogênea .

Figura 4 - Esquema de obtenção de micropartículas poliméricas contendo NM pelo método de *spray-drying*.



Fonte: o autor

3.2.2 Rendimento

O rendimento do processo de microencapsulação (R%) foi calculado pela razão em massa de micropartículas obtidas em relação à quantidade de fármaco e polímero utilizados no preparo, conforme apresentado na Equação 1.

$$R\% = \frac{\text{massa obtida de micropartículas}}{\text{massa inicial (polímero + nitrato de miconazol)}} \times 100$$

(Equação 1)

3.2.3 Determinação do conteúdo de NM

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas foi determinada para todas as formulações elaboradas, a partir de ensaios de quantificação desenvolvidos por CLAE, em equipamento Merck-Hitachi Lachrom dotado de detector na região do ultravioleta, conforme os seguintes parâmetros:

- Detecção: UV ($\lambda=232$ nm)
- Fluxo: 1,0 mL.min⁻¹
- Coluna: GL Sciences Inertsil® ODS3 (Torrance, California, EUA), 150 mm × 4.6 mm, 5 μ m.
- Fase móvel: metanol:acetonitrila:água: (60:30:10)
- Volume de injeção: 20 μ L

Estas condições previamente foram submetidas ao processo de validação analítica, conforme descritas no Experimento 1.

3.2.4. Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados

3.2.4.1 Análises morfológicas e de superfície

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas obtidas, do fármaco puro e dos polímeros utilizados foi realizado em microscópico eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu Co., Murasakino, Quioto, Japão). As amostras foram colocadas sobre stubs metálicos e submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu Co., Murasakino, Quioto, Japão). Micrografias foram obtidas em diferentes magnificações (2400X, 2700X e 3500X) com voltagem de aceleração entre 10 e 20 kV. A distribuição do tamanho médio das partículas foi estimada a partir da medida de cerca de 200 partículas em uma área escolhida arbitrariamente em micrografias ampliadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

3.2.3.2 Difração de raios X

Com a intenção de verificar as características do NM e os sistemas microparticulados obtidos, amostras de cada formulação foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000 (Shimadzu Co., Murasakino, Kioto, Japão), scan de 5° a 80°, a uma taxa de varredura de 2°.min⁻¹, corrente de 40 kV e voltagem 40 mA para a observação de picos indicativos de cristalinidade.

3.2.4.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

Os sistemas de micropartículas poliméricas e separadamente os materiais que foram utilizados na sua composição foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), para caracterização estrutural das entidades químicas. Para isso, usou-se uma pastilha com brometo de potássio (KBr) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% em massa), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu Co., Murasakino, Quioto, Japão), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por FTIR das micropartículas foram avaliados frente aos espectros do fármaco, dos polímeros de partida e das misturas físicas na procura de possíveis interações químicas entre estes após o processo de spray-drying.

3.2.4.4 Análise térmica

A curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi elaborada para avaliar as possíveis mudanças de aparência, deslocamento ou desaparecimento dos efeitos endotérmicos e exotérmicos do NM, os polímeros Eudragit L-100 e Gantrez MS-955, mistura física e para todos os sistemas de micropartículas obtidos, na faixa de temperatura entre 303 K (20°C) e 623 K (400°C). Foi utilizada uma célula calorimétrica da marca Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, EUA), modelo DSC-4000, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, estando a amostra numa cápsula de alumina.

3.2.5 Estudo de liberação in vitro

Os ensaios de liberação in vitro foram conduzidos para o NM, e para os sistemas de micropartículas poliméricos. Foi empregado o aparato 2 (pá) do dissolutor de cubas 299/6 (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) (Figura 5), mantendo a temperatura do sistema em 37 ± 0,5°C, a agitação em 75 rev.min⁻¹, por um período total de 25 h. O meio de dissolução utilizado foi saliva artificial (Tabela 2) e 1% de lauril sulfato de sódio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/67542) como tensoativo, em volume de 600 mL. Em intervalos de

tempo pré-determinados (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 330, 420, 510, 630, 810 e 1500 min), amostras de 1000 μL foram coletadas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume, e analisadas no CLAE segundo a método analítico desenvolvido no Experimento 1.

Figura 5 - Dissolutor de cubas.



Fonte: o autor

O valor da porcentagem de dissolução foi obtido a partir da quantidade de fármaco liberado, a partir de um valor de correção que foi aplicado devido à diluição cumulativa causada pela coleta das amostras.

Tabela 2- Reagentes utilizados na preparação de saliva artificial

Reagente	Fabricante/Lote	(g.L ⁻¹)
NaF, P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/42953	0,0044
MgCl ₂ , P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/112987	0,06
CaCl ₂ , P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/10257	0,17
KCl, P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/23564	0,62
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O, P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/105427	4,82
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O, P.A.	Synth, Diadema, São Paulo, Brasil/93438	4,04

Fonte: (Reinke et al.⁵² 2014).

3.2.6 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação in vitro foram obtidos plotando-se a porcentagem de NM liberado em função do tempo. Posteriormente, esses resultados foram

analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução [ED]) (Equação 4) e dos métodos modelo-dependentes utilizando o software MicroMath Scientist® 2.01 (Salt Lake City, Utah, EUA). Os dados foram ajustados aos modelos monoexponencial (Equação 5), biexponencial (Equação 6), ordem zero (Equação 7) e Weibull (Equação 8). A seleção do modelo mais adequado foi baseada no valor de r , no critério de seleção do modelo (MSC) e no melhor ajuste gráfico.

$$ED = \frac{AUC}{AUC_{total}} \times 100$$

(Equação 4)

Na qual: ED é a eficiência de dissolução, AUC é a área sob a curva de dissolução em função do tempo e AUC_{total} é a área total do retângulo definido por 100% de dissolução e pelo tempo limite do ensaio.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt})$$

(Equação 5)

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$$

(Equação 6)

$$\%D = kt$$

(Equação 7)

$$\%D = 100[1 - e^{-(t/T_d)^b}]$$

(Equação 8)

Na qual: %D, percentual do fármaco dissolvido no tempo t ; k , α e β , constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B, concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; T_d , tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b , parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

O modelo semi-empírico e Korsmeyer-Peppas (Equação 9) foi aplicado para obter os parâmetros a e n , e assim poder obter uma maior informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco e as formulações obtidas.

$$ft = at^n$$

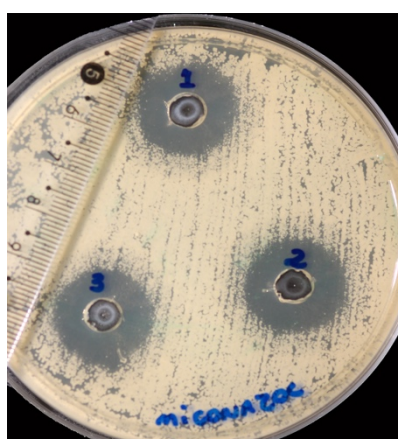
(Equação 9)

Na qual: a , constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n , expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft , fração do fármaco dissolvido no tempo t .

3.2.7 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica do fármaco e dos sistemas de micropartículas poliméricas foi avaliada pelo método de difusão em ágar. Placas de petri contendo o meio Muller-Hinton com glicose 2% foram inoculadas com suspensões de cultura de 24 h de *Candida albicans* (ATCC 10231) na concentração de 0,5 da escala de McFarland. Poços de 7 mm de diâmetro foram confeccionados no ágar e preenchidos com 50 μL contendo uma solução do NM ou das micropartículas em DMSO e água numa concentração teórica de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. As placas foram incubadas por 24 h a $37 \pm 0,5$ °C. O diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm, utilizando o software ImageJ, Descartou-se da leitura o diâmetro do poço (Figura 6). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata e em dias diferentes.

Figura 6 - Avaliação e mensuração dos halos de inibição em ágar Muller-Hinton com glucose 2%.



Fonte: o autor

3.3 EXPERIMENTO 3 - Efeito da incorporação de micropartículas bio-adesivas e pH dependentes de nitrato de miconazol em adesivos para prótese: atividade antifúngica, força adesiva e toxicidade.

3.3.1 Desenvolvimento de adesivo para prótese

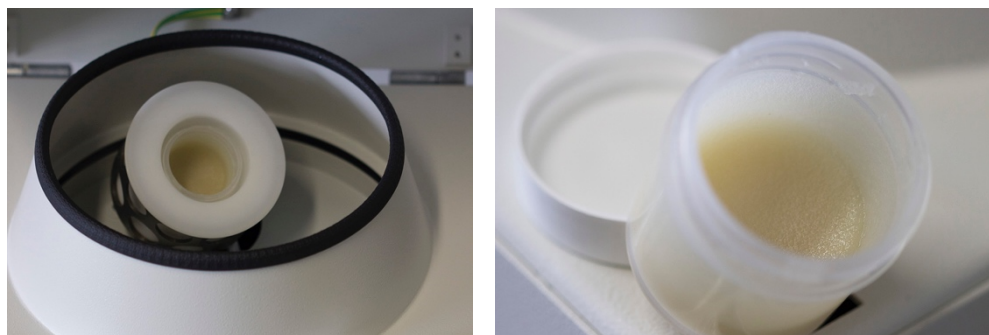
Uma formulação de adesivo para prótese foi desenvolvida a partir de dois tipos de polímeros hidrossolúveis sintéticos (Gantrez MS-955 e carboximetilcelulose) e materiais de ligação (vaselina líquida e sólida, Versagel®, sílica) e conservantes (BHT e propilparabeno) (Tabela 3), a qual foi preparada através de um misturador mecânico a vácuo a 2400 rpm durante 15 minutos (Figura 7)

Tabela 3- Descrição da formulação de adesivo em creme para prótese.

Matérias-primas	Fabricante/Lote	% (p/p)
Gantrez MS-955	ISP, Wilmington, Delaware, EUA /CC2305825	37,5
Carboximetilcelulose	ISP, Wilmington, Delaware, EUA /70028	15,5
Vaselina Líquida	Laboratório Ind. e Farm. LIFAR LTDA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil/L32456	10,4
Vaselina Sólida	Laboratorio Ind. e Farm. LIFAR LTDA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil/AC8763	28,5
Versagel®	Penreco, Karns City, Pensilvania, EUA /K1002	5
Sílica	Evonik Industries, Essen, Alemanha/0288	3
Butilhidroxitolueno	Mapric, São Paulo, São Paulo, Brasil/329850	0,05
Propilparabeno	Aboisa, Santa Cecília, São Paulo, Brasil/R24591	0,05

Fonte: o autor

Figura 7 -. Formulação de adesivo para prótese sendo desenvolvido em agitador mecânico a vácuo a 2400 ver.min⁻¹



Fonte: o autor

3.3.2 Incorporação de micropartículas poliméricas de NM

A partir das micropartículas poliméricas E10, E20, G10, G20, EG10 e EG20 desenvolvidas e caracterizadas previamente no Experimento 2, foram conformadas 6 formulações de adesivo em creme para prótese contendo uma concentração teórica de NM de 1% (AE1, AG1, AEG1) e 2% (AE2, AG2, AEG2). Dessa forma, uma mistura da formulação do adesivo contendo 10% de micropartículas poliméricas foi realizada em um misturador mecânico a vácuo a 2400 rpm durante 10 minutos. Foram conformados dois grupos controle, um contendo NM 2% (ANM), e outro sem a adição de nenhum tipo de micropartícula ou fármaco (ACT).

3.3.3 Avaliação Microbiológica

Extratos dos adesivos para próteses foram realizados em 2% p/v em caldo Muller-Hinton glicose 2% (Lee et al.⁵³ 2001, Lee et al.⁵⁴ 2009, Pfaller et al.⁵⁵ 2004, Rimek et al.⁵⁶ 2008). Foram pesados exatamente 0,4 g do adesivo e colocados nas paredes de um tubo para centrífuga tipo Falcon de 50 mL. A seguir, foram colocados 20 mL do meio de cultura e agitados constantemente num agitador tipo vortex até a completa diluição do adesivo para prótese no meio de cultura por aproximadamente 2 h. O extrato dos adesivos no meio foi diluído seriadamente alcançando as concentrações teóricas de 3,15-400 µg.mL⁻¹ de NM. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos adesivos foram determinadas pelos métodos modificados de micro-diluição em caldo e diluição em ágar segundo a metodologia proposta pela NCCLS (NCCLS⁵⁷ 1997,

NCCLS⁵⁸ 1992). Células da cepa de *C. albicans* ATCC 10231 foram suspensas em solução salina, e ajustadas a 0,5 da escala de McFarland e diluídas numa proporção de 1:10 para obter uma concentração de $0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.

O teste de diluição em ágar foi realizado utilizando o ágar Muller-Hinton 2% de glicose. Em cada placa de Petri foram adicionados 18 mL do ágar e a seguir 2 mL do extrato do adesivo, obtendo uma diluição 1:10 da concentração de NM nos extratos dos adesivos ($0,312 - 40 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Uma vez solidificadas as placas, estas foram semeadas em toda sua superfície de forma vigorosa utilizando um cotonete carregado com a suspensão de *C. albicans*.

Para o teste de microdiluição em caldo, foram inseridas em microplacas de 96 poços alíquotas de 170 μL de caldo Muller-Hinton + 2% de glicose, 10 μL da suspensão de *C. albicans* e 20 μL do extrato dos adesivos testados, obtendo uma diluição 1:10 da concentração de NM nos extratos dos adesivos ($0,312 - 40 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A leitura das placas de Petri e placas de cultura foi realizada após serem incubadas por 24 h a uma temperatura de 37°C em uma estufa convencional. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que inibiu qualquer crescimento microbiano visível. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois dias diferentes.

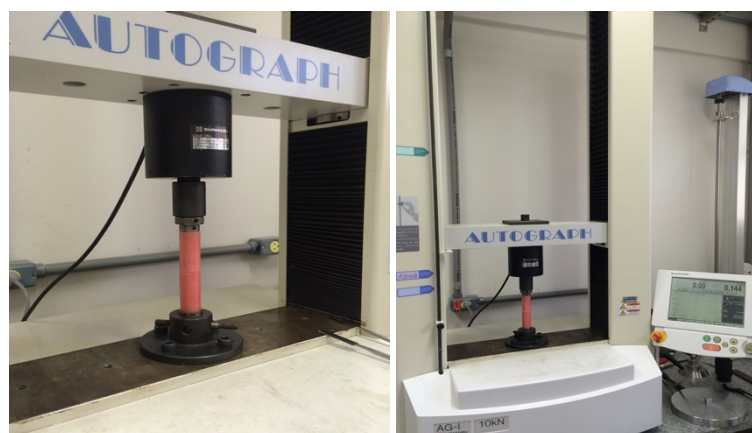
3.3.4 Avaliação da Força Adesiva

A força adesiva de união dos adesivos para próteses foi verificada entre dois cilindros de resina acrílica termopolimerizável para base de próteses (Vipi wave, Pirassununga-SP, Brasil). Para isso, foram confeccionados dois cilindros de polimetilmetacrilato, processados em micro-ondas seguindo as recomendações e tempos do fabricante.

Os cilindros foram inspecionados visualmente, para verificar se apresentavam superfície lisa e ausência de bolhas ou porosidades, caso contrário, seriam descartados. Os bordos foram acabados e as dimensões ajustadas até que se obtivessem 25 mm de diâmetro por 55 mm de altura. Após sua obtenção, os cilindros foram armazenados em 50 mL de água destilada durante 48 h a 37°C, a fim de eliminar possíveis monômeros residuais (ISO 1567, 1998). Os cilindros foram montados em dispositivos que foram especialmente confeccionados para sua fixação na máquina de ensaios universal (AG-I

Shimadzu - Modelo Autograph – Série nº 9041 6, frequência de 60 Hz; Shimadzu, Murasakino, Quioto, Japão) (Figura 8). Os adesivos foram pesados em uma balança de precisão e armazenados em copos plásticos. Após isso, os adesivos ficaram imersos em água destilada em temperatura ambiente antes da realização do teste de tração, sendo os tempos utilizados neste estudo: imediato (T0), 30 min (T0,5), 1 h (T1), 3 h (T3), 6 h (T6) e 12 horas (T12). Os adesivos no peso final de 0,3 g foram aplicados com uma pinça e de maneira centralizada sobre as extremidades secas e polidas dos cilindros e, a seguir, foi aplicada uma carga de 12 N (Zhao et al.⁵⁹ 2004) durante 15 s no sentido de aproximação dos cilindros. Após cessada esta carga, aguardava-se 30 s e o teste de tração era então realizado a uma velocidade de 1 mm/min e registrada a força de tração entre os cilindros em N. Foram realizados dez ensaios para cada condição (Zhao et al.⁵⁹ 2004, DeVengencie et al.⁶⁰ 1997).

Figura 8 -. Cilindros de resina acrílica posicionados em máquina de ensaios universais.



Fonte: o autor

3.3.5 Avaliação de Toxicidade

O bioensaio de toxicidade foi realizado pela Concentração Letal 50 (CL₅₀) em *Artemia salina* (Meyer et al.⁶¹ 1982). Foram colocados 100 mg de ovos de *Artemia* em água salinizada na proporção de 38 g de sal marinho por litro, com temperatura entre 28 a 30°C, pH entre 8 e 9 e iluminação artificial. O estado de saturação de oxigênio foi conseguido com auxílio de uma bomba de oxigenação. Após 48 h, as larvas atingiram o estágio de metanúplio, mais sensível ao tratamento. As larvas não foram alimentadas (Carballo et al.⁶² 2002). Dez larvas

foram distribuídas em cada tubo ensaio com 5 mL da solução salina nas concentrações graduais de 50, 100, 150, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada amostra. Foi utilizado como controle negativo salina pura e como controle positivo dicromato de potássio a 0,1%, nas mesmas concentrações já descritas. O resultado foi obtido contando-se após 24 e 48 h o número de metanúplios do microcrustáceo mortos e vivos em cada tubo de ensaio, através de visualização macroscópica com lupa. Análise estatística descritiva foi aplicada à contagem do número de sobreviventes. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento após 10 s de observação (Meyer et al.⁶¹ 1982).

A toxicidade foi mensurada em termos de CL_{50} (concentração letal para 50% dos metanúplios): $\text{LC}_{50} < 80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi considerado altamente tóxico; entre $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderadamente tóxico; $\text{CL}_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, baixa toxicidade ou não tóxicos. Os extratos que não mostram uma mortalidade de 50% em qualquer uma das concentrações testadas foram considerados não tóxicos (Ramos et al.⁶³ 2009).

4 CAPÍTULOS

4.1 Artigo “Development and validation of an RP-HPLC/UV method for determination of miconazole nitrate in polymeric spray-dried microparticles”

4.2 Artigo “Miconazole nitrate-loaded microparticles prepared by spray-drying: improved relative solubility and suitable antifungal effect”

4.3 Artigo “Denture adhesive containing miconazole nitrate microparticles: antifungal, adhesive strenght and toxicity properties”

4.1 Artigo “Development and validation of an RP-HPLC/UV method for determination of miconazole nitrate in polymeric spray-dried microparticles”

LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY

FORMERLY ACTA FARMACEUTICA BONAERENSE



[LAST ISSUE](#) |
 [PREVIOUS ISSUES](#) |
 [GUIDE FOR AUTHORS](#) |
 [SUBMIT ARTICLE](#) |
 [CHECK MANUSCRIPT STATUS](#) |
 [SUSCRIPTION](#)

Submission of Manuscripts:

Dear Mr/s Paulo Vitor Farago:

I am glad to inform you that your article '**Development and Validation of an RP-HPLC/UV Method for Determination of Miconazole Nitrate in Spray-dried Polymeric Microparticles**' by *Andrés F. Cartagena, Traudi Klein, Amanda Lyra, Amanda M. Urban, Paulo V. Farago & Nara H. Campanha* has been acknowledged and will be sent to the reviewers for further analysis. In that moment you will receive by email a code to follow the state of the process of submission.

Many thanks for your interest in our journal.

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

LOG-IN

User

Password

[LOG-IN](#)

[Forgot your password?](#)

SEARCHS

☐ Author ☐ Work

[SEARCH](#)

ACTIONS

[Submit Article](#)

[Check Manuscript Status](#)

[Subscription](#)

[Free Sample Issue](#)

STATISTICS

JCR Impact Factor 2014:
0.372

Issues per year: 10

ISSN 0326-2383 (printed ed.)

ISSN 2362-3853 (on line ed.)

Development and Validation of an RP-HPLC/UV Method for Determination of Miconazole Nitrate in Spray-dried Polymeric Microparticles

Andrés F. Cartagena¹, Traudi Klein², Amanda Lyra², Amanda Urvan², Paulo V. Farago² & Nara H. Campanha¹

¹Department of Dentistry, ²Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748, General Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

Corresponding author:

Paulo Vitor Farago

State University of Ponta Grossa

4748, General Carlos Cavalcanti Avenue

Zip Code 84030-900,

Ponta Grossa,

Paraná, Brazil

Email: pvfarago@gmail.com

ABSTRACT

A rapid and simple high-performance liquid chromatographic method for analyzing miconazole nitrate (MN) in mucoadhesive and pH-sensitive spray-dried polymeric microparticles was developed and validated. Chromatographic separation was performed using a reversed-phase Inertsil® ODS3 column and methanol-acetonitrile-water (60:30:10, v/v) as a mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. MN identification was achieved by UV detection at 232 nm. Validation parameters were: specificity, linearity, quantitation limit, detection limit, precision, accuracy and robustness. Retention time of MN was approximately 5.58 min. This method was specific, linear ($r = 0.9992$) in a range of 5.0 to 90.0 µg/mL with limits of detection and quantification of 0.0055 and 0.1769 µg/mL. Precision was demonstrated by a relative standard deviation lower than 1.66%. Suitable accuracy (95-105%) and robustness were obtained. The method was simple, fast, and successfully used to determine MN content in spray-dried polymeric microparticles.

INTRODUCTION

Miconazole nitrate (MN, 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]1H-imidazole, mononitrate) is a potent antifungal drug of imidazole group. It has been used for management of opportunist fungal infections caused by an overgrowth of *Candida* species¹. MN belongs to class II of Biopharmaceutical Classification System presenting low solubility and high permeability. This synthetic imidazole is insoluble in water and soluble in methanol, hot chloroform, and dimethyl formamide. MN has a partition coefficient of about 6.25 in octanol–water system². This drug inhibits 14- α -lanosterol demethylase, a key enzyme necessary to convert lanosterol to ergosterol, which provides depletion of ergosterol and accumulation of toxic 14- α -methylated sterols in fungal membrane³. Currently, MN is used in a variety of pharmaceutical dosage forms as injection, tablet, gel, cream, ointment, topical powder and vaginal suppository^{1,4} for management of dermal, oral and vaginal mycosis^{1,5}.

For treating oral candidosis, gel formulation containing 2% of MN is the most common approach^{6,7}. However, it does not remain for long time in target areas. Moreover, conventional topical formulations have to be applied several

times a day^{8,9}. In order to improve retention time of antifungal onto skin and mucosae, bioadhesives formulations have been developed^{10,11}. Retentive bioadhesive formulations improve local effect, stability and can be developed to target drug to specific sites in buccal mucosae¹².

The use of controlled drug release systems into bioadhesive formulations can also provide a long-lasting therapeutic concentration of an antifungal drug when they are in contact with affected areas¹³. In that sense, polymers exhibiting pH-dependent and mucoadhesive properties, have been used as microparticles in order to improve the buccal effect of drugs for oral use¹⁴ and the microencapsulation procedure has been successfully used to offer an effective and prolonged release of MN¹⁵⁻¹⁷. Considering oral candidosis, mucoadhesive and pH-sensitive spray-dried microparticles containing MN prepared with Gantrez[®] MS-955 [poly(methylvinylether/maleic acid) mixed salts copolymer] and Eudragit[®] L100 [poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate)] seem to be a feasible approach for improving its treatment.

Hence, a specific method for drug quantification from these microparticles is required¹⁸. Various spectrophotometric methods have been reported for drug determination from formulations containing MN and associations containing other active ingredients^{5,19-23}. Nevertheless, these methods are not suitable for determining MN in microparticles due to polymers can absorb in UV region. In addition, HPLC method has been indicated for drug quantification from controlled delivery systems with superior sensitivity as compared to spectrophotometry. For this reason, the goal of this paper was to develop and to validate a fast, simple and optimized reverse phase HPLC method with UV detection to quantify MN in mucoadhesive and pH-sensitive polymeric microparticles intended for buccal use.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Miconazole nitrate salt, acetonitrile and methanol of HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Gantrez[®] MS-955 was supplied by ISP (Willmington, DE, USA) and Eudragit[®] L-100 was obtained from

Evonik Industries (Darmstadt, Germany).

Apparatus and Chromatographic conditions

The chromatographic apparatus consisted of a Merck-Hitachi Lachrom system (Tokyo, Japan) equipped with a quaternary pump L-7100, a UV detector module L-7400, an integral degasser and an interface D-7000. A manual injector system (Rheodyne, Cotati, CA, USA) equipped with a 20 μ L sample loop and 100 μ L syringe (Hamilton, Microliter 710, Bonaduz, Switzerland) was used. The chromatography software ChromQuest 5.0 was used for data collection and calculation. The separation was carried out on a GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (Torrance, CA, USA) reversed phase analytical column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) and a GL Sciences Inertsil[®] ODS3 guard cartridge system (10 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m) at room temperature ($20 \pm 0.5^\circ\text{C}$). The mobile phase consisted of methanol, acetonitrile and water (60:30:10) at a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase was filtered through a 0.45 μ m PTFE-membrane filter (Cromafil[®] Xtra, 0.45 μ m $\times$ 25 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and degassed prior to use. The detection was performed at 232 nm.

Preparation of spray-dried polymeric microparticles

The polymeric microparticles containing miconazole nitrate were prepared by spray-drying procedure. As shown in Table 1, weighted amounts of Eudragit[®] L-100 and/or Gantrez[®] MS-955 were dissolved in ethanol (200 mL) or water (200 mL). MN was dissolved in ethanol (200 mL). These solutions were then mixed and magnetic stirred by 6 h. Spray-drying was performed using a MSD-0.5 mini spray dryer (Labmaq, Ribeirão Preto, Brazil) with a standard 0.5 mm nozzle. Outlet temperature was maintained at 60°C, flow rate was kept at 5-6 mL/min, compressed spray airflow was maintained at 40 L/min and air pressure was kept at 1.5 m³/min. The obtained microparticles were separated in a cyclone separator and settled into a collector. Formulations were also prepared omitting MN as negative control. All spray-dried polymeric microparticles were obtained in triplicate from three different batches.

Stock solution

Standard stock solution of MN at 500.0 µg/mL was daily prepared by dissolving appropriate amount of MN (5 mg) in 10 mL of mobile phase. This solution was further diluted in mobile phase to prepare six different working standard solutions ranging from 5.0 to 90.0 µg/mL. These solutions were filtered through a 0.45 µm PTFE-membrane filter before injection into HPLC system.

Method development

Detection wavelength for HPLC experiments was selected at 232 nm. The chromatographic conditions were optimized for resolution of MN peak by varying both composition and proportion of mobile phase. Samples of different formulations were used to optimize the chromatographic conditions for resolving MN.

Method validation

The validation process was carried out considering ICH guidelines (The International Conference on Harmonization of Technical Requirement for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use)²⁴ and Brazilian regulation (RE 899/2003) of the National Health Surveillance Agency²⁵.

Specificity

Specificity was determined by analyzing the chromatograms of unloaded microparticles solution (negative control) in comparison with those obtained for formulations containing MN aiming at confirming that none of the polymers (Eudragit® L-100 and Gantrez® MS-955) can interfere with the drug quantification.

Linearity

This parameter was used to verify if sample solutions at a predetermined concentration range (5.0-90.0 µg/mL) show a linear response proportional to drug concentration. Linearity was determined from three analytical curves obtained from HPLC experiments performed using standard solutions of MN. The experimental results were graphically plotted for obtaining a mean analytical curve. Linear regression and analysis of variance (ANOVA) were performed to obtain slope and other statistics.

Limit of detection and limit of quantification

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of response (δ) and slope (S) of mean analytical curve and were expressed as $3.3 \delta/S$ and $10 \delta/S$ for LOD and LOQ, respectively²⁴.

Precision

Precision was determined as repeatability and intermediate precision. The standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) of six injections at test concentration (20 $\mu\text{g/mL}$) were evaluated and analyzed intra-day, inter-day and with different analysts.

Accuracy

Accuracy was performed using nine determinations at three concentration levels: low, intermediate and high (20.0, 40.0 and 60.0 $\mu\text{g/mL}$) in triplicate. The obtained mean value at each concentration was compared to the theoretical value.

Robustness

Robustness was determined after variations in flow rate (0.995 and 1.005 mL/min, mobile phase composition (metanol:acetonitrile:water) 61:29:10 and 59:31:10, v/v/v) and temperature (20 ± 0.5 and $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$). The Tukey test of ANOVA was performed to evaluate whether variations changed the results of HPLC analysis.

Evaluation of encapsulation efficiency

For MN quantification, an appropriate amount of spray-dried polymeric microparticles equivalent to 5 mg of MN was placed into a 10 mL volumetric flask with mobile phase. This solution was stirred by 12 h, sonicated and diluted to 50 $\mu\text{g/mL}$ using mobile phase. This solution was then filtered through a 0.45 μm PTFE-membrane filter. The encapsulation efficiency (EE) of MN into formulations was calculated using Equation 1 from HPLC results provided after sample injections in triplicate.

$$EE (\%) = \frac{\text{total drug content}}{\text{theoretical drug content}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of analytical methods for quality control of pharmaceutical formulation is essential. The proposed method was developed in order to provide a simple and optimized RP-HPLC/UV procedure for assessing MN in Eudragit[®] L-100 and Gantrez[®] MS-955 microparticles. During the development of HPLC method, several mobile phase composed by methanol:water, acetonitrile:water and methanol:acetonitrile:water at different solvent proportions were investigated. The best result was achieved using methanol:acetonitrile:water (60:30:10, v/v/v) and flow rate of 1 mL/min using a C₁₈ reversed-phase column. The retention time corresponding to MN was 5.58 min and it was constant among injections. The total analysis time was set at 10 min.

Method Validation

The proposed method was validated by determining its performance regarding specificity, linearity, LOD, LOQ, precision, accuracy, and robustness.

Specificity was verified by analyzing potential interfering peaks of formulation at MN retention time. No interfering peak of impurities, excipients, degradation products or matrix components was observed at the same retention time of MN when unloaded and MN-loaded microparticles were assayed (Figure 1). Therefore, the proposed method was found to be specific.

Linearity was performed in triplicate and three analytical curves ranging from 5.0 to 90.0 µg/mL were obtained. The regression equation and correlation coefficient (*r*) were calculated from mean analytical curve by the least-squares method. The linear equation obtained for MN (Figure 2) was $y = 31230.07 x - 20096.05$ with $r = 0.9992$. The slope showed RSD of 1.76%. This value is within the limit set by ICH²⁴, which is up to 5%. The negative *b* value (−20096.05) was in the 95% confidence interval of analytical curve by ANOVA test. These results (RSD of slope and negative *b* value) indicate that the method reproducibility and compound purity are within suitable limits.

A value of regression coefficient close to unity is not a final outcome of a linear relationship and the test for^o lack of fit should be applied for evaluating the variance of residual values. ANOVA results for linearity of MN are presented in Table 3. F value for lack of fit was lower than critical value of F in the 95% confidence level ($\alpha = 0.05$). Therefore, the linear regression showed no lack of fit according to ANOVA test (Table 2 and Table 3). In addition, LOD and LOQ values were calculated as 0.0055 and 0.1769 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which demonstrated an adequate sensitivity for RP-HPLC/UV method.

Precision analyses were expressed as RSD values and are shown in Table 4. RSD values of 1.66 and 2.05% were obtained for repeatability and intermediate precision, respectively. These results correspond to an RSD lower than 5% which indicate a suitable precision for the analytical method.

Accuracy represents the correlation between obtained results and those accepted as true and it can be analyzed by calculating the mean percentage of analyte recovery at three different concentrations and RSD. Recovery percentage (Table 5) was found in range of 102.17 ± 0.49 and $104.53 \pm 0.77\%$. These recovery values indicate that the developed method was accurate for the determination of MN in spray-dried polymeric microparticles.

The evaluation of robustness was based on RSD values for obtained by changing analytical parameters such as flow rate, mobile phase composition and temperature of analytical column. This parameter is useful in order to prove that typical variations in analytical method are negligible in procedure outcome²⁶. The intentional changes proposed to the method conditions had no remarkable effect in RSD when flow rate was changed for 0.995 mL/min (0.56%) and 1.005 mL/min (0.57%), mobile phase composition was varied to 61:10:29 (0.74%) and 59:10:31 (0.29%), and temperature was improved to $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (0.92%). Therefore, changes in these chromatographic parameters did not affect the analysis of MN in spray-dried polymeric microparticles and the developed method proved to be robust.

Evaluation of encapsulation efficiency

The previously validated method was then applied to quantify MN from Eudragit[®] L-100 and/or Gantrez[®] MS-955 microparticles. After drug extraction using mobile phase, these formulations showed drug content very close to the

theoretical value and suitable encapsulation efficiency as summarized in Table 6. These results demonstrate the feasibility of the developed method in order to quantify MN concentration in spray-dried polymeric microparticles.

CONCLUSION

In this paper, an RP-HPLC/UV method was developed and validated to quantify MN in spray-dried polymeric microparticles. The experimental results demonstrated that this method was specific, linear, sensitive, precise, accurate, and robust. In addition, this procedure can be considered simple, fast and easy to apply in routine analysis for quantification of MN in mucoadhesive and pH-sensitive spray-dried polymeric microparticles.

REFERENCES

1. Sawyer, P.R., R.N. Brogden, R.M. Pinder, T.M. Speight, G.S. Avery (1975) *Drugs*. **9**: 406-23.
2. Bhalekar, M.R., V. Pokharkar, A. Madgulkar, N. Patil, N. Patil (2009) *AAPS PharmSciTech*. **10**: 289-96.
3. Yoshida, Y. (1988) *Curr Top Med Mycol*. **2**: 388-418.
4. Bouckaert, S., H. Schautteet, R.A. Lefebvre, J.P. Remon, R. van Clooster (1992) *Eur J Clin Pharmacol*. **43**: 137-40.
5. De Zan, M.M., M.S. Cámara, J.C. Robles, S.V. Kergaravat, H.C. Goicoechea (2009) *Talanta* **79**: 762-67.
6. Martinez-Beneyto, Y., P. Lopez-Jornet, A. Velandrino-Nicolas, V. Jornet-Garcia (2010) *Int J Dent Hyg*. **8**: 47-52.
7. Oliver, R.J., H.S. Dhaliwal, E.D. Theaker, M.N. Pemberton (2004) *Br Dent J*. **196**: 701-3
8. Steinberg, D., M. Friedman (1999) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. **16**: 425-59.
9. Vazquez, J.A., J.D. Sobel (2012) *Clin Infect Dis*. **54**: 1480-4.
10. Madgulkar, A., S. Kadam, V. Pokharkar (2009) *Indian J Pharm Sci*. **71**: 290-4.
11. Pendekal, M.S., P.K. Tegginamat (2012) *Lat Am J Pharm*. **31**: 461-68.
12. Chinna Reddy, P., K.S. Chaitanya, Y. Madhusudan Rao (2011) *Daru*. **19**: 385-403.

13. Kockisch, S., G.D. Rees, S.A. Young, J. Tsibouklis, J.D. Smart (2003) *J Pharm Sci.* **92**: 1614-23.
14. Quan, J.S., H.L. Jiang, E.M. Kim, et al. (2008) *Int J Pharm.* **359**: 205-10.
15. Yuen, C.W., J. Yip, L. Liu, et al. (2012) *Carbohydr Polym.* **89**: 795-801.
16. Genta, I., P. Perugini, T. Modena, et al. (2003) *Carbohydrate Polymers.* **52**: 11-8.
17. Yuen, C.W., C.W. Kan, K.L. Cheuk, et al. (2012) *J Microencapsul.* **29**: 505-10.
18. Gomes, M.L.S., T. Klein, M. Simionato, et al. (2015) *Lat Am J Pharm.* **34**: 803-9.
19. Tyler, T.A., J.A. Genzale (1989) *J Assoc Off Anal Chem.* **72**: 442-4.
20. Cavrini, V., A.M. Di Pietra, R. Gatti (1989) *J Pharm Biomed Anal.* **7**: 1535-43.
21. Di Pietra, A.M., V. Cavrini, V. Andrisano, R. Gatti (1992) *J Pharm Biomed Anal.* **10**: 873-9.
22. Kobylinska, M., K. Kobylinska, B. Sobik (1996) *J Chromatogr B Biomed Appl.* **685**: 191-5.
23. Akay, C., S.A. Ozkan, Z. Senturk, S. Cevheroglu (2002) *Farmaco.* **57**: 953-7.
24. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Steering Committee: Geneva. Available at <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q_2_R1__Guideline.pdf>.
25. Brazil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2003) Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods. Resolution RE no 899, May 29, 2003. Available at <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/899_03re_e.pdf%3E>.
26. Nadal, J.M., M.G. Toledo, Y.M. Pupo, J.P. Paula, P.V. Farago, S.M.W. Zanin (2015) *J. Anal. Methods Chem.* **2015**: Article ID 286812, 10 p.

FIGURES

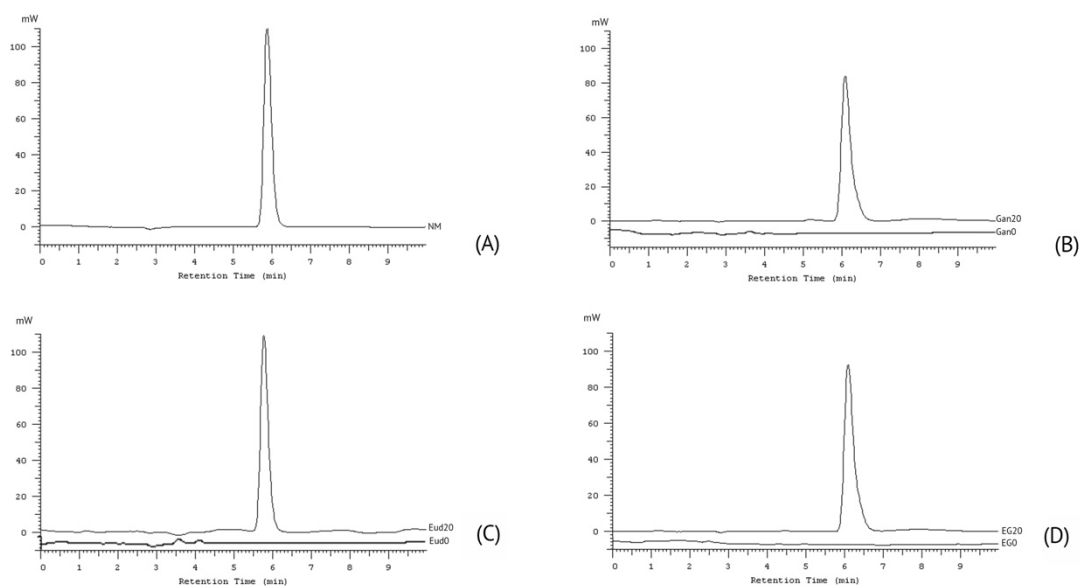


Figure 1. Representative chromatograms. The standard solution (50 $\mu\text{g/mL}$) of MN (A), Gan20/Gan0 (B), Eud20/Eud0 (C), EG20/EG0 (D). Chromatographic conditions: mobile phase methanol:acetonitrile:water: 60:30:10; flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 232 nm; column temperature: $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$; injection volume: 20 μL .

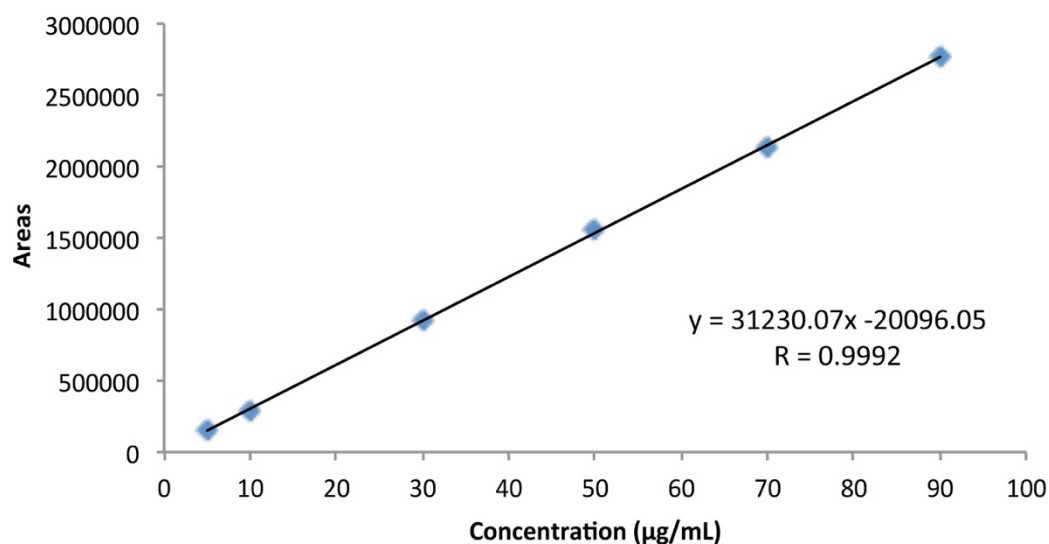


Figure 2. Mean analytical curve obtained from MN standard solutions (5.0 to 90.0 $\mu\text{g/mL}$) using the proposed RP-HPLC/UV method.

TABLES

Table 1. Composition of spray-dried polymeric microparticles containing MN.

Formulation	Polymer(s) (g)	Miconazole Nitrate (g)
Eud10	Eudragit [®] L-100 (7.2)	0.8
Eud20	Eudragit [®] L-100 (6.4)	1.6
Gan10	Gantrez [®] MS-955 (7.2)	0.8
Gan20	Gantrez [®] MS-955 (6.4)	1.6
EG10	Eudragit [®] L-100 (3.6) and Gantrez [®] MS-955 (3.6)	0.8
EG20	Eudragit [®] L-100 (3.2) and Gantrez [®] MS-955 (3.2)	1.6

Table 2. Curve parameters and regression data from three analytical curves for MN quantification.

Parameter	Miconazole Nitrate
Linear range (µg/mL)	5.0 – 90.0
Limit of Detection (µg/mL)	0.0055
Limit of Quantification (µg/mL)	0.1769
Regression Data*	
N	3
Slope (<i>a</i>)	31230.07
Standard deviation of slope	552.64
Relative standard deviation of slope (%)	1.76
Intercept (<i>b</i>)	–20096.05
Correlation coefficient (<i>r</i>)	0.9992

* $y = ax + b$, where *x* is the analyte concentration and *y* is the peak area.

Table 3. ANOVA results for linearity of MN.

	SS*	df*	MS*	F*	Fc*
Model	2.501923×10^9	1	2.501923×10^9	1.52	4.49
Residual	2.626568×10^{10}	16	1.641605×10^9	Linear	
Lack of Fit	6.089795×10^9	4	1.522449×10^9	0.905506	3.26
Pure Error	2.017589×10^{10}	12	1.681324×10^9	No Lack of Fit	

*SS: sums of squares; df: degrees of freedom; MS: mean squares; F: F value for the test; Fc: critical value of F.

Table 4. Repeatability and intermediate precision data for MN.

	Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g/mL}$, mean $\pm$ SD*)	RSD** (%)
Repeatability (n = 6)	20.0	20.88 ± 0.34	1.66
Intermediate precision			
Interday 1	20.0	20.95 ± 0.48	2.27
Interday 2	20.0	21.13 ± 0.61	2.87
Interday 3	20.0	20.75 ± 0.21	1.02
Mean $\pm$ SD* (n = 9)		20.94 ± 0.43	2.05
Different analyst (n = 3)	20.00	21.26 ± 0.49	2.28

*SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation

Table 5. Accuracy data for MN analysis.

Level of concentration	Miconazole Nitrate ($\mu\text{g/mL}$)	% $\pm$ SD*	RSD**(%)
Low	20.0	104.53 $\pm$ 0.77	3.69
Medium	40.0	102.17 $\pm$ 0.49	1.20
High	60.0	102.91 $\pm$ 0.41	0.67

*SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation.

Table 6. Encapsulation efficiency (EE) for spray-dried polymeric microparticles.

Formulation	Theoretical concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Total drug content ($\mu\text{g/mL}$)	EE (%)
Eud10	50.0	53.11 $\pm$ 1.57	106.22 $\pm$ 3.15
Eud20	50.0	50.13 $\pm$ 2.20	100.26 $\pm$ 4.39
Gan10	50.0	49.72 $\pm$ 2.20	99.43 $\pm$ 2.72
Gan20	50.0	44.53 $\pm$ 1.18	89.07 $\pm$ 2.37
EG10	50.0	48.32 $\pm$ 0.86	96.64 $\pm$ 1.72
EG20	50.0	47.67 $\pm$ 1.56	95.35 $\pm$ 3.13

* n=3, mean $\pm$ standard deviation.

4.2 ARTIGO "MICONAZOLE NITRATE-LOADED MICROPARTICLES OBTAINED BY SPRAY-DRYING: IMPROVING RELATIVE SOLUBILITY AND SUITABLE ANTIFUNGAL EFFECT FOR ORAL USE"



**Miconazole nitrate-loaded microparticles for oral use:
proper solubility and antifungal effect**

Journal:	<i>Oral Diseases</i>
Manuscript ID	ODI-02-16-OM-4601
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	04-Feb-2016
Complete List of Authors:	Cartagena-Molina, Andrés; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dentistry Lyra, Amanda; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Pharmacy Kapuchczinski, Alice Esmerino, Luís; Universidade Estadual de Ponta Grossa Klein, Traudi; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Pharmacy Farago, Paulo; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Pharmacy Campanha, Nara H; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dentistry
Keywords:	Timed-Release Preparations, Miconazole, <i>Candida albicans</i> , Therapeutics, Drug Administration, Topical, Administration, Mucosal

Miconazole nitrate-loaded microparticles for oral use: proper solubility and antifungal effect

Running title: Miconazole-loaded microparticles for oral use

Keywords: Timed-Release Preparations; Miconazole; *Candida albicans*; Therapeutics; Drug Administration, Topical; Administration, Mucosal.

Andrés Felipe Cartagena-Molina, DDS, MSc, PhD student, graduate Program in Dentistry, State University of Ponta Grossa, Department of Dentistry, Ponta Grossa, Brazil

Amanda Martinez Lyra, PharmD, MSc student, graduate program in Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Department of Pharmacy, Ponta Grossa, Brazil

Aline Cristina Kapuchczinski, DDS, Dental practice office, Prudentópolis, Brazil.

Luís Antonio Esmerino, Professor of undergraduate and graduate program in Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Department of Pharmacy, Ponta Grossa, Brazil

Traudi Klein, PharmD, MSc, PhD, Professor of graduate program in Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Department of Pharmacy, Ponta Grossa, Brazil

Paulo Vitor Farago, PharmD, MSc, PhD, Professor of Undergraduate Program in Pharmaceutical Sciences and Graduate Program in Dentistry, State University of Ponta Grossa, Brazil

Nara Hellen Campanha, DDS, PhD, Professor of Undergraduate and Graduate Programs in Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

Corresponding author

Dr. Paulo Vitor Farago

Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa

Address: 4748 Carlos Cavalcanti Avenue, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil

Tel & Fax: 55 42 3220-3101

E-mail: pvfarago@gmail.com

Date of submission: February 3rd, 2016

ABSTRACT

The aim of this study was to prepare and evaluate Eudragit® L100 and Gantrez MS-955 microparticles containing miconazole nitrate for oral delivery. Microparticles were prepared by spray-drying method to achieve high encapsulation efficiency and increase the drug solubility. The microparticles were formed containing 10% and 20% of drug on polymer Eudragit® L100 (E10 and E20), Gantrez MS-955 (G10 and G20) or their combination (EG10 and EG20). The influence of formulation factors (polymer:drug ratio, type of polymer) on yield percent, encapsulation efficiency, particle size, Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, *in vitro* drug release and antifungal activity were investigated. Acceptable yield, micrometer-sized and drug-loading efficiencies higher than 89% were obtained. No change in FTIR assignments was recorded after the microencapsulation procedure. X-ray and differential scanning calorimetry studies revealed amorphous/non-crystalline formulations. Miconazole nitrate-microparticles provided a remarkable increase of dissolution rate of the drug. Miconazole nitrate and G10, G20 and EG20 microparticles fitted to biexponential kinetic model, and E10, E20 and EG10 microparticles, monoexponential kinetic model. The antifungal activity test demonstrated that miconazole nitrate-microparticles possessed the same anti-*Candida albicans* activity as the pure drug. These results indicate that miconazole nitrate-microparticles are feasible carriers for increased release of miconazole at oral environment.

INTRODUCTION

Miconazole nitrate (MN) is a broad-spectrum antifungal triazole that has been employed widely in mucosal mycotic infections and oral–vaginal candidiasis since 1970 (Sawyer, Brogden, Pinder *et al*, 1975; Bouckaert, Schautteet, Lefebvre *et al*, 1992; Mandal, 2000). This antifungal is classified in Pharmaceutical Classification System (SCF) as class II, has low water solubility and high permeability. MN inhibits cytochrome P450 14 α -demethylase, which leads to the inhibition of synthesis of ergosterol, a critical component of the fungal cell membrane (Yoshida, 1988). Moreover, MN affects the synthesis of triglycerides and fatty acids and inhibits oxidative and peroxidative enzymes, increasing the amount of reactive oxygen within the cell (Souto, Wissing, Barbosa

et al, 2004). Microbiologically studies have shown in vitro activity against several *Candida* species, including *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. dubliniensis*. However, resistance has been reported in up to 17% for *C. albicans* and 45% for non-*albicans* species (Manfredi, McCullough, Polonelli et al, 2006).

Microencapsulation designed to controlled drug delivery has been studied and applied with success in medical areas. This delivery system improves bioavailability, stability and allows targeted drug delivery to specific sites. Microparticles can also offer advantages as limiting fluctuation within the therapeutic range, increased solubility of poorly soluble drugs, reduction in the side effects, decreased dose frequency and improved patient compliance (Davis, Illum, 1988; Akhter, Paul and Hasan et al, 2013). Although numerous methods are available for the synthesis of microparticles, the spray-drying of technique is widely used in industry because of their many advantages over other methods (Sosnik and Seremeta, 2015). The advantage of the spray drying technique for microencapsulation application is that it is reproducible, fast and easy to scale implementation and the resultant microparticles have a narrow size distribution (Kristmundsdottir, Gudmundsson, Ingvarsdottir, 1996; Vehring, 2008).

The drugs encapsulated into microparticles can be released either by diffusion, erosion, pressure, change of temperature, biodegradation or by a combination of these mechanisms (Lam and Gambari, 2014, Sosnik and Seremeta, 2015). In the meantime, multifunctional polymers that exhibit properties as pH dependent or bioadhesives have been development for drug delivery systems through oral administration (Quan, Jiang, Kim et al, 2008; Rizi, Green, Khutoryanskaya et al, 2011). Among polymers for drug delivery systems, Eudragit® L100 and Gantrez MS-955 are widely employed. The Eudragit® L100 is a polymer of acrylic and methacrylic acid esters having a low content of quaternary ammonium groups. It is a common encapsulation material, often used by the pharmaceutical industry, with an established safety profile. This polymer is stable at acidic pH, but is dissolved above a pH of 6.0 (Rizi, Green, Khutoryanskaya et al, 2011; Cetin, Atila, Kadioglu, 2010). Gantrez MS-955 is a copolymer of vinyl methyl ether and maleic anhydride (PVM/MA) proposed as a material for encapsulation of drugs. The mucoadhesive properties of this polymer

have been recognized as very good strategy to extend the residence time and to enhance explicit localization of drug on several membranes (Kockisch, Rees, Young *et al*, 2003; Kockisch, Rees, Tsibouklis *et al*, 2005). This polymer has been used in the pharmaceutical industry for its excellent bioadhesive properties to oral, vaginal, ophthalmic, rectal and intestinal mucosa presenting a very low toxicity (Irache, Huici, Konecny *et al*, 2005). Previously studies have been performed and studied microparticles of MN using chitosan as polymer material (Yuen, Kan, Cheuk *et al*, 2012; Yuen, Yip, Liu *et al*, 2012; Genta, Perugini, Modena *et al*, 2003). No studies involving microencapsulation for drug release of MN were carried with Eudragit® L100 and Gantrez MS-955 polymers.

The aim of this study was to develop and characterize a new type of MN microparticles that could be applied onto different dosage forms (creams, strips, powders and cushion) in order to achieve a controlled drug release profile for the treatment of oral candidiasis. Different formulations of microparticles were prepared by the spray-dried method using Eudragit® L100 (Evonik Industries, Essen, Germany, Batch #AR23456) and Gantrez MS-955 (ISP, Wilmington Delaware, USA, Batch #CC2305825) polymers. The preparation parameters, physicochemical properties of microparticles related to *in vitro* release characteristics and antifungal effect were studied.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of Miconazole Nitrate (MN) microparticles by spray-drying method. The microparticles containing MN were obtained by spray-drying method. Six formulations (Table 1) were prepared depending on the amount of MN into their compositions (10% and 20%) and polymer used (Eudragit® L100 and/or Gantrez MS-955). Weighted amounts of polymers were dissolved in organic or aqueous phase under mechanical stirring for 10 minutes. Then required amount of MN was added to organic phase. Both phases were mixed and stirred at room temperature for 6 h. Spray-drying was performed using an MSD-0.5 mini spray dryer (Labmaq do Brasil Ltda, Brazil) with a standard 0.5 mm nozzle. Outlet temperature was kept at 60 °C, flow rate was maintained at 5-6 mL/min, compressed spray airflow was maintained at 40 L/min and air pressure

was kept at 1.5 m³/min. The obtained microparticles were separated in a cyclone separator and settled into a collector. Formulations were also prepared without the drug as negative control. All polymeric microparticles were obtained in triplicate, from three different batches.

Percentage Yield

Obtained microparticles were weighed to determine the percentage yield with respect to initial materials used (drug and polymer). The Eq.1 was used for calculation of percentage yield is as follows;

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{wt.of microparticles}}{\text{wt.drug polymer mixture}} \times 100 \quad (1)$$

Encapsulation efficiency

An amount of microparticles, equivalent to 5 mg of MN, was weighted and magnetic stirred (1000 rpm, 752A magnetic stirrer, Fisatom, São Paulo, Brazil) with 10 mL of methanol for 24 h in order to completely extract the drug. The volume was filtered through a poly(vinylidene fluoride) membrane filter (Durapore membrane, 0.45 µm pore size, Millipore, Bedford, MA, USA) for quantification. After suitable dilution in mobile phase, the concentration of MN was determined by HPLC system (Merck-Hitachi LaChrom D-7000 HPLC system, Darmstadt, Germany) using a GL Sciences Inertsil® ODS3 (Torrance, CA, USA) reversed phase analytical column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) and a GL Sciences Inertsil® ODS3 guard cartridge system (10 mm × 4 mm, 5 µm) at room temperature with UV detection at 232 nm in triplicate. The mobile phase consisted of methanol, water and acetonitrile (60:10:30) at a flow rate of 1.0 mL/min. The validation of this HPLC method was previously performed through the following parameters: linearity, specificity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, and robustness. The concentration range varied from 5 to 90 µg/mL. Linearity was 0.9984 and the detection limit was 5.54 µg/mL. The encapsulation efficiency (EE) was obtained using Eq. (2)

$$EE = \left(\frac{\text{mass of MN in microcapsules}}{\text{theoretical mass of MN}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Scanning electron microscopy and particle size

The surface morphology of microparticles was examined by scanning electron microscopy. The samples were added on aluminum stubs, sputtered with gold (Shimadzu IC-50 ion coater, Kyoto, Japan) and analyzed using a scanning electron microscope (Shimadzu scanning microscope SSX-550, Kyoto, Japan) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV with different magnifications.

The particle size distribution was estimated from the measurement of about 200 particles, assuming spherical shape, found in an arbitrary chosen area in enlarged micrographs by Image-Pro Plus software (version 3.0, Silver Springs, MD, USA).

Fourier-transformed infrared spectroscopy

The Fourier-transformed infrared spectra of MN, Eudragit® L100, Gantrez MS-955, microparticles and physical mixture (1:1 MN:polymer) were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} on a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using KBr tablets with 32 scans and resolution of 4 cm^{-1} . The IR spectra were obtained to investigate chemical bond between drug and polymer.

X-ray powder diffraction

The crystalline structure of microparticles was determined by X-ray diffraction analysis. Wide-angle X-ray powder diffraction was performed with a Rigaku X-ray diffractometer (Rigaku Ultima IV, Shibuya-Ku, Japan). The 2θ was increased from 5° to 50° at a scan rate of $2^\circ/\text{min}$ using a Cu-K α source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at 40 kV and 30 mA.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analysis was undertaken to characterize changes, if any, during thermal exposure of the samples. DSC curves of MN, Eudragit® L100, Gantrez MS-955, microparticles and physical mixture were obtained under dynamic N_2 atmosphere (flow rate: 50 mL/min) in a DSC-4000 standard single-furnace (PerkinElmer, USA). The temperature range was from 20°C to 400°C with a heating range of $10^\circ\text{C}/\text{min}$. An empty alumina pan was used as reference. The DSC cell was calibrated with indium (m.p. = 156.6°C ; $\Delta H_{\text{fusion}} = 28.54 \text{ J/g}$).

In vitro drug release

The dissolution rate of pure drug and the drug release rate from microparticles were studied in artificial saliva at pH 6.8 performed in a Nova Ética dissolution tester (299/3, Vargem Grande Paulista, Brazil) equipped with paddles (apparatus II) in 600 mL for 24 h. System was kept at a thermostatically controlled temperature of $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$ and stirred at 75 rpm. At predetermined time intervals, samples were collected (1000 μL), filtered (0.45 μm pore size) and evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). The dissolution value was obtained from the amount of drug released. A correction factor was applied to the cumulative dilution caused by replacement of the sample with an equal volume of fresh medium. Three dissolution tests were carried out for each batch of microparticles.

Analysis of drug release behavior

Data obtained from dissolution profiles of MN and microparticles were compared by model-dependent methods. *In vitro* release studies were fitted to various kinetic equations to find out the mechanism of MN release from microparticles. The model-dependent methods used were first-order, biexponential, zero-order, and Weibull. The selection of model-dependent method was based on the best correlation coefficient (r), the best model selection criteria (MSC), and the best graphic adjustment.

Antimicrobial Activity

In order to confirm their antimicrobial potential, MN-loaded microparticles were evaluated by agar-well diffusion method in agar Muller-Hinton with glucose 2%. In brief, plates containing solid culture medium were inoculated with strains of *Candida albicans* ATCC 10231 by swab streaking from previously standardized suspensions at a concentration of 5×10^5 CFU/mL that match the turbidity of the 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL). Wells of 7 mm diameter were cut into agar plates and a solution of 50 $\mu\text{g/mL}$ of MN (positive control) and microparticles in DMSO was added to each well. The plates were incubated for 24 h and zone of growth inhibition of *Candida albicans* on the agar plates were recorded in millimeters. Tests were carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Spray-drying is a well-established technology currently used in a number of industries to produce various food, cosmetic, photoluminescent and pharmaceutical products (Iskandar, Gradon, Okuyama, 2003). This method is capable of transformation of an emulsion, suspension, dispersion, or liquid to a dry state (Bowey and Neufeld, 2010). The principle of spray-drying is based on the nebulization through a desiccating chamber of a polymer solution containing the active ingredient as solute or in suspension. The solvent is rapidly evaporated by a stream of heated air transforming the small droplets in solid microparticles (Esposito, Cervellati, Menegatti *et al*, 2002). Microparticles obtained by spray-drying are usually organic solvent free with respect to other preparation methods often resulting in particles possibly contaminated by toxic organic solvents (Palmieri, Bonacucina, Di Martino *et al*, 2001). Spray-drying allows the formation of particles in the micrometre size range, is rapid and easy to scale-up.

In the present study, Gantrez MS-955 and Eudragit® L100 microparticles of MN were successfully prepared by spray-drying method. The E10, E20, EG10 and EG20 formulations were showed as white powders and G10, and G20 represented as pale yellow powders. The mean and standard deviation of encapsulation efficiency (EE) are listed in Table 2. All formulations presented suitable EE values higher than 89% corresponding to drug loadings close to the theoretical concentrations. Some studies have been demonstrated similar EE on chitosan MN-microparticles by emulsion technique (78-97%) (Yuen, Yip, Liu *et al*, 2012) and MN-loaded solid lipid nanoparticles (80-100%) (Bhalekar, Pokharkar, Madgulkar *et al*, 2009).

Percentage Yield

The results presented in Table 2 show yield percent ranged from 37.22 to 55.36% for spray dried MN-microparticles. An increased microparticles yield was obtained when Gantrez MS-955 polymer was used, in combination with the highest MN concentration (20%). Formulations E10 and E20 showed inferior yield when compared to the other formulations. Yield results can be considered acceptable when compared to other studies that used the spray drying process (Hegazy, Demirel, Yazanm 2002; Kilicarslan, Gumustas, Yildz *et al*, 2014;

Martinac, Filipovic-Grcic, Voinovich *et al*, 2005). However, adhesion of material on the walls of the equipment, spraying the solution in the process, and exhaustion of small particles might have influenced in the efficiency of spray drying process for all formulations (Sosnik, Seremeta, 2015).

Scanning electron microscopy and particle size

To investigate the morphology of MN, high-magnification SEM images of polymers and MN microparticles prepared by spray-drying were obtained (Fig 1). MN presented a crystalline form. Eudragit® L100 and Gantrez MS-955 showed irregular and spherical aspects, respectively. Eudragit® microparticles were spherical in shape and had a smooth surface (Arshady, 1989). Meanwhile, EG20 showed a spherical shape and a rough surface. Formulations G10, G20 and EG10 revealed a slightly wrinkled surface morphology. The wrinkled morphology in G10, G20, and EG10 formulations were formed during solvent evaporation. This typical aspect was also found in spray-drying microparticles obtained with chitosan, proteins or some polymers (Vehring, 2008; Bowey, Swift, Flynn *et al*, 2013; Keegan, Smart, Ingram *et al*, 2012).

For all formulations, no drug crystals were observed after microencapsulation procedure.

The size of microparticles was measured and indicated in Table 2. All formulation presented means diameter ranged from 1.9 to 4.3 μm . The effect of the drug concentration on the microparticles size was found. Microparticles with increased drug concentrations (E20, G20 and EG20) also showed decreased size of microparticles.

Fourier-transformed infrared spectroscopy

FTIR spectra were used in this study to identify if would had some type of chemical interaction between raw materials after spray-drying microencapsulation process (Almeida, Nadal, Grassioli *et al*, 2014). Fig. 2 and 3 shows the FTIR spectra of MN, Eudragit® L100, Gantrez MS-955, physical mixtures and MN microparticles. Miconazole has 39 atoms giving rise to 111 vibrational degrees of freedom. In MN spectra, there were characteristic bands at 1585 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} (C-C of two dichlorobenzene), 1385 cm^{-1} (C-C and C-H

of the imidazole group, and C6 aliphatic part of MN) and 1327 cm^{-1} (C-H of the two dichlorobenze, C-H of C6 and C17) (Barillaro, Dive, Ziémons *et al*, 2008).

Considering their FTIR spectra, MN microparticles and physical mixture presented band assignments at the same wavenumber range (Fig. 2 and 3). These results indicate that the MN molecules showed no chemical interaction with the used polymers.

X-ray diffraction (XRD)

Substances in the solid state can present crystalline or amorphous characteristics, and in some cases both (Lacerda, Parize, Fávere *et al*, 2014). Therefore, X-ray diffraction analysis in Fig. 4 and 5 were performed for investigating the crystallinity of the obtained formulations in comparison to the raw materials (Almeida, Nadal, Grassioli *et al*, 2014). In the X-ray diffractograms of MN it is possible to observe several sharp peaks at the following diffraction angles (2θ) of 16.1° , 19.0° , 20.1° , 23.0° , 25.8° , 30.8° , 35.1° , and 36.2° suggesting that the drug presented a crystalline structure. However, both Eudragit® L100 and Gantrez MS-955 polymers, and all MN-microparticles formulations presented amorphous characteristics. These results indicate that the microencapsulation procedure provided a remarkable decrease of the crystalline diffraction peaks of MN leading to drug amorphization.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC is a rapid analytical technique commonly used for evaluating drug–excipient interactions through the appearance, shift, or disappearance of endothermal or exothermal effects and/or variations in the relevant enthalpy values (Verma and Garg, 2004). The thermal curves of pure MN, polymers, physical mixture and the prepared microparticles are show in Fig. 6 and 7. MN showed a melting event at 190°C in accordance to the literature. The same endothermic peak of the fusion of MN was found for the physical mixture. Moreover, this typical melting event was not observed in DSC curves of drug-loaded MN-microparticles, indicating a drug amorphization or molecular dispersion in polymer matrix.

In vitro drug release

Figures 8 e 9 illustrate the immediate release of MN from microparticles when compared to pure drug. The dissolution tests demonstrated that all formulations were able to increase the relative solubility of MN in artificial saliva, reducing their time interval to release. The profiles indicated that the average time for dissolution of 80% of the drug was approximately 420 min for pure MN, while the formulations using Eudragit® polymer, E10 and E20, showed on 60 and 180 min, respectively. Gantrez microparticles, G10 and G20, presented on 120 and 90 min, respectively and, finally, microparticles composed of the mixture of both polymers, EG10 and EG20, exhibited this dissolution percentage on 120 and 90 min. This result is due to some features as high superficial area and amorphous aspect of microparticles that increased the efficiency of dissolution of MN formulations.

Analysis of drug release behavior

The dissolution profiles were adjusted to the mathematical models. The model-dependent analysis revealed that pure drug, G10, G20 and EG20 formulations were fitted to the biexponential kinetics model of release. These results demonstrated that G10, G20 and EG20 microparticles improved the drug dissolution rate, nevertheless without changing its release model. The first stage of release was initially rapid (burst release) whereas the second stage of release was slow (controlled release). The other formulations, E10, E20 and EG10, were adjusted to the monoexponential kinetic model of release.

Antimicrobial Activity

The mean diameter of inhibition zones for microparticles and positive control against *Candida albicans* are presented in Table 3. All formulation showed a similar antimicrobial potential after 24 h of incubation to that achieved by positive control. Therefore, microencapsulation procedure using Eudragit® L100 and/or Gantrez MS-955 did not impair the antimicrobial performance of MN.

CONCLUSION

MN-microparticles were successfully prepared using a spray-drying method. Type of polymer and polymer:drug ratio of formulations were important to obtain spherical particles with smooth, rough or wrinkled surfaces. Micrometer-

sized and high drug-loading efficiencies were obtained for all formulations. Beside this, MN-loaded microparticles showed no changes in FTIR assignments, amorphous/non-crystalline characteristics and increased relative increasing of solubility and dissolution rate. In addition, microencapsulation process did not compromise the antifungal activity of MN. In summary, these formulations are feasible carriers for an immediate release of MN and can be used into conventional (gel) or novel bioadhesive (strips, powders, pounds, cushion, etc.) oral forms.

REFERENCES

- Akhter S, Paul S, Hasan I, Ayon NJ, Haider SS, Reza S (2013). Preparation, characterization and compatibility studies of naproxen loaded microspheres of cellulosic and polymethacrylic polymeric blend. *Dhaka Univ J Pharm Sci* **12**: 11-21.
- Almeida MA, Nadal JM, Grassioli S, Paludo KS, Zawadzki SF, Cruz L, Paula JP, Farago PV (2014). Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **1**:345-356.
- Arshady R. (1989). Microspheres and microcapsules: A survey of manufacturing techniques. Part 1: Suspension cross-linking. *Polym Eng Sci* **29**: 1746-1758.
- Barillaro V, Dive G, Ziémons E, Bertholet P, Evrard B, Delattre L, Piel G (2008). Theoretical and experimental vibrational study of miconazole and its dimers with organic acids: application to the IR characterization of its inclusion complexes with cyclodextrins. *Int J Pharm* **28**: 155-165.
- Bhalekar MR, Pokharkar V, Madgulkar A, Patil N, Patil N (2009). Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *AAPS PharmSciTech* **10**:289-296.
- Bouckaert S, Schautteet H, Lefebvre RA, Remon JP, van Clooster R (1992). Comparison of salivary miconazole concentrations after administration of a bioadhesive slow-release buccal tablet and an oral gel. *Eur J Clin Pharmacol* **43**:137-140.
- Bowey K, Swift BE, Flynn LE, Neufeld RJ (2013). Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by spray drying. *Drug Dev Ind Pharm* **39**: 457-465.
- Bowey K, Neufeld RJ. Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying (2010). *BioDrugs* **1**: 359-377.

Cetin M, Atila A, Kadioglu Y (2010). Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech* **11**: 1250-1256.

Dasan KP, Rekha C (2012). Polymer blend microspheres for controlled drug release: the techniques for preparation and characterization: a review article. *Curr Drug Deliv* **9**: 588-595.

Davis SS, Illum L (1988). Polymeric microspheres as drug carriers. *Biomaterials* **9**: 111-115.

Esposito E, Cervellati F, Menegatti E, Nastruzzi C, Cortesi R (2002). Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm* **21**: 329-334.

Genta I, Perugini P, Modena T, Pavanetto F, Castelli F, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Conti B (2003). Miconazole-loaded 6 oxychitin-chitosan microcapsules. *Carbohydrate Polymers* **52**: 11-18.

Hegazy N, Demirel MZ, Yazanm Y (2002). Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. *Int J of Pharm* **242**: 171-74.

Kilicarslan M, Gumustas M, Yildiz S, Baykara T (2014). Preparation and characterization of chitosan-based spray-dried microparticles for the delivery of clindamycin phosphate to periodontal pockets. *Curr Drug Deliv* **11** 98-111.

Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA, Arbos P (2005). Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules* **31**: 126-45.

Iskandar F, Gradon L, Okuyama K. Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol (2003). *J Colloid Interface Sci* **15**: 296-303.

Keegan GM, Smart JD, Ingram MJ, Barnes LM, Burnett GR, Rees GD (2012). Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. *J Dent* **40**: 229-240.

Kockisch S, Rees GD, Tsibouklis J, Smart JD (2005). Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur J Pharm Biopharm* **59**: 207-216.

Kockisch S, Rees GD, Young SA, Tsibouklis J, Smart JD (2003). Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an in vitro evaluation of mucoadhesive potential. *J Pharm Sci* **92**: 1614-1623.

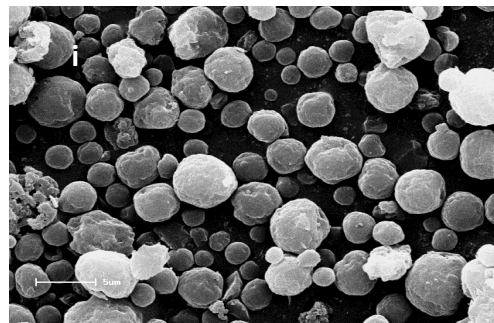
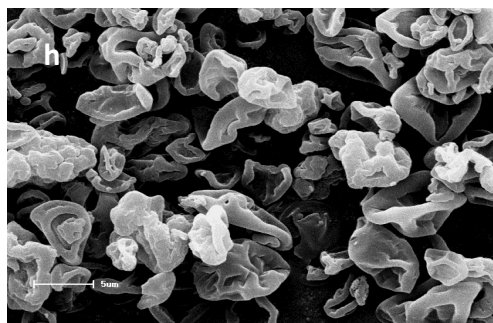
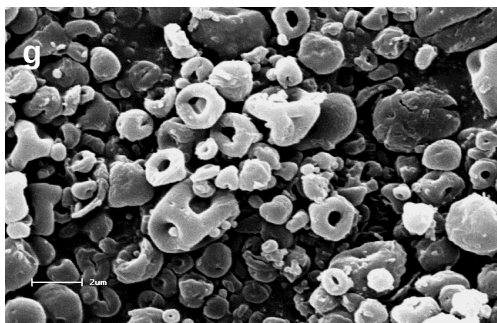
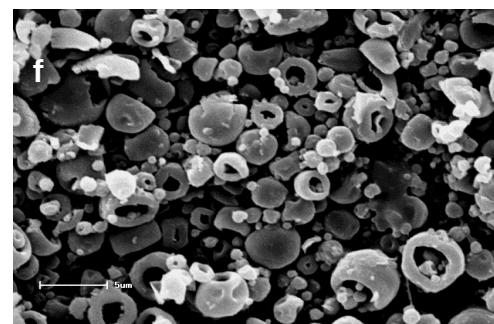
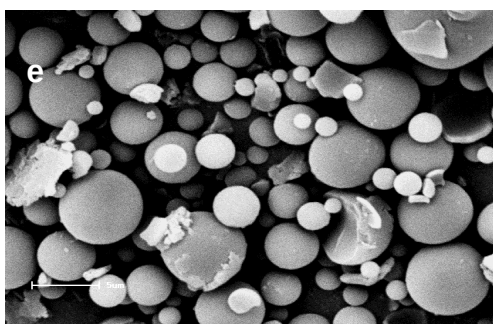
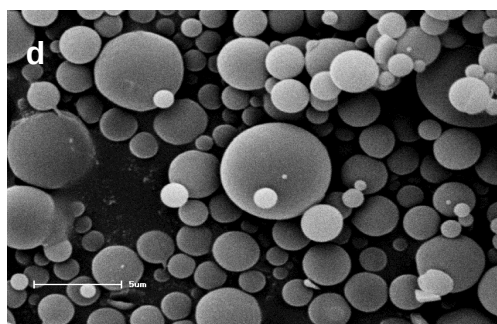
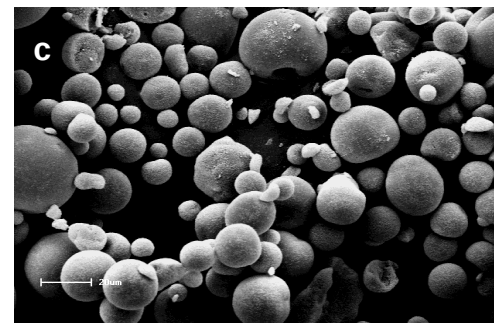
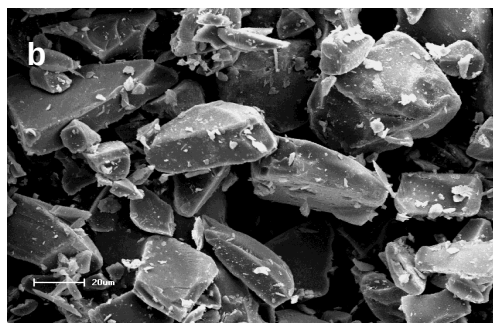
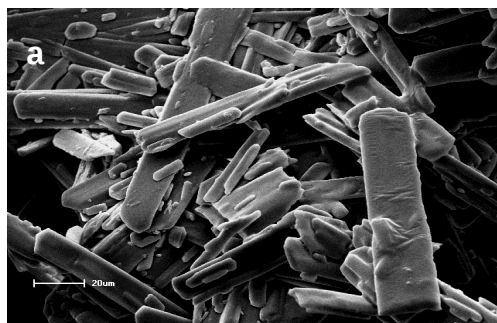
Kristmundsdottir T, Gudmundsson OS, Ingvarsdottir K (1996). Release of Diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray drying. *Int J Pharm* **137**:159-65.

Lacerda L, Parize AL, Fávere V, Laranjeira MC, Stulzer HK (2014). Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles

containing the antituberculosis drug rifampicin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **1**: 61-67.

Martinac A, Filipovic-Grcic J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E (2005). Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm* **291**:69-77.

FIGURES



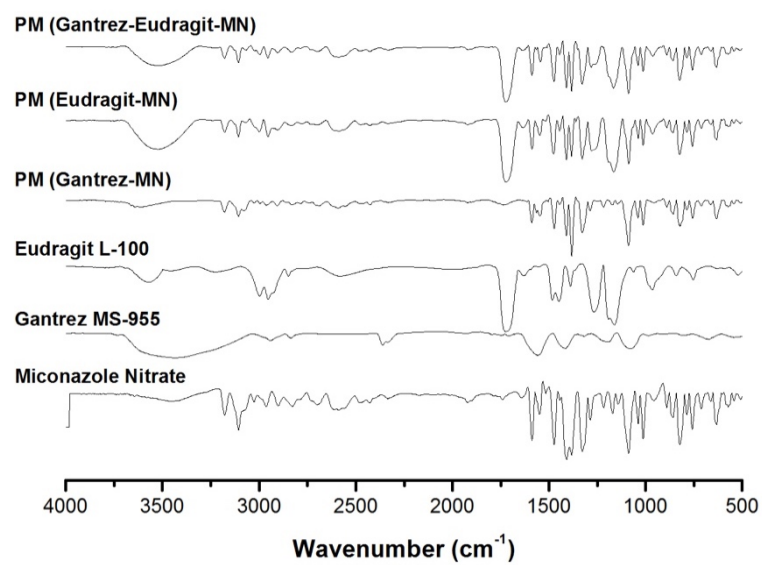


FIGURE 2

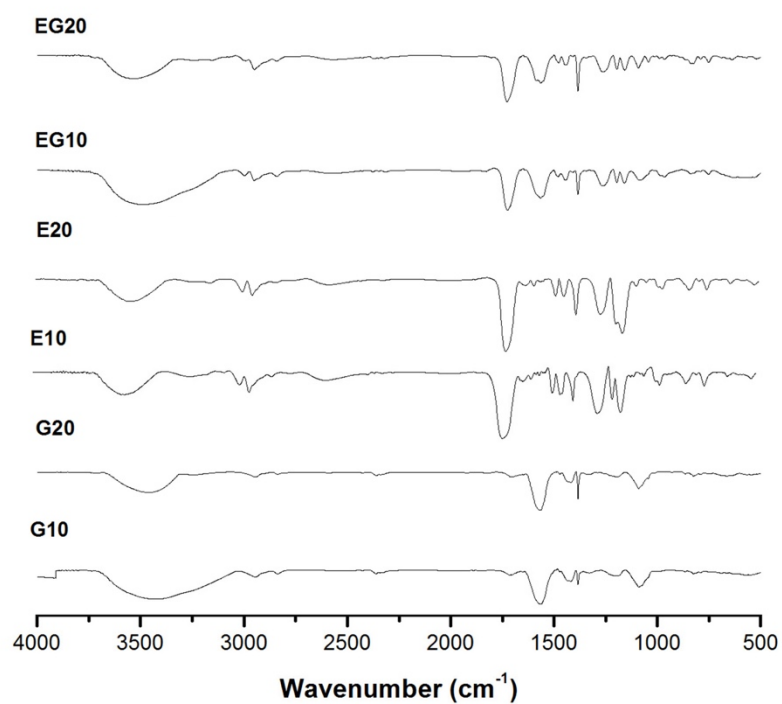


FIGURE 3

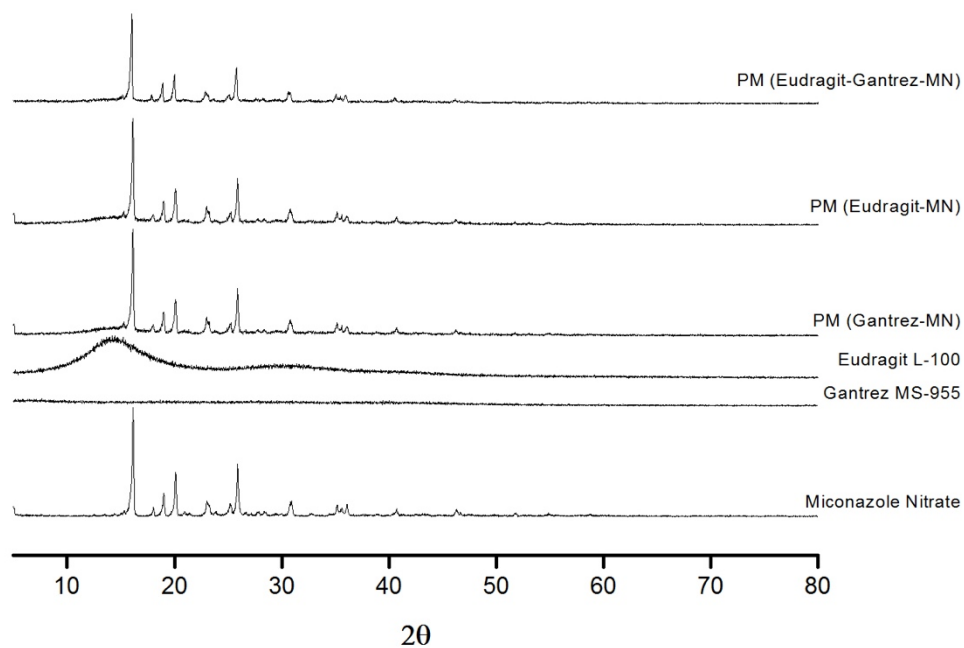


FIGURE 4

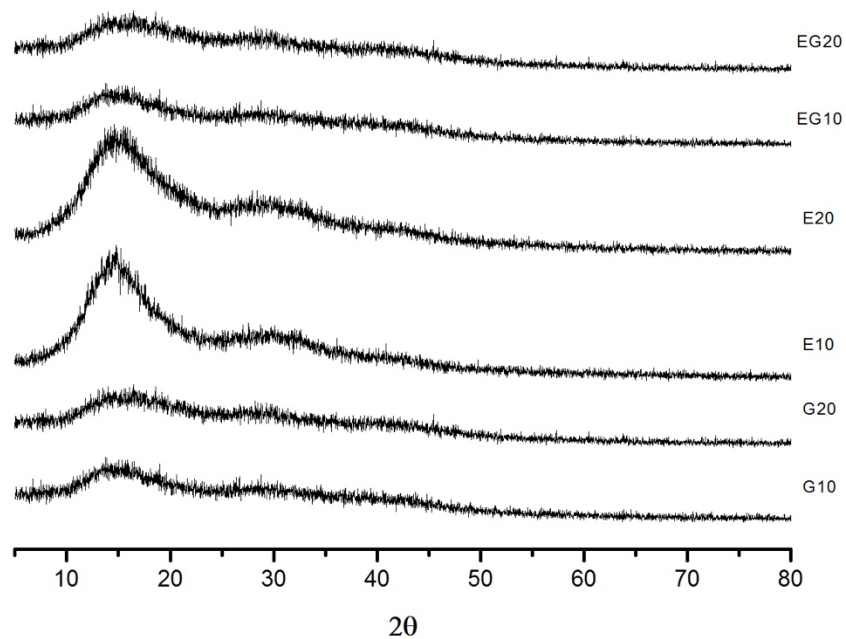


FIGURE 5

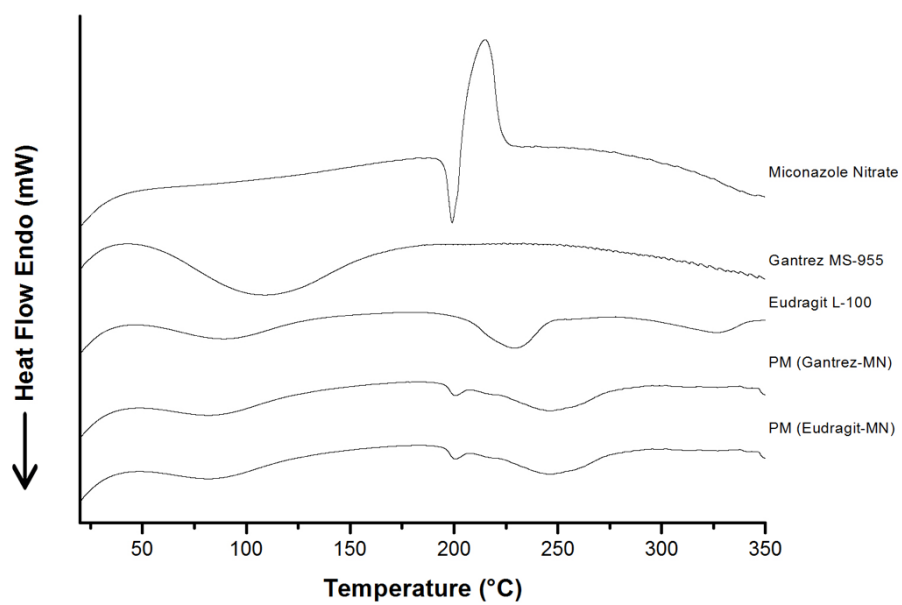


FIGURE 6

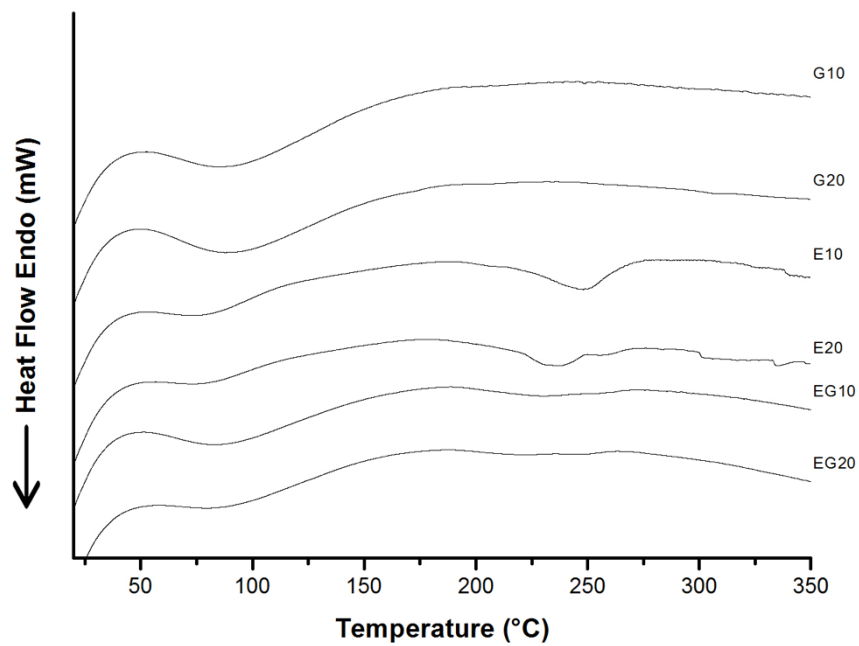


FIGURE 7

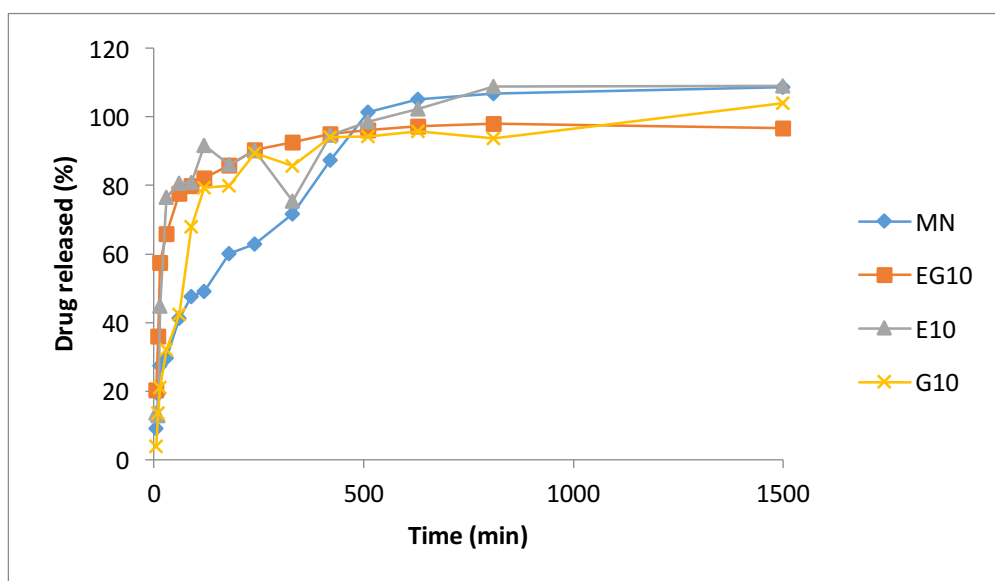


FIGURE 8

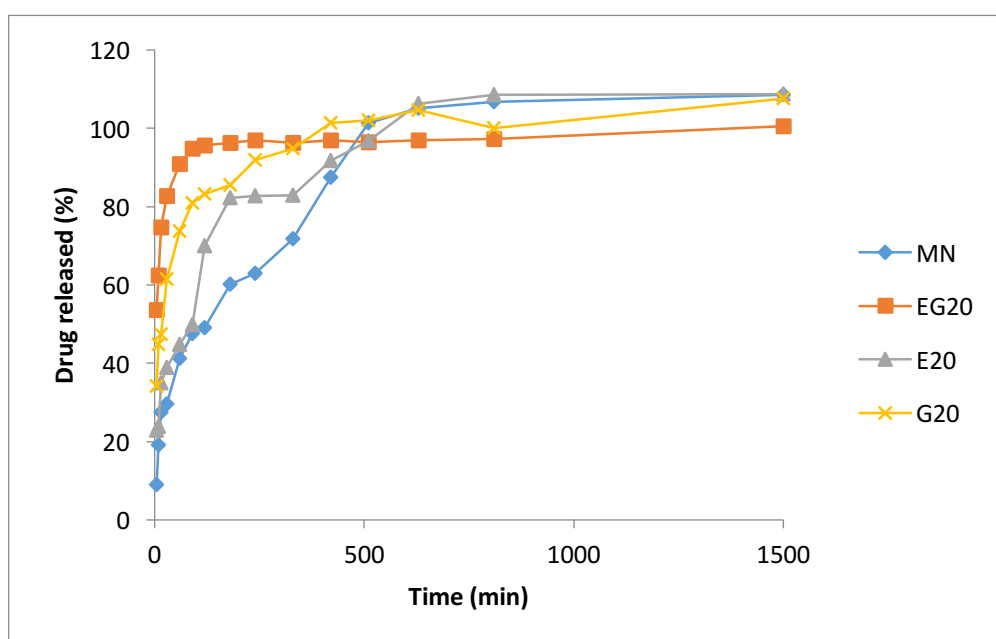


FIGURE 9

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Scanning electron microphotographs of formulations. **a:** MN, **b:** Gantrez MS-955, **c:** Eudragit® L100, **d:** E10, **e:** E20, **f:** G10, **g:** G20, **h:** EG10 and **i:** EG20.

Figure 2. FTIR spectra of miconazole nitrate, Gantrez MS-955, Eudragit® L100, and physical mixture.

Figure 3. FTIR spectra of loaded microparticles of Gantrez MS-955 (G10, G20), Eudragit® L100 (E10, E20), and Gantrez:Eudragit® (EG10, EG20).

Figure 4. Wide-angle XRD patterns of miconazole nitrate, Gantrez MS-955, Eudragit® L100, and physical mixture

Figure 5. Wide-angle XRD patterns of Gantrez MS-955 (G10, G20), Eudragit® L100 (E10, E20), and Gantrez:Eudragit® (EG10, EG20).

Figure 6. DSC curves of miconazole nitrate, Gantrez MS-955, Eudragit® L100, and physical mixture.

Figure 7. DSC curves of loaded microparticles of Gantrez MS-955 (G10, G20), Eudragit® L100 (E10, E20), and Gantrez:Eudragit® (EG10, EG20).

Figure 8. *In vitro* release profiles of pure drug, E10, G10 and EG10 MN-loaded microparticles

Figure 9. *In vitro* release profiles of pure drug, E20, G20 and EG20 MN-loaded microparticles

TABLES

Table 1. Composition of miconazole nitrate (MN) microparticles

Composition	Formulation								
	E0	E10	E20	G0	G10	G20	EG0	EG1 0	EG2 0
<i>Aqueous phase</i>									
Purified water (mL)	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0
Gantrez MS-955 (g)	--	--	--	4.00	7.2	6.4	4.0	3.6	3.2
<i>Organic phase</i>									
MN (g)	--	0.8	1.6	--	0.8	1.6	--	0.8	1.6
Eudragit® L100 (g)	4.0	7.2	6.4	--	--	--	4.0	3.6	3.2
Ethanol (mL)	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0	200. 0

Table 2. MN loading, encapsulation efficiency and mean diameter of microparticles.

Formulation	Percentage Yield (%)	Encapsulation efficiency (%)	Mean diameter (μm)
E10	38.35±3.35	106.22±3.15	4.26±1.21
E20	37.22±2.78	100.26±4.39	2.45±0.93
G10	51.85±4.67	99.43±2.72	3.38±0.82
G20	49.35±3.21	89.07±2.37	1.92±0.63
EG10	55.36±3.07	96.64±1.72	4.12±1.29
EG20	54.15±2.18	95.35±3.13	3.44±0.98

Table 3. Zones of growth inhibition in millimeters provided by MN microparticles and controls against *C. albicans*. Each value is the mean $\pm$ standard deviation of three determinations.

Formulation	Zone of growth inhibition (mm)
E10	18.88 $\pm$ 0.76
E20	20.17 $\pm$ 1.21
G10	19.48 $\pm$ 0.74
G20	19.59 $\pm$ 0.95
EG10	20.77 $\pm$ 0.86
EG20	21.43 $\pm$ 1.38
Positive control	20.55 $\pm$ 0.73

4.3 ARTIGO "DENTURE ADHESIVE CONTAINING MICONAZOLE NITRATE POLYMERIC MICROPARTICLES: ANTIFUNGAL, ADHESIVE FORCE AND TOXICITY PROPERTIES"

Denture Adhesive Containing Miconazole Nitrate Polymeric Microparticles: Antifungal, Adhesive Force and Toxicity Properties

Andrés Felipe Cartagena¹
Luís Antonio Esmerino²
Rogerio Polak-Junior³
Milton Domingos Michél³
Paulo Vitor Farago²
Nara Hellen Campanha¹

¹ Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

³ Department of Materials Science and Engineering, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

Corresponding author

Dra. Nara Hellen Campanha

Graduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa

Address: 4748 Carlos Cavalcanti Avenue, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil

Tel & Fax: 55 42 3220-3101

E-mail: narahell@yahoo.com.br

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop an antifungal denture adhesive (DA) by incorporating new polymeric miconazole nitrate (MN) microparticles aiming denture stomatitis (DS) treatment. Spray drying Eudragit L-100 (E) and Gantrez MS-955 (G) MN-microparticles were incorporated in DA. DAE1, DAG1, DAEG1, DAE2, DAG2, DAEG2 groups were obtained from the combination of polymers used in MN-microparticles (E, G and EG) and concentration of MN into DA (1 and 2%). DA pure MN 2% (DAM) and DA without microparticles or drug (DACT) were controls. All groups were evaluated to determine microbiological assay, adhesive force and toxicity. Minimum inhibitory concentration (MIC) against *Candida albicans* was performed by broth micro-dilution and agar dilution methods in extract of DAs and conventional gel form (Darktarin®). Adhesive load test was made between acrylic resin samples on a universal testing machine after immersion in water. The toxicity of several dilutions of DAs was performed with *Artemia salina* bioassay after 24 and 48 h. Data of adhesive force were evaluated with two-way ANOVA and Bonferroni tests ($\alpha=0.05$). The concentration required to kill 50% (LC_{50}) was determined using the Provit analysis. DA with polymeric microparticles and pure drug presented MIC between 1.25 – 5 $\mu\text{g/mL}$ similar to MIC values of DAM. DAEG2, DAEG1, DAG20 showed the most actives against *C. albicans*. The best adhesive properties were exhibited by DAEG2, consisting of high initial adhesive force which was maintained for up to 6 h. The extracts of all DA presented low or not toxicity at 24 and 48 h. DA containing 2% of MN loaded in microparticles made by Gantrez alone or combined with Eudragit can produce effective antifungal activity, good adhesive force, and no toxicity effect. Future clinical studies can be made to verify these results.

INTRODUCTION

Denture stomatitis (DS) is the erythematous inflammatory condition more frequently found in patients with removable dentures¹⁻³. Affected patients can complain of a burning sensation, unpleasant taste and discomfort, but most cases are asymptomatic and individuals without knowledge of the disease are commonly found. It features different clinical manifestations which are classically categorized according to the severity of inflammation⁴. Independent of the

contribution factors like as age, systemic disease, smoking, wearing complete dentures during sleep, reduced salivary flow, trauma caused by the lack of retention and stability of the prosthesis, the fungi *Candida albicans* is considered as the primary etiological factor of DS. Despite the prevalence of this microorganism^{5, 6}, non-albicans species such as *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* have emerged as denture colonizers and pathogens^{5, 7-10}.

In order to treat superficial mucosal candidiasis, miconazole nitrate (MN) is one of the first line broad-spectrum triazole antifungal agent used¹¹. MN oral gel is the dosage form more widely available worldwide¹². Such oral gel has only a short contact time with the mucosa as a result of salivation, swallowing reflex, speaking, chewing, and the food passage^{13, 14}. This short retention time in the disease affected area causes high initial concentrations of MN, followed by rapidly level decreases at subtherapeutic concentrations, requiring multiple administrations each day and patient's treatment quit¹⁵.

Besides these disadvantages, MN has a very low aqueous solubility leading to erratic and unpredictable bioavailability in the target area¹². Recently, spray dried polymeric microparticles of MN presenting improvements in drug solubility and antifungal activity against *C. albicans* have been developed (*submit article*). These microparticles were formulated using Eudragit L-100 polymer, which has a favorable release profile on oral pH^{16, 17} and the mucoadhesive polymer Gantrez MS-955, recognized to extend the residence time of drugs on several membranes^{18, 19}. The increase in solubility profile of MN was possible due to the blending of both water-soluble polymers and the reduction of crystalline structure of MN.

Mucoadhesion is a promising strategy which renews interest for an adequate and prolonging drug release to the conventional oral medications^{20, 21}. Mucoadhesive formulations can be attached into the mucosa for extended periods of time, allowing an increase of drug bioavailability¹⁵. They have been effective for systemic delivery of drug as well as for local treatment of oral cavity²².

Denture adhesives (DA) have been accepted as treatment adjunct for the improvement retention and stability of removable denture wearers²³. They are available in creams, strips, powders and cushion formulations and can be classified as muco-adhesive compositions. Usually, DA cream formulation is

made of a mixture of water-soluble polymers that provide mucoadhesive characteristics and base components that facilitate the placement of it^{24, 25}. Some authors have reported a retentive effect of DA for 6-8 hours in denture wearers. This period of time could be employed to the drug release of antimicrobial agents such as MN in the therapy of DA, however, few studies have investigated this option.

Therefore, the purpose of the present study was to develop antifungal-DA formulations by incorporation of the pH depend and muco-adhesive polymeric MN-microparticles aiming DS treatment.

MATERIAL AND METHODS

Polymeric microparticles of MN were obtained using the methodology previously developed. Thus, using the polymers Eudragit L-100 (E) and Gantrez MS-955 (G), polymeric microparticles were loaded with 10 and 20 percent of MN by the spray dried method.

A denture adhesive cream was developed from two types of synthetic water-soluble polymers and base materials. Details and percentages of materials used in the DA formulation can be seen in Table 1. All the formulation components were adequately weighed and mixed by a mechanical vacuum mixer at 2400 rpm by 20 min. Ten percent (w/w) of MN microparticles were incorporated on the DA and mixed, to achieve final concentrations of 1% and 2% of MN. Then, six DA were obtained from the combination of polymers used in the formulation of microparticles and the final concentration of MN (DAE1, DAG1, DAEG1, DAE2, DAG2, DAEG 2). DA formulation 2% of pure MN (DAM) and without the addition of any microparticles or pure drug (DACT) was used as controls.

Microbiological Assays

Extracts of DA 2% w/v were also prepared in Mueller-Hinton broth²⁶⁻²⁹ and diluted in MN theoretical concentration from 0.312 – 40 µg/mL. MICs were determined by both a broth micro-dilution method based on the NCCLS M27-A³⁰ with modification and an agar dilution method based on the NCCLS M27-P³¹. Cells of *C. albicans* ATCC 10231 were resuspended in saline, and suspension adjusted to 0.5 McFarland standard and then diluted 10-fold with saline to give

an yeast suspension of 0.5×10^5 to 2.5×10^5 CFU per mL. All tests were carried in triplicate.

The agar dilution test was performed with Mueller-Hinton agar 2% glucose. The agar medium (18 mL) was then poured into Petri dishes containing 2 mL of serial dilution of DA in broth medium and was solidified. The suspension of *C. albicans* was loaded on a sterile cotton swab and plated by stirring the swab over the entire surface. For the broth dilution assay, we used a modified CLSI M27-A3 microdilution method. Aliquots of 180 μ L of the *C. albicans* suspensions in Mueller-Hinton broth were inoculated into microtiter plate wells containing 20 μ L of DA's dilutions.

Recorder of Petri dishes and plates were made after incubated at 37°C for 24 h. MICs were defined as the lowest concentration that suppressed any visible growth, or causing almost complete inhibition of growth for both test.

Adhesive Force

Adhesive force was performed between denture base acrylic resin samples. Two polymethylmethacrylate resin (Vipi wave, Pirassununga, SP, Brazil) cylinders were microwave heat-processed on dimensions of 25 mm (diameter) x 35 mm (height) and flat finished with 600-grit silicon carbide paper for the test surface.

Amounts of formulations of the DA (0.3 g) were weight and immersed in distilled water at 37°C for 0.5 (T0.5), 1 (T1), 3 (T3) and 6 (T6) hours. Before this time, DA was applied to the top of one acrylic resin and cylinders were attached on the sample stands to testing machine (AG-I Shimadzu Model Autograph; Shimadzu, Kyoto, Japan). Load of 12 N was applied using a compression force for 30 s to simulate a gentle occlusal force. The adhesive force was then measured at crosshead speed of 1 mm/min, in tensile mode, and the maximum force before failure was calculated. Each test was repeated 10 times, and a mean value was calculated. Between tests the acrylic resin cylinders were cleaned with 99% ethanol, washed with antibacterial soap, water and dried by hand with a paper towel and air dried^{32, 33}. Data were submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni tests ($\alpha=0.05$).

Bioassay Toxicity

Artemia salina assay was used for toxicity determination of DA extracts, according to Meyer et al. (1982). Brine shrimp eggs were placed in saline (3.8% w/v sea salt in distilled water) and incubated at 24–28°C, pH between 7-8 and constant illumination. Eggs hatch and mature within 48 h providing large number of larvae (nauplii). Ten nauplii were placed in vials containing 5 mL of seawater and increasing concentrations of adhesive extracts (25-1000 µL/mL). Serial dilutions were prepared in order to reach the chosen concentrations in the final volume (5 mL). Controls were made in vials containing 5 mL of saline and 0.1% potassium dichromate in same dilution concentration to extracts. The vials were maintained under illumination. All experiments were carried out in triplicate. Alive nauplii were recorded after 24 and 48 h using a stereomicroscope. The data were corrected using Abbott's formula as follows: % deaths = [(Test-control)/control × 100]³⁴. The concentration required to kill 50% (LC₅₀) was determined using the Provit analysis.

RESULTS

The MIC values of the 7 tested extracts of denture-adhesives against of *C. albicans* ATCC 10231 studied at 24 h are summarized in Table 2. The results confirmed the antifungal activity of extracts of denture adhesives that contains MN or MN-microparticles for both methods employed. The range of MICs was 1.25-5 µg/mL.

The most actives extracts against *C. albicans* were DAEG20, DAEG10 and DAG20 with MIC 1.25;1.25 µg/mL (microdilution;agar-dilution). Extracts of DAMN, DAE10 and DAG10 were also very active against *C. albicans* when compared with conventional MN gel form (Daktarin®).

The ANOVA results (Table 3) indicate significant differences among the tested materials and reveal significant effects of immersion time on adhesive force ($p < 0.000$). Table 4 shows the variation in adhesive force of the tested materials according to immersion time.

Higher initial values were obtained for groups DAEG1, DAG2 e DAEG2. For groups DACT, DAMN and DAG1, the adhesive force sharply increased after immersion in water for 1 h, and thereby continued to increased up to 3 h, and decreased up to 6 h. In the period of 3 hours of observation the formulations, DACT, DAMN, DAE2, DAEG2 presented high FA values.

The addition of pure MN in the adhesive formulation exhibited not interfere significantly on the values of adhesive force along the evaluated times. Meanwhile, the incorporation of EG20 MN-microparticles showed a considerable increase in values of adhesive force at T6 observation time.

The best adhesive properties were exhibited by DAEG2, consisting of high initial adhesive force which was maintained for up to 6 h.

The results of LC_{50} values of DA extracts are shown in Table 5. All the tested extracts showed that the concentration was directly correlated to the death of brine shrimps. Extracts with microparticles or pure MN were more toxic in comparison to the control formulation (DACT). LC_{50} values ranged from 349.53 to 931.00 $\mu\text{g/mL}$, with DAE20 having the lowest value (most toxic); this was followed by DAG20 and DAEG20. Extracts of adhesives containing particles MN at 10% were shown to be less toxic compared to extracts of adhesives MN at 20%. Toxicity assays revealed nine extracts of denture adhesives with low or no toxicity at 24 and 48 h ($LC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$).

DISCUSSION

The literature have been shown resistance of *Candida* species to conventional anti-fungal agents and ineffective therapies. One of the strategies to resolve this problem, specifically in DS have focused on searching developing new pharmaceutical formulations^{22, 35, 36}, oral hygienic education³⁷, phytotherapy³⁸, and controlling the factors that may cause trauma to the mucosa.

Some studies have been conducted aiming to incorporate antifungal agents and other technologies for inhibiting microorganisms in materials for denture base³⁹, and, liners⁴⁰ and tissue conditioners⁴¹. In this study, the chosen strategy, was an attempt to incorporate antifungal on DA to improve an efficient antifungal activity, without impairment adhesive strength and increase toxicity, when using various formulations and concentration of MN-microparticles.

It was observed that MIC of MN in broth microdilution and agar dilution methods range from 1.25 to 5 $\mu\text{g/mL}$. These results are according to the values reported by previous studies for MN in gel form (1 to 10 $\mu\text{g/mL}$)³⁶. These results

showed an effective release of MN and MN-microparticles in microbiological tests and compatibility of new strategy to load anti-fungal agent in DA. Meanwhile, MICs for some formulations loaded with MN-microparticles (DAEG10, DAG20, DAEG20) presenting a better antimicrobial effectiveness when compared to the adhesive formulation in which the pure MN was added. These results can be explained by the improved solubility of the MN obtained after the microencapsulation process. Some authors have reported problems with topical formulations of MN, and therefore, compromised bio-disponibility and microbiological effectiveness^{35, 36, 42}. However, the incorporation of the MN microparticles in matrix of DA did not impair its microbiological efficacy.

Muco-adhesion has shown renewed interest for prolonging the residence time of muco-adhesive dosage forms through various mucosal routes in drug delivery applications^{15, 20, 22}. In the present study, the adhesive force of the experimental formulation used was maintained for approximately 6 h. This result can improve a better approach in comparison to the classical not muco-adhesive formulations such as gel. The contact of gel form of MN in the affected area is lost after a few minutes in case of removable prosthesis users at normal functions of oral cavity. This short time of retention requires the application several times a day (6 times) and the constant ingestion of formulation⁴³. Thus, the use of the DA loaded with MN-microparticles in the treatment of DS would be feasible approach.

However, this study also found that all the formulations tended to lose their adhesive efficacy as time progressed. These data agree with the results of other clinical and laboratorial studies reporting the loss of gradually retention of DA^{24, 25, 33}. This can be explained by the composition of materials. The active ingredients of this DA consisted of CMC and Gantrez, both water-soluble polymers, but with different solubility depending on time. Between the two polymers, the CMC has the scope to provide a strong initial adhesion, and Gantrez would have a part in the late material adherence to present a lower solubility in comparison to the other polymer^{24, 25}. Therefore, it could be said that the incorporation of microparticles containing the Gantrez MS-955 polymer influenced effectively in the maintenance of the adhesive force of the formulation DA as seen in the results (Table 3).

Several assays for toxicological testing of dental materials have been developed. In addition to standard tests, there is a need to establish rapid, lower

cost, and convenient methods to predict the toxic effects of dental materials. The brine shrimp lethality assay has been used routinely in the primary screening of the crude extracts as well as isolated compounds to assess the toxicity towards brine shrimp, which could also provide an indication of possible cytotoxic properties of the test materials^{45, 46}. In the meantime, few studies have been found using this methodology in assessing the toxicity in dental materials^{47, 48}. The experimental formulations have demonstrated lower or no toxicity with artemias test (CL_{50} 349.53 to 931.00 $\mu\text{g/mL}$). This result can be compared with some available cytotoxicity studies that have reported some degree of cytotoxicity between moderate and slightly in commercial DA with a similar composition to the formulations proposed in this study. However, it was confirmed by the results of this study increased toxicity dependent on concentration of extract and evaluation time of assay. On the other hand, evidence of toxicity to anti-fungal drug has been showed, when MN or MN-microparticles were added to formulation on DA.

This study had some limitations. It is evident that *in vitro* methods do not give sufficient information and that there is a need for diverse methods addressing different biological endpoints for the evaluation of dental products. DA loaded with MN have showed good results in the initial tests of microbiological efficient, adhesive retention and toxicity. Nevertheless, some *in vitro* tests are required to propose load-DA with MN-microparticles as suitable formulation for treating DS. On the other hand, based on the current acceptance of DA, the use of load-DA can be an interesting proposition for industry, patients and clinicians. Thus, assays in complexes biofilms of *Candida* species and cell culture can be performed to complete the laboratory test, before initiating any type of clinical studies.

CONCLUSION

The incorporation of polymeric MN-microparticles in DA resulted in effective strategy as dosage form for the MN without changing their antifungal effect, adhesive and toxicity properties. From the preliminary results, the DA has a great potential for treatment to DS.

REFERENCES

1. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
2. Emami E, Taraf H, de Grandmont P, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2012 Mar-Apr;25(2):113-9.
3. Gendreau L and Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011 Jun;20(4):251-60.
4. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J*. 1962 May;(112):357-60.
5. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, et al. *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol*. 1999 Jun;16(2):72-6.
6. Rodrigues JA, Hofling JF, Tavares FC, Duarte KM, Goncalves RB and Azevedo RA. Evaluation of biochemical and serological methods to identify and clustering yeast cells of oral *Candida* species by CHROMagar test, SDS-PAGE and ELISA. *Braz J Biol*. 2004 May;64(2):317-26.
7. Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol*. 1993 19(2):61-82.
8. Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA, Jr., Merz WG and Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol*. 1999 Feb;37(2):321-6.
9. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA and Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol*. 2002 42(3):207-27.
10. Vargas KG and Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):341-50.
11. Bouckaert S and Remon JP. In-vitro bioadhesion of a buccal, miconazole slow-release tablet. *J Pharm Pharmacol*. 1993 Jun;45(6):504-7.
12. Sawyer PR, Brogden RN, Pinder RM, Speight TM and Avery GS. Miconazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1975 9(6):406-23.
13. Gupta A, Garg S and Khar RK. Measurement of bioadhesive strength of mucoadhesive buccal tablets: Design of an in vitro assembly. *Indian Drugs*. 1993 30:152-5.
14. Vazquez JA and Sobel JD. Miconazole mucoadhesive tablets: a novel delivery system. *Clin Infect Dis*. 2012 May;54(10):1480-4.
15. Nafee NA, Ismail FA, Boraie NA and Mortada LM. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *Int J Pharm*. 2003 Oct 2;264(1-2):1-14.
16. Rizi K, Green RJ, Khutoryanskaya O, Donaldson M and Williams AC. Mechanisms of burst release from pH-responsive polymeric microparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011 63(9):1141-55.

17. Cetin M, Atila A and Kadioglu Y. Formulation and in vitro characterization of Eudragit(R) L100 and Eudragit(R) L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Sep;11(3):1250-6.
18. Kockisch S, Rees GD, Young SA, Tsibouklis J and Smart JD. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an in vitro evaluation of mucoadhesive potential. *J Pharm Sci*. 2003 Aug;92(8):1614-23.
19. Kockisch S, Rees GD, Tsibouklis J and Smart JD. Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Jan;59(1):207-16.
20. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD and Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011 Jan;3(1):89-100.
21. Bartels HA. Bacteriological Appraisal of Adhesive Denture Powders. *Journal of Dental Research*. 1945 24(1):15-6.
22. Madgulkar A, Kadam S and Pokharkar V. Development of Buccal Adhesive Tablet with Prolonged Antifungal activity: Optimization and ex vivo Deposition Studies. *Indian J Pharm Sci*. 2009 May;71(3):290-4.
23. Papadiochou S, Emmanouil I and Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015 May;113(5):391-7 e2.
24. Han JM, Hong G, Dilinuer M, et al. The adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov;72(8):839-45.
25. Han JM, Hong G, Hayashida K, Maeda T, Murata H and Sasaki K. Influence of composition on the adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Dent Mater J*. 2014 33(1):98-103.
26. Lee SC, Fung CP, Lee N, et al. Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucose-enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1615-7.
27. Lee SC, Lo HJ, Fung CP, Lee N and See LC. Disk diffusion test and E-test with enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species to voriconazole and fluconazole. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009 Apr;42(2):148-53.
28. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Hollis RJ and Diekema DJ. Stability of Mueller-Hinton agar supplemented with glucose and methylene blue for disk diffusion testing of fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1288-9.
29. Rimek D, Fehse B and Gopel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 2008 May;51(3):205-8.
30. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
31. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.
32. DeVengencie J, Ng MC, Ford P and Iacopino AM. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates. *Int J Prosthodont*. 1997 Jan-Feb;10(1):61-72.
33. Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA and Han GL. Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater*. 2004 Jun;20(5):419-24.

34. Pelka M, Danzl C, Distler W and Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry*. 2000 Jun;28(5):341-5.
35. Rai VK, Yadav NP, Sinha P, et al. Development of cellulosic polymer based gel of novel ternary mixture of miconazole nitrate for buccal delivery. *Carbohydr Polym*. 2014 Mar 15;103:126-33.
36. Cardot JM, Chaumont C, Dubray C, Costantini D and Aiache JM. Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Oct;58(4):345-51.
37. Ercalik-Yalcinkaya S and Ozcan M. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont*. 2015 Jun;24(4):271-8.
38. Ferreira GL, Perez AL, Rocha IM, et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 2015:147804.
39. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E and Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol*. 2012 Jun;112(6):1163-72.
40. Alcantara CS, Macedo AF, Gurgel BC, Jorge JH, Neppelenbroek KH and Urban VM. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci*. 2012 Nov-Dec;20(6):607-12.
41. Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 1985 Mar;12(2):177-82.
42. Zhang LW, Fu JY, Hua H and Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2015 Oct 12.
43. Fothergill AW. Miconazole: a historical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006 Apr;4(2):171-5.
44. Kore DR, Kattadiyil MT, Hall DB and Bahjri K. In vitro comparison of the tensile bond strength of denture adhesives on denture bases. *J Prosthet Dent*. 2013 Dec;110(6):488-93.
45. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE and McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982 May;45(5):31-4.
46. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M and Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru*. 2015 2320.
47. Pelka M, Danzl C, Distler W and Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent*. 2000 Jul;28(5):341-5.
48. Milhem MM, Al-Hiyasat AS and Darmani H. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *J Appl Oral Sci*. 2008 Jul-Aug;16(4):297-301.

TABLES

Table 1. – Components used in denture adhesive formulation.

Material	Manufacturer	Lot no.	% wt
Gantrez MS-955	ISP, Wilmington, Delaware, USA	CC2305825	37.5
Sodium carboxymethyl cellulose (CMC)	ISP, Wilmington, Delaware, USA	70028	15.5
Liquid parafin	Ind. e Farm. LIFAR LTDA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil	L32456	10.4
White petrolatum	Ind. e Farm. LIFAR LTDA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil	AC8763	28.5
Versagel® MN	Penreco, Karns City, Pensilvania, EUA	K1002	5
Colloidal Silica	Evonik Industries, Essen, Germany	0288	3
BHT	Mapric, São Paulo, São Paulo, Brazil	329850	0.05
Nipazol® (propilparabeno)	Aboisa, Santa Cecília, São Paulo, Brazil	R24591	0.05

Table 2. Minimum inhibitory concentrations of denture adhesives at 24 h.

Range (µg/mL) of MN	Adhesive extract	Broth microdilution (µg/mL)	Agar dilution (µg/mL)
0.312 – 40	ACT	--	--
	AMN	2.5	5
	AE1	2.5	2.5
	AG1	2.5	2.5
	AEG1	1.25	1.25
	AE2	2.5	1.25
	AG2	1.25	1.25
	AEG2	1.25	1.25
	Daktarin®	2.5	2.5

Table 3. Summary table analysis showing sources of variability and associated degrees of freedom in analytic model

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	2100,875 ^a	31	67.770	20.987	<.000
Intercept	26727.866	1	26727.866	8277.155	<.000
Time	1028.595	3	342.865	106.179	<.000
DA	331.176	7	47.311	14.651	<.000
Time * DA	741.104	21	35.291	10.929	<.000
Error	413.326	128	3.229		
Total	29242.068	160			
Corrected Total	2514.202	159			

Table 4. Mean and standard deviation of the adhesive force (N) of denture adhesives subjected to tensile test.

	ACT	AMN	AE1	AG1	AEG1	AE2	AG2	AEG2
T0.5	11.82 ± 1.1	9.64 ± 0.89	11.17 ± 1.45	7.89 ± 3.01	16.33 ± 0.72	7.79 ± 0.47	13.11 ± 0.69	14.47 ± 0.79
	cBC	cCD	aBCD	cDE	aA	bDE	aABC	aAB
T1	15.07 ± 1.51	15.26 ± 1.93	11.74 ± 1.21	12.26 ± 1.77	16.49 ± 2.80	8.99 ± 1.05	15.16 ± 2.07	15.94 ± 3.26
	bABC	bAB	aBCD	bBCD	aA	bD	aABC	aA
T3	20.63 ± 1.94	18.8 ± 1.66	12.23 ± 2.56	16.53 ± 2.21	12.8 ± 2.23	18.21 ± 0.78	15.82 ± 1.3	17.2 ± 3.20
	aA	aAB	aC	aB	bC	aAB	aBC	aAB
T6	7.7 ± 1.06	8.8 ± 0.85	10.86 ± 0.88	11.02 ± 1.33	7.4 ± 1.30	7.79 ± 0.8	9.79 ± 0.98	14.91 ± 3.25
	dBC	cBC	aCD	bBC	cBD	bBC	bBC	aA

* Capital letters describes differences between different adhesive formulations.

** Lower case letters represent differences between different evaluation times.

Table 5. Toxicity of denture adhesive extracts against nauplii of *Artemia salina*.

Adhesive extract	24 h		48 h	
	LC ₅₀ µg/mL	Toxicity Classification	LC ₅₀ µg/mL	Toxicity Classification
ACT	>1000	NT* or low	931.00	NT* or low
AMN	>1000	NT* or low	645.07	NT* or low
AE1	>1000	NT* or low	809.19	NT* or low
AG1	>1000	NT* or low	545.29	NT* or low
AEG1	>1000	NT* or low	821.54	NT* or low
AE2	>1000	NT* or low	349.53	NT* or low
AG2	>1000	NT* or low	353.71	NT* or low
AEG2	>1000	NT* or low	438.96	NT* or low

*NT= non toxicity

5. DISCUSSÃO

Tem-se verificado associação entre estomatite protética (EP) e falta de estabilidade e retenção das próteses (Ozcan et al.⁴² 2005, Martori et al.⁶⁴ 2014). No presente trabalho, propõe-se uma abordagem terapêutica que associa a disponibilidade de nitrato de miconazol (NM) no local acometido pela EP à melhoria da retenção, estabilidade e suporte das próteses, por meio da incorporação desse antifúngico aos adesivos para próteses. Nesse sentido, o uso de formulações para liberação controlada de medicamentos, tais como de micropartículas poliméricas, pode facilitar a incorporação do fármaco nos adesivos para próteses e potencializar sua ação no combate a EP.

Antes de se propor essa forma de tratamento, deve-se verificar a presença, a concentração e a dinâmica de liberação do fármaco a partir das micropartículas desenvolvidas, entre outros testes. Diversos métodos têm sido descritos na literatura para a determinação de NM isoladamente ou em combinação com vários fármacos, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Di Pietra et al.⁶⁵ 1992, Kobylinska et al.⁶⁶ 1996, Cavrini et al.⁶⁷ 1989), cromatografia de gás (Neill et al.⁶⁸ 1991) e espectrofotometria (Cavrini et al.⁶⁷ 1989, Wrobel et al.⁶⁹ 1999, Khashaba et al.⁷⁰ 2000). A validação de métodos analíticos é um importante requisito regulamentar em análise farmacêutica. A CLAE é comumente usada como uma técnica analítica no desenvolvimento e validação de métodos de ensaio para formas farmacêuticas e substâncias medicamentosas (ICH⁵⁰ 1996). A validação de um método fornece evidências documentadas e um alto grau de certeza de que o método de análise utilizado para um teste específico é adequado para o uso pretendido. Dessa forma foi necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a quantificação de NM contido nas micropartículas poliméricas propostas na presente tese. A quantificação analítica foi elaborada seguindo os delineamentos fornecidos pela Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) (ICH⁵⁰ 1996) e a regulação brasileira RE 899/2003 da ANVISA (Sanitária⁴⁹ 2003). Observou-se que a composição da fase móvel, a velocidade do fluxo e o comprimento de onda selecionados, utilizando uma coluna de fase reversa foram efetivos para obter um método por CLAE simples e otimizado para a análise do NM encapsulado nas

micropartículas poliméricas elaboradas a partir dos polímeros Eudragit L-100 e Gantrez MS-955 pelo método de spray-drying. Dessa forma, os resultados obtidos demonstraram que o método analítico proposto foi preciso, linear, exato e robusto, atendendo a todos os parâmetros da legislação vigente.

A microencapsulação do NM para a utilização em adesivos para prótese foi dirigida a resolver alguns inconvenientes que têm sido relatados na utilização do NM na terapia da EP. Primeiramente, o NM apresenta solubilidade muito baixa, proporcionando reduzida biodisponibilidade na área afetada (Sawyer et al.¹⁹ 1975, Bhalekar et al.⁷¹ 2009). Outro fator é o pouco tempo de permanência no local que as formulações em gel convencionais fornecem (Steinberg e Friedman³¹ 1999). Portanto, este estudo foi constituído primeiramente no desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas que apresentarem uma melhor solubilidade do NM, e uma segunda parte na qual foram pesquisadas a influência nas propriedades antifúngicas, adesivas e tóxicas da incorporação das micropartículas poliméricas de NM em adesivos para prótese.

As micropartículas poliméricas de NM foram preparadas com sucesso pelo método do spray drying utilizando um polímero metacrílico dependente do pH (Eudragit L-100) e/ou um polímero bioadesivo (Gantrez MS-955) muito utilizado em formulações de adesivos para prótese. Todas as formulações apresentaram médias de encapsulação superiores a 89%. Entretanto, micropartículas preparadas com Eudragit L-100 (E10 e E20) mostraram excelente eficiência de encapsulação (100%). Os resultados obtidos apresentam-se melhores que outros dados de quantificação de NM em microcápsulas obtidos por outros autores. Yuen et al. (Yuen et al.⁷² 2012, Yuen et al.⁷³ 2012) desenvolveram microcápsulas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente e utilizando quitosana, resultando em valores de encapsulação de 52,47%. Utilizando o mesmo método de obtenção, Genta et al. (Genta et al.⁷⁴ 2003) obtiveram valores de encapsulação de 49-67% utilizando uma mistura entre oxiquitine e quitosana como materiais de encapsulação. Por outro lado, os resultados de encapsulação obtidos neste estudo foram considerados adequados (89,07% – 106,22%), os quais podem ser atribuídos ao processo de microencapsulação utilizado. Ainda, estes resultados podem ser de interesse para a

indústria farmacêutica, pela transposição a escala e rendimento que o método do spray drying apresenta (Shanmugam⁷⁵ 2015).

Na análise morfológica das formulações obtidas para ambos polímeros ou mistura deles não foi verificada a presença de fármaco livre. As micropartículas obtidas com o polímero Eudragit L-100 apresentaram uma forma esférica similar à do polímero antes do processo de encapsulação, entretanto, as micropartículas obtidas com o polímero Gantrez MS-955 apresentaram uma superfície deprimida e algumas crateras. Estas características morfológicas apresentadas nas micropartículas G10, G20 e EG10 tem sido reportadas por outros autores que utilizaram o mesmo método de obtenção por spray drying, explicado pela evaporação do solvente durante a formação das partículas (Sosnik, A. e Seremeta⁷⁶ 2015).

Os resultados de análise térmica, difração de raios X e espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) sugerem que o processo de microencapsulação promoveu uma amorfização do NM, sem a presença de microdomínios, resultante da interação apenas física entre o fármaco e os polímeros. Esta mudança da cristalinidade do fármaco contido nas micropartículas poliméricas poderia permitir que o NM apresentasse maior solubilidade, devido ao fato de que sólidos em estado amorfo têm moléculas dispostas aleatoriamente, e portanto uma quantidade menor de energia é necessária no processo de dissolução. Além da mudança na cristalinidade, a ausência de afinidade entre os polímeros e o fármaco poderia viabilizar a liberação do NM a partir das matrizes poliméricas.

Em relação ao ensaio de dissolução, os resultados demonstraram que ambos os polímeros e a mistura deles foram efetivos em promover uma taxa de dissolução mais rápida que a do fármaco puro. No entanto, quando comparados o tipo de polímero utilizado e a proporção de polímero e fármaco nas formulações de micropartículas, diferenças dos perfis de liberação foram evidentes. Dentro das formulações avaliadas, micropartículas EG10 e EG20 apresentaram uma taxa de liberação mais rápida que o NM e as outras formulações obtidas. Entretanto, foi verificado também que micropartículas com uma razão polímero:fármaco de 5:1 (20% de fármaco) mostraram uma liberação mais rápida do NM. Provavelmente, a maior quantidade do polímero em especial do Eudragit L-100 proporcionou um controle na taxa de dissolução do fármaco. Este resultado poderia estar relacionado também às características

morfológicas que apresentaram as formulações preparadas com este polímero, muito diferentes das formulações preparadas com o polímero Gantrez MS-955 que apresentaram uma forma achatada e/ou perfurada.

Por outro lado, os resultados do ensaio microbiológico demonstraram que os polímeros empregados na elaboração das micropartículas e o processo de microencapsulação não influenciaram a atividade antifúngica do NM. Com estes resultados pôde-se demonstrar uma atividade antifúngica similar ao encontrado para o fármaco puro quando mensurados os halos de inibição.

Uma vez caracterizadas e comprovado o potencial antifúngico das micropartículas de NM, estas micropartículas foram acrescentadas a uma formulação de adesivo para prótese desenvolvida. Como relatado inicialmente, géis contendo NM para aplicação tópica na cavidade oral apresentam uma concentração do princípio ativo de 2%. Esta concentração de NM foi utilizada pela adição das micropartículas no adesivo para prótese. Dessa forma, foram desenvolvidas formulações de adesivo para prótese que continham esta proporção teórica de princípio ativo e também algumas contendo a concentração de 1% de NM. Assim, foi desenvolvido o Experimento 3 do presente trabalho, avaliando o efeito da incorporação de micropartículas poliméricas nas propriedades antifúngicas, força adesiva e toxicidade quando adicionadas num adesivo para prótese.

Pesquisas demonstrando a eficiência da incorporação de antifúngicos em adesivos para prótese são escassas e os esforços têm se concentrado no desenvolvimento de resinas acrílicas (Salim et al.⁷⁷ 2012, Al-Haddad et al.⁷⁸ 2014, Amin et al.⁷⁹ 2009, Li, Z. et al.⁸⁰ 2014, Nam et al.⁸¹ 2012), reembasadores e condicionadores de tecidos (Akiba et al.⁸² 2005, Alcantara et al.⁸³ 2012, Bertolini et al.⁸⁴ 2014, Bueno et al.⁸⁵ 2015, Chopde et al.⁸⁶ 2012, Chow et al.⁸⁷ 1999, Douglas e Clarke⁸⁸ 1975, Goncalves et al.⁸⁹ 2012, Kanathila et al.⁹⁰ 2011, Mantri et al.⁹¹ 2013, Pachava et al.⁹² 2015, Quinn⁹³ 1985, Radnai et al.⁹⁴ 2010, Skupien et al.⁹⁵ 2013) com características antifúngicas. Por isto, a proposição inovadora deste trabalho foi dirigida a desenvolver uma formulação farmacêutica do NM dirigida especialmente para ser acrescentada em adesivo para prótese. Esta eleição tem fundamento no lugar legítimo que possuem os adesivos para prótese no tratamento protético, na popularidade que apresentam entre pacientes e clínicos e as facilidades de aquisição pelos portadores

de próteses removíveis. Entretanto, uma observação “in vivo” foi encontrada utilizando adesivos para prótese como veículos carreadores de antifúngicos como terapia no tratamento da EP (Scher et al.⁴³ 1978). Os autores do referido trabalho relataram uma redução da presença de *C.albicans* e da EP, tanto no grupo controle (sem fármaco) e no grupo experimental (Anfotericina B). Estes resultados foram explicados pela ação antifúngica do fármaco utilizado e também pelo alívio mecânico que usuários de prótese removíveis experimentam uma vez utilizadas estas formas farmacêuticas. Somado a estes resultados os autores relataram um aumento de benefícios físicos e psicológicos em ambos grupos. Isto demonstra que a utilização de adesivos para prótese realmente poderia ser uma estratégia promissora no tratamento da EP.

Quando acrescentadas as micropartículas poliméricas de NM e o NM puro na formulação de adesivo para prótese proposta nesta tese encontramos uma concentração inibitória mínima (CIM) muito similar entre os grupos. Dessa forma, a incorporação de micropartículas poliméricas de NM na matriz dos adesivos para prótese não influenciou na eficiência microbiológica do agente ativo. Entretanto, alguns grupos apresentaram melhores valores de CIM que outros. Adesivos para prótese nos quais foram acrescentadas as micropartículas EG10, EG20 e G20 mostraram um efeito antifúngico melhor que quando acrescentado no adesivo o NM puro. Estes resultados poderiam ser explicados pela eficiência de encapsulação obtida após o processo de spray-drying e pelo bom comportamento destas micropartículas no ensaio de solubilidade.

Formas farmacêuticas mucoadesivas tem sido estudadas amplamente para entrega de medicamentos em diferentes mucosas do organismo, e de uma forma muito especial para atuar na mucosa oral (Silva et al.⁹⁶ 2015, Paderni et al.⁹⁷ 2012, Netsomboon e Bernkop-Schnurch⁹⁸ 2016, Laffleur e Bernkop-Schnurch⁹⁹ 2013, Laffleur¹⁰⁰ 2014, Kumar et al.¹⁰¹ 2014, Gilhotra et al.¹⁰² 2014, Bagan et al.¹⁰³ 2012). Assim, adesivos para prótese poderiam ser classificados como forma mucoadesiva com a capacidade de fixação nos tecidos sob os quais se encontram as próteses de usuários parcial ou totalmente desdentados. Alguns autores têm relatado uma capacidade de retenção destas formas farmacêuticas ao redor de 8 h e 12 h (Adisman³⁸ 1989, Ozcan et al.⁴² 2005). Porém, uma real capacidade adesiva tem sido relatada pelos pacientes no máximo por 6 h após sua aplicação (Ozcan et al.⁴²

2005). Este tempo de retenção poderia ser utilizado para o carregamento de antifúngicos ou outros fármacos que poderiam ajudar no controle dos biofilmes de *Candida ssp* encontrados em usuários de prótese removível e/ou em fármacos que cooperem na reparação dos tecidos.

O ensaio de força adesiva realizado demonstrou, similarmente a outros estudos, uma redução da força adesiva ao longo do tempo (Han, J. M. et al.⁴¹ 2014, DeVengencie et al.⁶⁰ 1997, Han, J. M. et al.¹⁰⁴ 2014, Kore et al.¹⁰⁵ 2013). Adesivos para próteses encontram-se constituídos por componentes, tais como polímeros naturais ou sintéticos, que proporcionam sua capacidade adesiva. Dentro dos componentes utilizados na formula de adesivos para prótese avaliada, encontra-se carboximetilcelulose (CMC) e Gantrez MS-955. CMC é um polímero hidrossolúvel encarregado da adesão inicial, o qual perde sua capacidade adesiva rapidamente. Gantrez MS-955 atua na adesão tardia da forma farmacêutica. Este comportamento é explicado pela diferente taxa de solubilidade que estes dois polímeros apresentam (Han, J. M. et al.⁴¹ 2014, Han, Jian-min et al.¹⁰⁶ 2014). Dentro dos grupos de adesivos testados no Experimento 3, foi corroborada uma capacidade adesiva similar ao grupo controle quando incorporadas as micropartículas poliméricas que possuíam em sua formulação o polímero Gantrez MS-955. Este resultado encontra-se em concordância com os objetivos da presente tese, em que se pretendia desenvolver uma formulação de adesivo contendo micropartículas carreadoras de NM cuja capacidade adesiva não fosse prejudicada.

Novas formas de terapia, tais como a incorporação de agentes antifúngicos em materiais odontológicos, além de apresentarem atividade farmacológica comprovada, não deveriam produzir efeitos tóxicos. Assim, a toxicidade dos adesivos para prótese com micropartículas poliméricas de NM foram investigadas utilizando o bioensaio de *Artemia salina*. Este bioensaio é considerado uma ferramenta preliminar de avaliação de toxicidade e que provê resultados confiáveis e correlacionáveis com dados de toxicidade oral aguda em animais e humanos (Meyer et al.⁶¹ 1982, Rajabi et al.¹⁰⁷ 2015). *Artemia salina* pode ser usada para a determinação da toxicidade pela estimativa da concentração letal média (LC₅₀) de compostos ativos e extratos em meio salino. Entretanto poucos estudos têm utilizado esta metodologia para avaliar a toxicidade inicial de materiais odontológicos, mesmo estando relatada na literatura sua

indicação (Milhem et al.¹⁰⁸ 2008, Pelka et al.¹⁰⁹ 2000). Todas as formulações de adesivos para prótese testadas nesta tese no Experimento 3 apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade após 24 h e 48 h. Este resultado encontra-se em concordância com alguns estudos em cultura de células que encontraram pouca ou moderada citotoxicidade de adesivos para prótese disponíveis comercialmente similares em sua formulação com o adesivo utilizado (Zhao et al.⁵⁹ 2004, de Gomes et al.¹¹⁰ 2011, Al et al.¹¹¹ 2005). Entretanto, foi confirmado que a toxicidade de todas as formulações de adesivos utilizados neste estudo (controle, NM, micropartículas poliméricas contendo NM) é dependente da concentração do extrato utilizado e do tempo de avaliação. Além disso, os resultados demonstraram leve aumento da toxicidade das formulações de adesivos utilizadas, quando incorporado o fármaco puro (NM) ou as micropartículas.

As avaliações *in vitro* como o perfil de liberação das micropartículas poliméricas, efeito antifúngico, força adesiva e toxicidade dos adesivos para próteses não apresentam suficiente informação para a utilização imediata em pacientes. Porém, o desenvolvimento de formulações de micropartículas poliméricas utilizando os polímeros propostos nesta tese, em especial as formulações do polímero Gantrez MS-955 (G10, G20, EG10, EG20) poderiam constituir uma alternativa interessante para ser acrescentada nas formulações de adesivos para prótese para proporcionar uma terapia antifúngica efetiva na terapia da EP, evitando assim os inconvenientes conhecidos das formas convencionais em gel no NM. Entretanto, outros estudos *in vitro* poderiam ser requeridos para se obter maior informação sobre o comportamento deste novo material, tais como avaliações frente a biofilmes simples e compostos de espécies do gênero *Candida* e testes de cultura celular em fibroblastos ou células epiteliais. Por outro lado, baseados nos resultados preliminares desta proposta e à aceitação de adesivos para prótese e o NM, a utilização desta forma farmacêutica carregada com micropartículas poliméricas de NM poderia ser de interesse para indústria, pacientes e clínicos. Mesmo assim, após obter estes outros testes laboratoriais, pesquisas clínicas controladas para comprovar sua efetividade em pacientes que apresentem EP devem ser efetuadas criteriosamente.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Micropartículas contendo 10 e 20% de nitrato de miconazol (NM) formuladas a partir de diferentes concentrações dos polímeros Eudragit L-100 e/ou Gantrez MS-955 foram obtidas com sucesso pelo método de spray-drying;
2. Um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de NM nas micropartículas de NM foi desenvolvido em concordância com os parâmetros estabelecidos pelas normativas internacionais e nacionais;
3. Teores elevados de NM foram obtidos por CLAE para os sistemas poliméricos, demonstrando alta eficiência de encapsulação do fármaco;
4. Diferenças morfológicas e de tamanho de partículas foram evidenciadas entre as formulações obtidas;
5. Nenhuma interação química foi evidente após o processo de spray-drying entre o NM e os polímeros utilizados;
6. Os ensaios efetuados por difração de raio-X e de calorimetria exploratória diferencial demonstraram que o processo de microencapsulação conduziu a uma amorfização do fármaco;
7. As micropartículas poliméricas de NM provocaram liberação rápida inicial e controlada final do fármaco, melhorando as propriedades de solubilidade do NM, especialmente as partículas elaboradas a partir do polímero Gantrez MS-955;
8. As micropartículas poliméricas de NM exerceram atividade antifúngica similar a do fármaco puro;
9. Foi elaborada uma formulação experimental de adesivo para próteses, a qual se apresentou atóxica em ensaio de *Artemia salina* e com adequada capacidade adesiva em ensaio de tração;
10. A incorporação de micropartículas poliméricas de NM à formulação experimental de adesivo para próteses apresentou efetividade antifúngica similar a da formulação comercialmente disponível do fármaco em gel, tendo

os adesivos que continham as partículas EG10, EG20 e G20 apresentando os melhores resultados;

11. A capacidade adesiva da formulação experimental do adesivo para próteses não foi afetada quando acrescentadas as micropartículas poliméricas de NM revestidas com o polímero Gantrez MS-955 (G10, G20, EG10, EG20);
12. Nenhum dos grupos de adesivo para prótese experimental incorporando as micropartículas poliméricas apresentou comportamento tóxico no ensaio de *A. salina*.

Dessa forma, é possível sugerir que, após avaliações microbiológicas, mecânicas e de toxicidade, a formulação de adesivo para prótese removível proposta foi compatível com a incorporação de micropartículas poliméricas a base de Eudragit L-100 e/ou Gantrez MS-955 desenvolvidas para aumento da solubilidade do nitrato de miconazol, visando sua maior biodisponibilidade na área afetada pela estomatite protética.

7. REFERENCIAS

1. Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2012 Mar-Apr;25(2):113-9.
2. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
3. Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. *Br Dent J*. 1962 May;112):357-60.
4. Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Int J Prosthodont*. 2012 May-Jun;25(3):232-44.
5. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*. 1992 Jan;123(1):46-51.
6. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.
7. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):99-116.
8. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*. 1998 Feb;43(1):45-50.
9. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol*. 1999 Jun;16(2):72-6.
10. Rodrigues JA, Hofling JF, Tavares FC, Duarte KM, Goncalves RB, Azevedo RA. Evaluation of biochemical and serological methods to identify and clustering yeast cells of oral *Candida* species by CHROMagar test, SDS-PAGE and ELISA. *Braz J Biol*. 2004 May;64(2):317-26.
11. Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, Gallagher PJ, Henman MC, Shanley DB, et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol*. 1993;19(2):61-82.

12. Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA, Jr., Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb;37(2):321-6.
13. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA, Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002;42(3):207-27.
14. Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):341-50.
15. Crist AE, Jr., Johnson LM, Burke PJ. Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2408-10.
16. Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrell TC, Meyer W. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3171-80.
17. Heelan JS, Sotomayor E, Coon K, D'Arezzo JB. Comparison of the rapid yeast plus panel with the API20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1998 May;36(5):1443-5.
18. Badoc C, De Meeus T, Bertout S, Odds FC, Mallie M, Bastide JM. Clonality structure in *Candida dubliniensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Apr 9;209(2):249-54.
19. Sawyer PR, Brogden RN, Pinder RM, Speight TM, Avery GS. Miconazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1975;9(6):406-23.
20. Bouckaert S, Schautteet H, Lefebvre RA, Remon JP, van Clooster R. Comparison of salivary miconazole concentrations after administration of a bioadhesive slow-release buccal tablet and an oral gel. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;43(2):137-40.
21. Mandal TK. Swelling-controlled release system for the vaginal delivery of miconazole. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000 Nov;50(3):337-43.
22. Yoshida Y. Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. *Curr Top Med Mycol.* 1988;2:388-418.
23. Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, Conti S, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, et al. In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Jun;21(3):177-82.

24. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of Candida-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 2008 Nov;35(11):836-46.
25. Akhter S, Paul S, Hasan I, Ayon NJ, Haider SS, Reza S. Preparation, characterization and compatibility studies of naproxen loaded microspheres of cellulosic and polymethacrylic polymeric blend. *Dhaka Univ J Pharm Sci*. 2013 Jun;12(1):11-21.
26. Davis SS, Illum L. Polymeric microspheres as drug carriers. *Biomaterials*. 1988 Jan;9(1):111-5.
27. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015 9//;223:40-54.
28. Vehring R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*. 2008 May;25(5):999-1022.
29. Quan JS, Jiang HL, Kim EM, Jeong HJ, Choi YJ, Guo DD, et al. pH-sensitive and mucoadhesive thiolated Eudragit-coated chitosan microspheres. *Int J Pharm*. 2008 Jul 9;359(1-2):205-10.
30. Rizi K, Green RJ, Khutoryanskaya O, Donaldson M, Williams AC. Mechanisms of burst release from pH-responsive polymeric microparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(9):1141-55.
31. Steinberg D, Friedman M. Dental drug-delivery devices: local and sustained-release applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1999;16(5):425-59.
32. Nafee NA, Ismail FA, Boraie NA, Mortada LM. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *Int J Pharm*. 2003 Oct 2;264(1-2):1-14.
33. Cardot JM, Chaumont C, Dubray C, Costantini D, Aiache JM. Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Oct;58(4):345-51.
34. Madgulkar A, Kadam S, Pokharkar V. Development of Buccal Adhesive Tablet with Prolonged Antifungal activity: Optimization and ex vivo Deposition Studies. *Indian J Pharm Sci*. 2009 May;71(3):290-4.

35. Chinna Reddy P, Chaitanya KS, Madhusudan Rao Y. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. *Daru*. 2011;19(6):385-403.
36. Gupta A, Garg S, Khar RK. Measurement of bioadhesive strength of mucoadhesive buccal tablets: Design of an in vitro assembly. *Indian Drugs*. 1993;30:152-5.
37. Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2015 May;113(5):391-97 e2.
38. Adisman IK. The use of denture adhesives as an aid to denture treatment. *J Prosthet Dent*. 1989 Dec;62(6):711-5.
39. Coates AJ. Denture adhesives: a review. *Aust Prosthodont J*. 1995;9:27-31.
40. Grasso JE. Denture adhesives: changing attitudes. *J Am Dent Assoc*. 1996 Jan;127(1):90-6.
41. Han JM, Hong G, Dilinuer M, Lin H, Zheng G, Wang XZ, et al. The adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov;72(8):839-45.
42. Ozcan M, Kulak Y, de Baat C, Arikan A, Ucankale M. The effect of a new denture adhesive on bite force until denture dislodgement. *J Prosthodont*. 2005 Jun;14(2):122-6.
43. Scher EA, Ritchie GM, Flowers DJ. Antimycotic denture adhesive in treatment of denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1978 Dec;40(6):622-7.
44. Bartels HA. Bacteriological Appraisal of Adhesive Denture Powders. *Journal of Dental Research*. 1945;24(1):15-16.
45. Stafford GD, Russell C. Efficiency of denture adhesives and their possible influence on oral microorganisms. *J Dent Res*. 1971 Jul-Aug;50(4):832-6.
46. Makihiro S, Nikawa H, Satonobu SV, Jin C, Hamada T. Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. *Int J Prosthodont*. 2001 Jan-Feb;14(1):48-52.
47. Pradies G, Sanz I, Evans O, Martinez F, Sanz M. Clinical study comparing the efficacy of two denture adhesives in complete denture patients. *Int J Prosthodont*. 2009 Jul-Aug;22(4):361-7.

48. Milton Rocha Gusmao J, Pereira RP. Treatment protocol for denture stomatitis, prior to anatomical molding. *Gerodontology*. 2013 Sep;30(3):232-5.
49. Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods. Resolution RE no 899, May 29, 2003., (2003).
50. ICH. Q2B: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. London: ICH; 1996
51. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 2008 Nov 3;363(1-2):26-39.
52. Reinke SMG, Rastelli MCS, Garcia R, Esmerino LA, de Paula JP, dos Santos FA, et al. Chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles: high encapsulation efficiency and prolonged release. *Lat Am J Pharm*. 2014;33(1):47-55.
53. Lee SC, Fung CP, Lee N, See LC, Huang JS, Tsai CJ, et al. Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucose-enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1615-7.
54. Lee SC, Lo HJ, Fung CP, Lee N, See LC. Disk diffusion test and E-test with enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species to voriconazole and fluconazole. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009 Apr;42(2):148-53.
55. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ. Stability of Mueller-Hinton agar supplemented with glucose and methylene blue for disk diffusion testing of fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1288-9.
56. Rimek D, Fehse B, Gopel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 2008 May;51(3):205-8.
57. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997
58. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992
59. Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA, Han GL. Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater*. 2004 Jun;20(5):419-24.

60. DeVengencie J, Ng MC, Ford P, Iacopino AM. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates. *Int J Prosthodont*. 1997 Jan-Feb;10(1):61-72.
61. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982 May;45(5):31-4.
62. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*. 2002 Sep 23;2:17.
63. Ramos SCS, Oliveira JCSd, Câmara CAGd, Castelar I, Carvalho AFFU, Lima-Filho JV. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;19:376-81.
64. Martori E, Ayuso-Montero R, Martinez-Gomis J, Vinas M, Peraire M. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *J Prosthet Dent*. 2014 Apr;111(4):273-9.
65. Di Pietra AM, Cavrini V, Andrisano V, Gatti R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 1992 Oct-Dec;10(10-12):873-9.
66. Kobylinska M, Kobylinska K, Sobik B. High-performance liquid chromatographic analysis for the determination of miconazole in human plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996 Oct 11;685(1):191-5.
67. Cavrini V, Di Pietra AM, Gatti R. Analysis of miconazole and econazole in pharmaceutical formulations by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *J Pharm Biomed Anal*. 1989;7(12):1535-43.
68. Neill GP, Davies NW, McLean S. Automated screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry for identification of drugs after their extraction from biological samples. *J Chromatogr*. 1991 Apr 19;565(1-2):207-24.
69. Wrobel K, Wrobel K, de la Garza Rodriguez IM, Lopez-de-Alba PL, Lopez-Martinez L. Determination of miconazole in pharmaceutical creams using internal standard and second derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal*. 1999 Jun;20(1-2):99-105.
70. Khashaba PY, El-Shabouri SR, Emara KM, Mohamed AM. Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal*. 2000 Mar;22(2):363-76.

71. Bhalekar MR, Pokharkar V, Madgulkar A, Patil N, Patil N. Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(1):289-96.
72. Yuen CW, Yip J, Liu L, Cheuk K, Kan CW, Cheung HC, et al. Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique. *Carbohydr Polym*. 2012 Jul 1;89(3):795-801.
73. Yuen CW, Kan CW, Cheuk KL, Cheung HC, Cheng SY, Yip J, et al. Development of miconazole nitrate containing chitosan microcapsules and their anti-*Aspergillus niger* activity. *J Microencapsul*. 2012;29(5):505-10.
74. Genta I, Perugini P, Modena T, Pavanetto F, Castelli F, Muzzarelli RAA, et al. Miconazole-loaded 6-oxychitin–chitosan microcapsules. *Carbohydrate Polymers*. 2003 4/1;52(1):11-18.
75. Shanmugam S. Granulation techniques and technologies: recent progresses. *Bioimpacts*. 2015;5(1):55-63.
76. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015 Sep;223:40-54.
77. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. *J Dent*. 2012 Jun;40(6):506-12.
78. Al-Haddad A, Vahid Roudsari R, Satterthwaite JD. Fracture toughness of heat cured denture base acrylic resin modified with Chlorhexidine and Fluconazole as bioactive compounds. *J Dent*. 2014 Feb;42(2):180-4.
79. Amin WM, Al-Ali MH, Salim NA, Al-Tarawneh SK. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. *Eur J Dent*. 2009 Oct;3(4):257-66.
80. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*. 2014 Jul 28
81. Nam KY, Lee CH, Lee CJ. Antifungal and physical characteristics of modified denture base acrylic incorporated with silver nanoparticles. *Gerodontology*. 2012 Jun;29(2):e413-9.

82. Akiba N, Hayakawa I, Keh ES, Watanabe A. Antifungal effects of a tissue conditioner coating agent with TiO₂ photocatalyst. *J Med Dent Sci.* 2005 Dec;52(4):223-7.
83. Alcantara CS, Macedo AF, Gurgel BC, Jorge JH, Neppelenbroek KH, Urban VM. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci.* 2012 Nov-Dec;20(6):607-12.
84. Bertolini MM, Portela MB, Curvelo JA, Soares RM, Lourenco EJ, Telles DM. Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater.* 2014 Aug;30(8):793-8.
85. Bueno MG, Urban VM, Barberio GS, da Silva WJ, Porto VC, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis.* 2015 Jan;21(1):57-65.
86. Chopde N, Pharande A, Khade MN, Khadtare YR, Shah SS, Apratim A. In vitro antifungal activity of two tissue conditioners combined with nystatin, miconazole and fluconazole against *Candida albicans*. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Sep-Oct;13(5):695-8.
87. Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology.* 1999 Dec;16(2):110-8.
88. Douglas WH, Clarke DA. Physical and mechanical properties of nystatin-containing denture liners. *J Prosthet Dent.* 1975 Oct;34(4):428-34.
89. Goncalves LM, Del Bel Cury AA, Sartoratto A, Garcia Rehder VL, Silva WJ. Effects of undecylenic acid released from denture liner on *Candida* biofilms. *J Dent Res.* 2012 Oct;91(10):985-9.
90. Kanathila H, Bhat AM, Krishna PD. The effectiveness of magnesium oxide combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2011 Jul-Aug;22(4):613.
91. Mantri SS, Parkhedkar RD, Mantri SP. *Candida* colonisation and the efficacy of chlorhexidine gluconate on soft silicone-lined dentures of diabetic and non-diabetic patients. *Gerodontology.* 2013 Dec;30(4):288-95.
92. Pachava KR, Nadendla LK, Alluri LS, Tahseen H, Sajja NP. Invitro Antifungal Evaluation of Denture Soft Liner Incorporated with Tea Tree Oil: A New Therapeutic Approach Towards Denture Stomatitis. *J Clin Diagn Res.* 2015 Jun;9(6):ZC62-4.

93. Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 1985 Mar;12(2):177-82.
94. Radnai M, Whiley R, Friel T, Wright PS. Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. *Gerodontology*. 2010 Dec;27(4):292-6.
95. Skupien JA, Valentini F, Boscatto N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2013 Nov;110(5):356-62.
96. Silva BM, Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simoes S. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *Int J Pharm*. 2015 Oct 15;494(1):537-51.
97. Paderni C, Compilato D, Giannola LI, Campisi G. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Sep;114(3):e25-34.
98. Netsomboon K, Bernkop-Schnurch A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016 Jan;98:76-89.
99. Laffleur F, Bernkop-Schnurch A. Strategies for improving mucosal drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*. 2013 Dec;8(12):2061-75.
100. Laffleur F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014 May;40(5):591-8.
101. Kumar K, Dhawan N, Sharma H, Vaidya S, Vaidya B. Bioadhesive polymers: novel tool for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2014 Aug;42(4):274-83.
102. Gilhotra RM, Ikram M, Srivastava S, Gilhotra N. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *J Biomed Res*. 2014 Mar;28(2):81-97.
103. Bagan J, Paderni C, Termine N, Campisi G, Lo Russo L, Compilato D, et al. Mucoadhesive polymers for oral transmucosal drug delivery: a review. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5497-514.
104. Han JM, Hong G, Hayashida K, Maeda T, Murata H, Sasaki K. Influence of composition on the adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Dent Mater J*. 2014;33(1):98-103.

105. Kore DR, Kattadiyil MT, Hall DB, Bahjri K. In vitro comparison of the tensile bond strength of denture adhesives on denture bases. *J Prosthet Dent*. 2013 Dec;110(6):488-93.
106. Han J-m, Hong G, Hayashida K, Maeda T, Murata H, Sasaki K. Influence of composition on the adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Dental Materials Journal*. 2014;33(1):98-103.
107. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru*. 2015;23:20.
108. Milhem MM, Al-Hiyasat AS, Darmani H. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *J Appl Oral Sci*. 2008 Jul-Aug;16(4):297-301.
109. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent*. 2000 Jul;28(5):341-5.
110. de Gomes PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C. Cytotoxicity of denture adhesives. *Clin Oral Investig*. 2011 Dec;15(6):885-93.
111. Al RH, Dahl JE, Morisbak E, Polyzois GL. Irritation and cytotoxic potential of denture adhesives. *Gerodontology*. 2005 Sep;22(3):177-83.