



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GEOVANI PEREIRA GUIMARÃES**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO**  
**ANTIFÚNGICA CONTENDO DERIVADO DO TIOFENO**

CAMPINA GRANDE – PB

2013

GEOVANI PEREIRA GUIMARÃES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO  
ANTIFÚNGICA CONTENDO DERIVADO DO TIOFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE – PB

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

G963d      Guimarães, Geovani Pereira.  
Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno. [manuscrito] / Geovani Pereira Guimarães. – 2013.  
120 f. : il.

Digitado  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, Departamento de Farmácia”.  
“Co-orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia”.

1. Microemulsões. 2. Derivado de tiofeno. 3. 5CN05.  
4. Cryptococcus. I. Título.

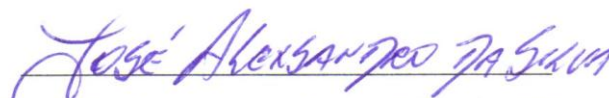
21. ed. CDD 615.1

GEOVANI PEREIRA GUIMARÃES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO  
ANTIFÚNGICA CONTENDO DERIVADO DO TIOFENO**

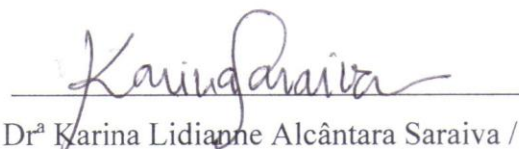
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03/05/2013.



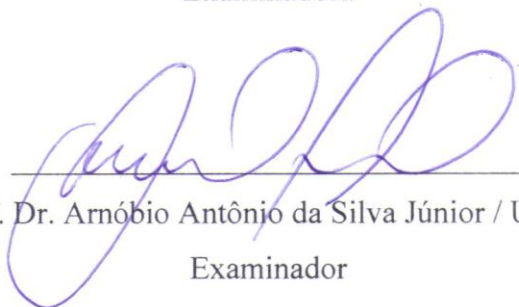
Prof. Dr. José Aleksandro da Silva / UEPB

Orientador



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Karina Lidianne Alcântara Saraiva / UEPB

Examinadora



Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior / UFRN

Examinador

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e avós maternos, a essência do meu existir, a força que me guia ao saber.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inspiradora de meus dias, força essencial em minha caminhada.

À CAPES-CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. José Alexsandro da Silva, pelo conhecimento passado ao longo desta orientação e pela dedicação e empenho.

Ao professor Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, por todas as suas grandes contribuições ao longo desta pesquisa, por meio de debates, conselhos, observações e incentivo, fatores imprescindíveis para o desenvolvimento de minha formação técnico-científica e evolução no universo da pesquisa acadêmica.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB e em especial aos professores Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Dr. Élquio Eleamen Oliveira, Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Jr dentre outros que contribuíram por meio de disciplinas e debates à minha formação.

À professora Dr<sup>a</sup>. Karina Lidianne Alcântara Saraiva pelas horas de dedicação e empenho durante as análises de microscopia eletrônica de transmissão, bem como ao Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela disponibilização da infraestrutura para realização das mesmas, além dos testes de reologia.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, em especial a Jamilly, Yargo, Airlla, Dayanne, Gabriela Baptista, Yuri & Natan, pelos momentos de amizade e apoio sem o qual o andamento da presente pesquisa não poderia ter sido melhor.

A todos os amigos que fiz antes e durante esta pós-graduação, em especial Angelino, Diego, Sidney, Leandro Bráulio, Gustavo, Sallett, Ravelly, Matheus, Luis Gustavo pelas palavras de incentivo e força, pelas esperanças, expectativas e momentos compartilhados.

Aos meus avós maternos Maria Cecília Pereira e José Pereira Filho, as minhas tias e tios, aos meus irmãos Jean Pereira Guimarães e Luanny Kelly Pereira Guimarães pelo incentivo nas horas mais necessárias.

Aos meus primos Davyd, Gabriel, Lukas, Anthony, Allain, Guilherme, Warryson, Vitória e Vítor Miguel, por terem sido ponto de refúgio, apoio e reflexão em momentos importantes ao longo desta jornada.

Pela luz que me passastes, pela força que me destes, pelo amor e dedicação por todo esse tempo e nos tempos mais nebulosos, eu te agradeço, Luciana...

## RESUMO

As infecções fúngicas têm se tornado um problema de grande incidência em todo o mundo, sendo as leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* responsáveis por diversas manifestações clínicas principalmente em pacientes imunodeprimidos. A terapêutica antifúngica baseia-se atualmente em poucos agentes quimioterápicos que apresentam problemas de eficácia e resistência. Os compostos derivados do tiofeno estão relacionados a várias propriedades biológicas, incluindo atividade antifúngica. A 5CN05 é uma molécula derivada do tiofeno que apresenta atividade antifúngica *in vitro* e baixa solubilidade. Atualmente, tem-se dado ênfase a incorporação deste tipo de moléculas em sistemas coloidais como as microemulsões (ME). O presente trabalho teve por objetivo incorporar o 5CN05 em ME, bem como realizar caracterização físico-química e reológica das formulações e avaliar a atividade antifúngica contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. Foram avaliadas duas metodologias de incorporação do 5CN05. Para caracterização da estrutura foram utilizados os métodos de microscopia de luz polarizada (MLP), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os estudos reológicos avaliaram o comportamento de escoamento (testes de escoamento), e o comportamento viscoelástico (testes oscilatórios) dos sistemas ME. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada segundo o método da microdiluição indicado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, usando a anfotericina B como controle. A formulação desenvolvida foi constituída por LAS<sup>®</sup> (35,3%), Plurol Oleique<sup>®</sup> (17,5%), miristato de isopropila (5,9%) e água (41,2%). Através das análises de MLP, DSC e MET foi possível confirmar a estruturação do sistema como ME do tipo óleo em água (O/A). O método de incorporação do 5CN05 por homogeneização em ultrassom mostrou-se eficiente. Reologicamente, a ME-5CN05 foi caracterizada como um fluido não-newtoniano pseudoplástico, apresentando viscoelasticidade e comportamento de sólido elástico. As formulações avaliadas apresentaram características físico-químicas que possibilitam o seu uso pela via tópica. O 5CN05 mostrou moderada ou fraca atividade antifúngica contra espécies de *Candida* (270-540  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e boa atividade contra *C. neoformans* (17  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As leveduras de *Candida* apresentaram sensibilidade ao produto ME-5CN05 (70 – 140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *C. neoformans* apresentou CIM de 2.2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados do presente trabalho mostram-se promissores uma vez que o mesmo possa vir a representar uma alternativa terapêutica contra *C. neoformans*.

**PALAVRAS-CHAVE:** ME, encapsulação, derivado do tiofeno, 5CN05, *Cryptococcus*.

## ABSTRACT

Fungal infections have become an issue of great impact around the world, and the *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* are responsible for various clinical manifestations mainly in immunocompromised patients. The antifungal therapy is actually based in a few chemotherapeutic agents that present problems of efficacy and resistance. The thiophene derivatives molecules are related to various biological properties including antifungal activity. The 5CN05 molecule is a thiophene derivative which has *in vitro* antifungal activity and poor water solubility. Currently, great emphasis has been given to the incorporation of this kind of molecules in colloidal systems such as microemulsions (ME). The present study aimed to incorporate the 5CN05 molecule in a ME as well as perform the physicochemical and rheological characterization of the formulations and evaluate the antifungal activity against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Were evaluated two methods to incorporate the 5CN05. For morphology characterization of the MEs were used the methods of polarized light microscopy (MLP), differential scanning calorimetry (DSC) and transmission electron microscopy (TEM). The rheological studies evaluated the flow behavior (flow tests) and the viscoelastic behavior (oscillatory tests) of the MEs. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution method indicated by the Clinical and Laboratory Standards Institute, using amphotericin B as a control. The developed formulation consists of LAS<sup>®</sup> (35.3%), Plurol Oleique<sup>®</sup> (17.5%), isopropyl myristate (5.9%) and water (41.2%). Using the techniques of MLP, DSC and TEM was possible to confirm the structure of the ME system as oil in water (O/W) droplets. The incorporation method by ultrasonic homogenization was effective. Rheologically, the ME-5CN05 was characterized as a pseudoplastic non-newtonian fluid, showing viscoelasticity and elastic solid behavior. The evaluated formulations exhibited physicochemical properties that allow its use by the topical route. The 5CN05 showed moderate or weak antifungal activity against *Candida* species (270-540  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and good activity against *C. neoformans* (17  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The *Candida* yeasts showed sensitivity to the ME-5CN05 (70-140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and *C. neoformans* showed MIC of 2.2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The results of this work show to be promising since it may represent a therapeutic alternative against *C. neoformans*.

**KEYWORDS:** ME, encapsulation, thiophene derivatives, 5CN05, *Cryptococcus*.



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	– Composição centesimal da formulação selecionada .....	42
<b>TABELA 2</b>	– Determinação da eficiência de encapsulação do 5CN05 na formulação ME.....	50
<b>TABELA 3</b>	– Caracterização das formulações ME.....	51
<b>TABELA 4</b>	– Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> –	Estrutura do anel tiofeno.....	19
<b>FIGURA 2</b> –	Representação da estrutura do 5CN05.....	21
<b>FIGURA 3</b> –	Representação de um diagrama de fase pseudoternário.....	27
<b>FIGURA 4</b> –	Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema LAS <sup>®</sup> /Plurol Oleique <sup>®</sup> (2:1), miristato de isopropila e água.....	42
<b>FIGURA 5</b> –	Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação ME-branca..	43
<b>FIGURA 6</b> –	Termogramas de calorimetria exploratória diferencial da água (A), ME-branca (B) e do miristato de isopropila (C).....	45
<b>FIGURA 7</b> –	Fotomicrografia da formulação selecionada, obtida por MET.....	46
<b>FIGURA 8</b> –	Fotomicrografias em diferentes aumentos da formulação contendo o 5CN05 incorporado através de agitação magnética.	48
<b>FIGURA 9</b> –	Fotomicrografias em diferentes aumentos da formulação ME-5CN05 obtida com homogeneização por ultrassom.....	49
<b>FIGURA 10</b> –	Termogramas de calorimetria exploratória diferencial das formulações ME-branca (A) e ME-5CN05 (B).....	52
<b>FIGURA 11</b> –	Curvas de escoamento tensão vs. taxa de cisalhamento.....	56
<b>FIGURA 12</b> –	Viscosidade vs. taxa de cisalhamento das formulações ME.....	57
<b>FIGURA 13</b> –	Evolução dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') da formulação ME-branca.....	58
<b>FIGURA 14</b> –	Evolução dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') da formulação ME-5CN05.....	59
<b>FIGURA 15</b> –	Varição do ângulo de defasagem ( $\tan \delta$ ) em função da frequência para as formulações ME-branca e ME-5CN05.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5CN05	2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana
AmB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CLAE/HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração micelar crítica
DFPT	Diagrama de fase pseudoternário
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
IPD	Índice de polidispersão
IR	Índice de refração
ME	Microemulsão
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MLP	Microscopia de luz polarizada
NE	Nanoemulsão
UV-Vis	Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 INFECCÕES FÚNGICAS: GÊNEROS <i>Candida</i> E <i>Cryptococcus</i> .....	17
2.2 NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS: DERIVADOS TIOFÊNICOS.....	19
2.3 NANOTECNOLOGIA E NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	22
2.4 MICROEMULSÕES.....	23
<b>2.4.1 Conceito</b> .....	23
<b>2.4.2 Teorias de formação das MEs</b> .....	24
<b>2.4.3 Diagramas de fase</b> .....	26
<b>2.4.4 Aplicações das MEs</b> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 MATERIAL.....	34
4.2 MÉTODOS.....	34
<b>4.2.1 Determinação do EHL</b> .....	34
<b>4.2.2 Diagrama de Fase Pseudoternário (DFPT)</b> .....	34
<b>4.2.3 Seleção da formulação e incorporação do 5CN05</b> .....	35
<b>4.2.4 Caracterização físico-química das formulações obtidas</b> .....	35
4.2.4.1 Aspecto macroscópico.....	35
4.2.4.2 Isotropia.....	36
4.2.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	36
4.2.4.4 Caracterização morfológica - MET.....	36
4.2.4.5 Determinação do pH.....	36
4.2.4.6 Condutividade elétrica.....	37
4.2.4.7 Índice de Refração (IR).....	37
4.2.4.8 Doseamento.....	37
4.2.4.9 Eficiência de encapsulação.....	37
4.2.4.10 Tamanho de Gotícula e Potencial Zeta.....	38
<b>4.2.5 Reologia dos sistemas ME</b> .....	38
<b>4.2.6 Atividade antifúngica</b> .....	38
4.2.6.1 Microorganismos avaliados.....	38
4.2.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
5.1 DIAGRAMA DE FASES.....	41
5.2 SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO ME-BRANCA.....	42
5.3 INCORPORAÇÃO DO 5CN05.....	47
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES.....	50
5.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DOS SISTEMAS ME.....	54
5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	61
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICES.....	77
ANEXOS.....	97

*Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm se tornado um problema de grande incidência em todo o mundo; estimativas apontam que mais de 40 milhões de pessoas apresentam quadros de infecções por fungos tanto em países desenvolvidos quanto em nações em desenvolvimento (GÜNGÖR, ERDAL & AKSU, 2013).

Leveduras do gênero *Candida* são microorganismos pertencentes a microbiota normal de indivíduos saudáveis, principalmente na mucosa oral, no trato gastrointestinal e no trato geniturinário feminino (SHAO *et al.*, 2007). Entretanto, estes fungos são responsáveis por diversas manifestações clínicas, principalmente em pacientes imunodeprimidos, que vão desde infecções na pele e mucosas até quadros de infecção sistêmica (SARDI *et al.*, 2013). São de grande importância devido a alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (DE BERNARDIS *et al.*, 2004). É o quarto patógeno mais comumente associado a casos de infecção hospitalar (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004).

*Cryptococcus neoformans* é um fungo encapsulado capaz de ocasionar infecções em pacientes imunocomprometidos e, mais raramente, em imunocompetentes (CARROLL *et al.*, 2012; GUERRA *et al.*, 2012). A inalação de basidiosporos ou leveduras presentes no ambiente pode resultar em infecção pulmonar e posterior difusão do patógeno para o sistema nervoso central, ocasionando meningoencefalite, reconhecida como uma das mais importantes infecções oportunistas em pacientes portadores de síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), com uma incidência mundial de aproximadamente 957 mil casos por ano (LEONGSON *et al.*, 2013).

O tratamento convencional das enfermidades ocasionadas por fungos baseia-se atualmente em poucos agentes quimioterápicos, tais como os azóis e os poliênicos, que apresentam problemas sérios relacionados a efetividade, espectro de ação, toxicidade, baixa potência (sendo a maioria considerada fungistática ao invés de fungicida) e farmacocinética inadequada (SCOTTI *et al.*, 2012). O surgimento de perfis de resistência dos microorganismos aos antimicrobianos mostra-se um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de fármacos disponíveis (OLIVEIRA & SILVA, 2008; BENGHEZAL *et al.*, 2007). Este cenário demonstra claramente a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos como alternativas terapêuticas no controle das infecções fúngicas.

Compostos orgânicos contendo anéis heterocíclicos aromáticos, tais como o anel tiofeno, encontram-se largamente distribuídos na natureza e geralmente são de grande

importância em vários processos bioquímicos, apresentando largo espectro de propriedades farmacológicas (MOHAMMAD *et al.*, 2012). A versátil aplicabilidade sintética e a atividade biológica destes heterociclos os torna importantes fragmentos estruturais na química medicinal sintética, servindo como base para o planejamento e implementação de novos agentes terapêuticos (MEOTTI *et al.*, 2003). Para o presente trabalho, foi utilizado um derivado 2-amino tiofeno, o 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, referido como 5CN05. Esta molécula pertence a uma série de derivados tiofênicos sintéticos com comprovada atividade antifúngica *in vitro* (MENDONÇA JUNIOR *et al.*, 2011). Suas características biofarmacêuticas ainda não estão bem esclarecidas, principalmente com relação a permeabilidade. Porém, o seu valor de coeficiente de partição ( $\log P = 5,98$ ) serve como um indicativo de que a molécula apresenta baixa solubilidade e permeabilidade.

A tecnologia farmacêutica vem apresentando avanços significativos nos últimos anos, tendo especial destaque no âmbito da nanotecnologia. A busca por novos sistemas de liberação de fármacos têm se mostrado muito relevante no sentido de proporcionar alternativas terapêuticas de elevada eficácia, possibilitando a administração e absorção de fármacos com maior segurança e menor incidência de efeitos adversos (DAMASCENO *et al.*, 2011; FORMARIZ, 2005). Esses novos sistemas transportadores de fármacos mostram-se capazes de proporcionar melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução, principalmente, para aqueles fármacos que pertencem as classes biofarmacêuticas de baixa solubilidade (ASTIER *et al.*, 2006). É importante ressaltar que diversas substâncias farmacologicamente ativas quando incorporadas em formas farmacêuticas convencionais não conseguem transpor adequadamente as barreiras biológicas do organismo por diversos motivos inerentes as características próprias da molécula. Assim, o fármaco quando veiculado na formulação pode não ser liberado e, conseqüentemente, não chegar ao seu sítio de ação em concentrações terapêuticas adequadas ao uso pretendido (DALMORA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

Atualmente, tem-se dado ênfase a incorporação deste tipo de moléculas em formulações microemulsionadas; o crescente usos destas formulações pode ser atribuído às suas propriedades particulares como aumento na solubilidade aparente dos fármacos e controle de sua liberação por meio de uma cinética específica (TENJARLA, 1999; SILVA *et al.*, 2009a). Desse modo, podemos definir microemulsões (ME) como sistemas termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes formados a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizada por meio de um filme interfacial de tensoativos

(DAMASCENO *et al.*, 2012; FANUN, 2012; SILVA *et al.*, 2009b). São geralmente formados pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, co-tensoativo e eletrólito (DAMASCENO *et al.*, 2011).

As propriedades específicas dos sistemas microemulsionados relacionam-se principalmente à sua baixa tensão interfacial, grande área de interface, tamanho reduzido das gotículas, baixa viscosidade e alta capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos, hidrossolúveis e anfifílicos (FANUN, 2012). Deste modo, a utilização destes sistemas pode ser destinada ao desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados em fármacos dificilmente incorporados em formulações comuns, como é o caso da 5CN05, devido ao seu alto grau lipofílico.

O tratamento de infecções fúngicas através de formas farmacêuticas de uso tópico apresenta algumas características vantajosas tais como a possibilidade de ação no local da aplicação e redução do risco de efeitos colaterais sistêmicos, aumento da eficácia do tratamento e da aceitação da terapia pelos pacientes (GÜNGÖR, ERDAL & AKSU, 2013). Em formulações de aplicação tópica, as MEs tem se mostrado eficazes em aumentar a absorção cutânea tanto de fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos quando comparadas a sistemas convencionais como emulsões e soluções aquosas (GRAMPUROHIT *et al.*, 2011). O uso de MEs pode aumentar a ação local ou sistêmica do fármaco por diferentes mecanismos, representando uma alternativa interessante para fármacos antifúngicos (JADHAV *et al.*, 2010).

Deste modo, objetiva-se com esta pesquisa desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica de formulações de ME contendo um fármaco derivado do tiofeno (5CN05) para que esta molécula possa ser melhor aproveitada como potencial agente antifúngico.



*Referencial Teórico*

---

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS: GÊNEROS *Candida* E *Cryptococcus*

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmam que ¼ das mortes em todo o mundo são causadas por processos infecciosos, e em países menos desenvolvidos esta proporção atinge a marca de 45% (NICOLINI *et al.*, 2008). As infecções fúngicas são uma causa crescente de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. A incidência e prevalência de infecções fúngicas invasivas têm aumentado desde a década de 1980, especialmente em pacientes imunodeprimidos e naqueles hospitalizados com graves doenças subjacentes (ESPINEL-INGROFF, 2009).

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas responsáveis por infecções em indivíduos imunocomprometidos, ou que apresentem condições predisponentes à colonização. São de grande importância devido a alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (DE BERNARDIS *et al.*, 2004). Estas leveduras apresentam-se como comensais em indivíduos saudáveis, e devido a sua habilidade de se adaptar a diferentes sítios no hospedeiro, podem ocasionar infecções em situações onde o sistema imunológico se encontra deprimido (SARDI *et al.*, 2013). O comprometimento de barreiras anatômicas devido à queimadura ou procedimentos médicos invasivos também pode tornar estes microorganismos patogênicos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

As manifestações abrangem desde colonização benígna na pele e na superfície de mucosas até formas graves e disseminadas em órgãos internos, causando ameaça à vida (LEWIS, VIALE & KONTOYIANNIS, 2012). A candidíase tem emergido como um problema crescente em pacientes imunocomprometidos, uma vez que a cavidade oral representa uma importante porta de entrada para infecções fúngicas sistêmicas (CALDERONE & FONZI, 2001).

O principal tratamento para infecções por *Candida* envolve o uso de antifúngicos da classe dos azóis (fluconazol) ou polienos (por exemplo, nistatina e anfotericina B). O fluconazol é largamente utilizado no tratamento de candidiases orofaríngeas, vulvovaginais e no esôfago, bem como em infecções sistêmicas graves (ABDEL-MOTTALEB *et al.*, 2007). Além do surgimento de perfis de resistência das leveduras, existem interações importantes do fluconazol com outros fármacos como a ciclosporina e rifampicina (HAY, 2009). Embora apresente diversas desvantagens como nefrotoxicidade e insolubilidade em água, os

poliênicos como a anfotericina B são utilizados em casos graves de infecções sistêmicas (DAMASCENO *et al.*, 2012).

A suscetibilidade aos antifúngicos pode ser distinta em leveduras isoladas de um mesmo indivíduo, revelando resistência em diversos antifúngicos azólicos (NADAGIR *et al.*, 2008). Embora a administração imediata de antifúngicos sistêmicos possam reduzir significativamente a morbidade e mortalidade associadas à candidíase, o aumento das taxas de resistência aos antifúngicos se mostra uma ameaça uma vez que diminui o acervo de agentes terapêuticos que possam ser utilizados (LEWIS, VIALE & KONTOYIANNIS, 2012).

*Cryptococcus* spp. são fungos encapsulados encontrados no mundo todo, sendo representado por duas espécies principais capazes de ocasionar infecção em humanos: *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A, D e o híbrido AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) (MATOS *et al.*, 2012). *C. neoformans* é considerado como o segundo patógeno mais relevante causador de infecções fúngicas severas em pacientes imunocomprometidos (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2012) e a quarta causa de morte mais comum em pacientes portadores de AIDS na África (HAST *et al.*, 2011).

Os microorganismos do gênero *Cryptococcus* são capazes de ocasionar em seres humanos uma patologia denominada criptococose, que vem assumindo papel relevante por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes imunocomprometidos (LEITE *et al.*, 2011). Estimativas recentes indicam que a meningite ocasionada por *C. neoformans* leve a aproximadamente 625000 casos de morte por ano, a maioria delas ocorrendo na África (KRONSTAD *et al.*, 2012). A transmissão pode ocorrer através da inalação das formas infecciosas, leveduras dessecadas e carregadas pelo ar ou provenientes de basiósporos que se depositam facilmente nos alvéolos, comprometendo inicialmente o pulmão e podendo disseminar-se para outros órgãos, mesmo se a infecção primária for leve ou assintomática (MCQUISTON & WILLIAMSON, 2012). A partir do pulmão, pode ocorrer disseminação, através da via hematogênica, para o sistema nervoso central (SNC), sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo e onde acarreta quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite, podendo levar o paciente a óbito se não for realizado o tratamento adequado (LEITE *et al.*, 2011).

O tratamento disponível para criptococose é realizado utilizando anfotericina B com doses iniciais de ataque seguido de manutenção com fluconazol, que tem se mostrado efetivo em casos de criptococose pulmonar ou disseminada e meningite criptocócica aguda (KATHIRAVAN *et al.*, 2012). Apesar de não se conhecer casos de resistência de *C. neoformans* aos antifúngicos usuais, é certo que cepas menos susceptíveis irão surgir como

resultado do uso extensivo em terapias de longo prazo ou de manutenção (GUERRA *et al.*, 2012).

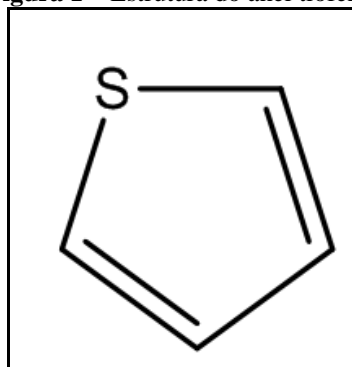
O uso indiscriminado de medicamentos é um crescente problema a nível mundial. Os antifúngicos destacam-se principalmente por estarem entre as classes medicamentosas mais utilizadas. Seu uso desnecessário e abusivo tem sérias implicações, pois proporciona o aumento do surgimento de perfis de resistência, existindo assim relação direta entre o quantitativo de fármacos utilizados e a incidência de resistência (MARIN *et al.*, 2003). Atualmente, a resistência aos antimicrobianos vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de fármacos disponíveis (OLIVEIRA; SILVA, 2008; BENGHEZAL *et al.*, 2007).

## 2.2 NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS: DERIVADOS TIOFÊNICOS

Na busca por novos fármacos, a modificação molecular tem sido uma estratégia muito adotada. Estas modificações consistem em pequenas modificações químicas em compostos protótipos, que apresentam estrutura química e atividades biológicas já conhecidas, de modo a obter compostos semelhantes e preferencialmente sem a perda das principais propriedades do protótipo (MONTANARY, 1995).

Compostos orgânicos contendo anéis heterocíclicos aromáticos, tais como o anel tiofeno (Figura 1), encontram-se largamente distribuídos na natureza e geralmente são de grande importância em vários processos bioquímicos, apresentando largo espectro de propriedades farmacológicas. A versátil aplicabilidade sintética e a atividade biológica destes heterociclos os torna importantes fragmentos estruturais na química medicinal sintética, servindo como base para o planejamento e implementação de novos agentes terapêuticos (MOHAMMAD *et al.*, 2012; MEOTTI *et al.*, 2003).

**Figura 1** – Estrutura do anel tiofeno.



(FONTE: ChemDraw Ultra 12.0)

Os derivados tiofênicos têm demonstrado um amplo espectro de aplicações industriais, principalmente na fabricação de corantes, em aplicações agroquímicas como pesticidas, como polímeros condutores altamente substituídos e em produtos farmacêuticos (HESSE, PERSPICACE & KIRSCH, 2007; SRIDHAR *et al.*, 2007).

Lima *et al.* (2009) isolaram, identificaram e avaliaram a atividade biológica de tiofenos obtidos de *Tagetes mendocina*, uma planta medicinal comumente utilizada na Argentina como diurética. Os compostos mostraram especial atividade contra os protozoários *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*, provocando lise em 100% das formas promastigotas. Observou-se ainda que efeito antifúngico de extrato metanólico do vegetal contra fungos fitopatogênicos foi reforçado após a exposição à luz ultravioleta, devido aos constituintes tiofênicos presentes nesta fração do extrato se tornarem mais ativos após da ativação pela luz.

Ram *et al.* (1997) sintetizaram diferentes derivados tiofênicos e avaliaram *in vitro* quanto a atividade anti-leishmania. Alguns dos compostos obtidos proporcionaram inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania donovani* entre 95 e 100%, destacando assim o potencial destas moléculas como possíveis agentes no tratamento da leishmaniose.

Ferreira *et al.* (2004) avaliando a atividade de compostos diarilamínicos contendo o núcleo benzo[b]tiofeno em sua estrutura, evidenciaram que a natureza do esqueleto diarilamínico e os diferentes substituintes empregados proporcionaram mudanças tanto no tipo de atividade biológica quanto em sua seletividade. Foi possível obter compostos com atividade frente a bactérias e outros com atividade antifúngica, com diferentes graus de potência. Ryu *et al.* (2005) também evidenciaram diferentes potenciais antifúngicos em grupos de derivados tiofênicos relacionados diretamente aos substituintes presentes.

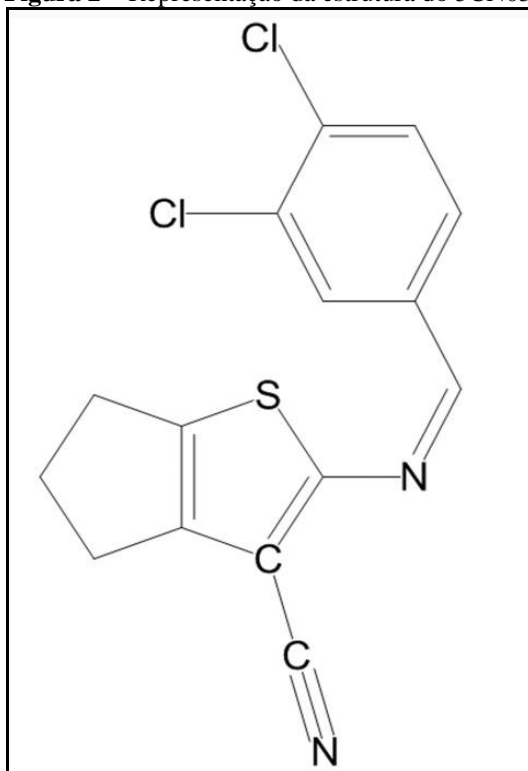
Pinto *et al.* (2008) avaliaram a atividade antifúngica de compostos derivados do benzo[b]tiofeno frente a fungos dos gênero *Candida*, *Aspergillus* e espécies dermatófitas. Foram obtidos compostos ativos contra todas as espécies avaliadas, incluindo cepas resistentes ao fluconazol. Queiroz *et al.* (2006), por sua vez, sintetizaram compostos também baseados no benzo[b]tiofeno, submetendo-os à avaliação das atividades antimicrobiana e antifúngica. As moléculas testadas mostraram atividade principalmente para bactérias e leveduras de *C. albicans*.

Os derivados tiofênicos 2-amino substituídos estão relacionados a várias propriedades biológicas, incluindo bactericida, antifúngica, analgésica, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e anestésica local (MOHAMMAD *et al.*, 2012). Pesquisadores do Laboratório de Síntese e Vetorização de moléculas da Universidade Estadual da Paraíba realizaram a síntese

de uma série de derivados 2-amino tiofenos e avaliaram as moléculas obtidas quanto a sua atividade antifúngica *in vitro* frente a leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* (MENDONÇA JUNIOR *et al.*, 2011). Observou-se neste estudo que todos os compostos apresentaram atividade antifúngica porém com diferentes graus de potência.

Para o presente trabalho, foi sintetizado um derivado 2-amino tiofeno com comprovada atividade antifúngica *in vitro* (MENDONÇA JUNIOR *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012). A molécula estudada, a 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, referida como 5CN05 (Figura 2) apresenta-se caracterizada macroscopicamente como um pó amorfo de coloração amarela. Apresenta como fórmula molecular  $C_{15}H_{10}N_2SCl_2$ ; massa molecular 320 g/mol e ponto de fusão entre 190-194 °C. Suas características biofarmacêuticas ainda não estão bem esclarecidas, principalmente no tocante a sua permeabilidade. Porém, o valor de seu coeficiente de partição ( $\log P = 5,98$ ) serve como um indicativo de que a molécula possa apresentar baixa solubilidade e permeabilidade.

**Figura 2** – Representação da estrutura do 5CN05.



(FONTE: ChemDraw Ultra 12.0)

A baixa solubilidade é um fator importante a ser considerado no desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos. Esta característica faz com que as moléculas possam apresentar redução em seu efeito terapêutico devido à baixa biodisponibilidade (LIMA *et al.*, 2008). Compostos fracamente solúveis em água são difíceis de desenvolver como

medicamentos utilizando técnicas de formulação convencionais, sendo freqüentemente abandonados no início da descoberta (MERISKO-LIVERSIDGE, LIVERSIDGE & COOPER, 2003).

### 2.3 NANOTECNOLOGIA E NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

A nanotecnologia consiste na criação, em nível atômico, molecular, macromolecular e nanométrico de materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e aplicações fundamentalmente novas, bem como o estudo de suas características e aplicabilidades (SOUSA & RANGEL, 2009). Como ramo da ciência tem atraído o interesse de inúmeros pesquisadores em todo o mundo devido ao seu potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que os seus resultados podem causar no desenvolvimento tecnológico e econômico (BHUSHAN, 2004).

A nanotecnologia vem ganhando destaque principalmente devido a sua versatilidade, uma vez que existe uma infinidade de áreas onde possa oferecer contribuições significativas, tais como a medicina, informática, eletrônica, biologia, química, física, engenharia e as ciências farmacêuticas, dentre outras (PARK, 2007). Sua utilização tem revolucionado o campo da medicina, onde nanopartículas de dimensões entre 1-100 nm são delineadas para fins diagnósticos e terapêuticos (SURENDIRAN *et al.*, 2009). Os materiais e dispositivos desenvolvidos ao nível nanométrico podem interagir com as células e tecidos a um nível molecular com um elevado grau de especificidade de integração, permitindo assim a interação entre tecnologia e sistemas biológicos nunca antes atingível (SILVA, 2004).

A maioria dos fármacos é veiculada em formas farmacêuticas ditas convencionais e, geralmente, eles não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque entre o local de aplicação e o alvo onde deve exercer seu efeito farmacológico interpõem-se uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco (DALMORA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2009a).

A tecnologia farmacêutica vem apresentando avanços significativos nos últimos anos, tendo especial destaque sua ramificação no âmbito da nanotecnologia. A busca por novos sistemas de liberação de fármacos têm se mostrado muito relevante no sentido de proporcionar alternativas terapêuticas de elevada eficácia, possibilitando a administração e absorção de fármacos com maior segurança e menor incidência de efeitos adversos (DAMASCENO *et al.*, 2011; FORMARIZ, 2005). Esses novos sistemas transportadores de

fármacos mostram-se capazes de proporcionar melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução, principalmente, para aqueles fármacos que pertencem as classes biofarmacêuticas de baixa solubilidade (ASTIER *et al.*, 2006).

Sistemas de liberação de fármacos como ME e nanoemulsões (NE) podem modificar a distribuição de um fármaco no organismo devido ao seu tamanho reduzido, apresentando como vantagens o direcionamento a alvos específicos, controle da liberação, menor toxicidade, menor número de doses, diminuição dos picos plasmáticos, a proteção da degradação e/ou inativação do fármaco (VAUTHIER & COUVREUR, 2007; SAKAMOTO *et al.*, 2010). O crescente uso destes sistemas pode ser atribuído às suas propriedades as quais incrementam um significativo aumento na solubilidade aparente dos fármacos, melhorando sua dissolução e biodisponibilidade; podendo inclusive ser utilizado como sistemas que controlam a liberação de fármacos por meio de uma cinética específica, portanto melhorando a sua ação terapêutica (TENJARLA, 1999; SILVA *et al.*, 2009a).

## 2.4 MICROEMULSÕES

### 2.4.1 Conceito

Hoar e Schulman, em 1943, introduziram o conceito de ME após evidenciarem a formação espontânea de sistemas transparentes quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico e um álcool graxo de cadeia média. Deste modo, os autores definiram as ME como sendo micro-dispersões líquidas contendo água, óleo e tensoativos e que apresentam isotropia óptica e estabilidade termodinâmica (SHAH *et al.*, 2010). Porém, esta definição mostra-se limitada uma vez que não considera a questão da microestrutura. Na verdade, a mistura de óleo, água e tensoativo pode levar à formação de uma grande variedade de estruturas e fases (NAOUI *et al.*, 2011).

Atualmente, conceitua-se ME como sistemas claros, isotrópicos e termodinamicamente estáveis formados pela dispersão de dois líquidos imiscíveis estabilizados por uma quantidade relativamente alta de tensoativos, frequentemente em combinação a um co-tensoativo (FANUN, 2012; LI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009b). São geralmente formados pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, co-tensoativo e eletrólito (DAMASCENO *et al.*, 2011). A proporção destes componentes é capaz de propiciar a formação de diferentes estruturas influenciadas por propriedades físico-



químicas dos agentes utilizados (FANUN, 2012), sendo mais comumente representadas na forma de gotículas.

As MEs podem se apresentar em três diferentes configurações: 1) óleo em água (O/A), onde a fase interna, dispersa ou descontínua é um componente lipossolúvel e a externa, dispersante ou contínua é o componente água; 2) água em óleo (A/O), apresentando como fase interna o componente aquoso e fase externa o componente oleoso e 3) bicontínua, onde não são observadas gotículas esféricas e podem ser formadas pela transição do sistema O/A para A/O ou quando há proximidade dos volumes utilizados das duas fases (DAMASCENO *et al.* 2011). É importante salientar que em sistemas com elevado teor de tensoativos o equilíbrio termodinâmico entre os constituintes pode ser representado pela formação de estruturas diferentes das MEs, como os cristais líquidos lamelares, fases hexagonais ou fases cúbicas (FORMARIZ *et al.*, 2005; LAWRENCE & RESS, 2000).

O tamanho da gotícula de uma ME, tipicamente entre 10-300nm, é aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10 $\mu$ m (DAMASCENO *et al.*, 2011). Este tamanho reduzido quando em comparação com emulsões normais se deve ao fato de que as moléculas de tensoativo são capazes de formar um filme localizado na interface entre as fases aquosa e oleosa e diminuir a energia interfacial livre (ALTHANYAN *et al.* 2011), favorecendo a formação de estruturas estáveis de ME. Ainda, o tamanho de gotículas de uma ME apresenta-se menor que 1/4 do comprimento de onda da luz, o que faz com que neste tipo de sistema a luz incidente não sofra dispersão e o mesmo apresente uma transparência característica (DAMASCENO *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 Teorias de formação das MEs**

Para compreender a obtenção de uma ME faz-se importante saber quais são os processos envolvidos na formação de sua estrutura. Tenjarla (1999) enumera três teorias para explicar os fenômenos que levam à formação de uma ME: teoria da tensão interfacial, teoria da solubilização e a teoria termodinâmica.

Na tentativa de solubilizar um líquido apolar em outro de natureza polar, os resultados não serão satisfatórios devido à alta tensão superficial consequente da incompatibilidade química entre os dois solventes. Os tensoativos são compostos considerados anfífilos, apresentando uma porção solúvel em solventes hidrofílicos (polar) e outra solúvel em solventes hidrofóbicos (apolar) e devido a esta natureza, são caracterizados pela tendência de se adsorverem na superfície de um líquido ou na interface entre dois líquidos imiscíveis

(ZAPF *et al.*, 2003). A redução da tensão interfacial é o principal fator que leva os tensoativos a se adsorverem nas interfaces (SARRAZIN *et al.*, 2009).

A partir de um dado valor de concentração do tensoativo, as interfaces se tornam saturadas, ou seja, sua solubilidade máxima já foi atingida. Este ponto é conhecido como concentração micelar crítica (CMC), e a partir dele as moléculas do tensoativo se agregam formando estruturas conhecidas como micelas (SHI, LUO & LI, 2011), que representam a forma de organização molecular onde ocorre a maximização da interação dos grupos polares com a água. A presença de tensoativos em concentração superior à CMC direciona à formação de micelas; se isto acontecer em um sistema que possua uma fase aquosa e uma oleosa, o óleo pode ser dissolvido no interior das micelas, que se dispersam na fase aquosa ou vice-versa. Assim, ao misturar óleo, água e tensoativos pode-se conseguir a formação de um sistema disperso termodinamicamente estável, chamada ME (WENNERSTRÖM; OLSSOM, 2009).

A adsorção do tensoativo na interface causa uma pressão bidimensional ( $\pi$ ) que diminui a tensão interfacial ( $\gamma_i$ ) de acordo com a Equação 1:

$$\gamma_i = (\gamma_{o/a})_a - \pi \quad (1)$$

Onde  $(\gamma_{o/a})_a$  é a tensão interfacial O/A após o potencial químico do tensoativo em cada fase ter sido equalizado por partição. Consequentemente, com o aumento da área interfacial por um aumento de  $\pi$ , a  $\gamma_i$  se aproxima de 0 (zero), favorecendo a dispersão de uma fase na outra. Os tensoativos de caráter muito hidrofílicos ou lipofílicos são inapropriados para a formulação de MEs pois a tensão interfacial não diminuirá suficientemente para a formação de um sistema ME (DAMASCENO *et al.*, 2011).

Deve-se considerar também o conceito de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), um parâmetro empírico representativo do conteúdo de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de um tensoativo. O valor do EHL pode indicar a preferência de migração do tensoativo na interface óleo/água, promovendo um caminho simples para a seleção do tensoativo de acordo com o tipo de ME desejado. A combinação de tensoativos proporciona valores de EHL que indicam qual é o valor de EHL requerido para a fase oleosa (ZHANG; HAN, 2009). Entretanto, Damasceno *et al.* (2011) afirmam que além do valor do EHL, a posição geométrica dos tensoativos na interface pode ser outro fator de influência a ser considerado em termos de seus efeitos na curvatura e fluidez do filme interfacial. Em geral, a tensão interfacial em uma ME é muito baixa (2 a 10 mN/m) e a utilização de agentes co-tensoativos proporciona ainda mais a redução da tensão (LI *et al.*, 2012).

Segundo a teoria da solubilização, a mais simplória de todas, a formação de uma ME ocorre simplesmente por meio de um intumescimento de micelas, no qual a água é solubilizada nas micelas reversas ou o óleo é solubilizado em micelas normais (DAMASCENO *et al.*, 2011).

A teoria termodinâmica leva em consideração a energia livre de Gibbs (G), que deve se tornar negativa para a formação espontânea de uma ME termodinamicamente estável. Esse fenômeno, em condições de temperatura constante, pode ser expresso conforme a Equação 2:

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma_i \times \Delta S \quad (2)$$

Na qual  $\gamma_i$  representa a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, à temperatura, volume e número de moles constantes, e  $\Delta S$  é a mudança da área interfacial (OLIVEIRA *et al.* 2004). A área interfacial, por questões óbvias, não pode ser igual a zero. Deste modo, a tensão interfacial deve reduzir a um ponto que a energia livre do sistema também reduza. Conforme discutido anteriormente, o valor de  $\gamma_i$  para sistemas ME tende a zero devido à presença do filme interfacial de tensoativos, e como consequência a variação de energia livre também adota esta tendência, o que favorece a estabilidade termodinâmica do sistema (DAMASCENO *et al.*, 2011). Os autores afirmam ainda que quando a  $\gamma_i$  for negativa, a  $\Delta G$  será menor que zero e a microemulsificação será espontânea.

### 2.4.3 Diagramas de fase

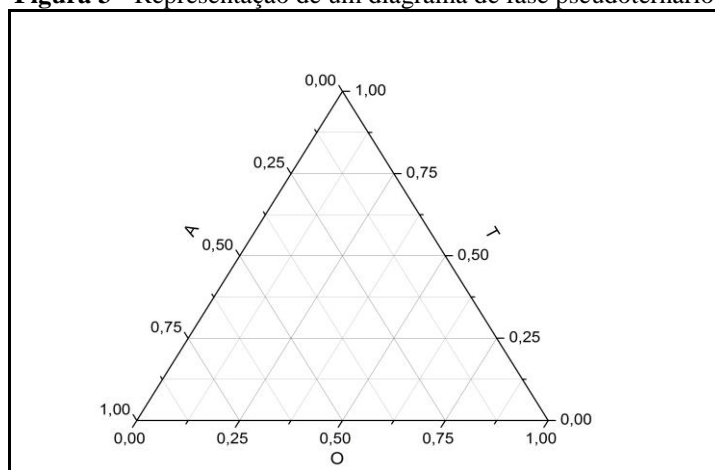
O desenvolvimento baseado em formulações de ME requer técnicas que permitem que o utilizador analise a sua microestrutura e as condições em que são formados, incluindo neste ponto a análise dos diagramas de fase (HICKEY *et al.*, 2010). A construção de diagrama de fases é uma ferramenta ideal para caracterizar o domínio das regiões de ME, cuja interpretação descreve as estruturas presentes contidas neles, podendo-se escolher a região cuja composição e viscosidade sejam mais apropriadas para a incorporação de um fármaco (DAMASCENO *et al.*, 2011). São baseados no conhecimento termodinâmico de propriedades dos materiais, e assim como eles são estabelecidos para sistemas mais simples, existe uma possibilidade para calcular diagramas de fase, mesmo para sistemas complexos (KROUPA, 2013).

Os diagramas ternários são utilizados para representar as porcentagens relativas de três componentes em uma mistura, tendo como pré-requisito que a soma das frações de cada componente seja igual a 1 (SURMAN *et al.*, 2009). O mesmo princípio pode ser aplicado na construção de diagramas de fase pseudoternários (DFPT), em que estão presentes mais de três

componentes (SCHMIDTS *et al.*, 2009). Tomando por exemplo a elaboração de um DFPT para um sistema contendo água, óleo, tensoativo e co-tensoativo, sua construção se faz possível ao agrupar os componentes tensoativo e co-tensoativo desde que a razão entre as massas desses componentes adicionados na mistura seja constante em qualquer ponto do diagrama.

Durante o desenvolvimento de um diagrama de fases, as propriedades dos triângulos equiláteros devem ser extremamente exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de um determinado ponto no triângulo é igual a sua altura (DAMASCENO *et al.*, 2011). A Figura 3 representa a estrutura do triângulo e as divisões dos pontos onde se localiza cada componente, normalmente sendo separado em: T, mistura de tensoativos ou tensoativo/co-tensoativo; O, fase oleosa; A, fase aquosa.

**Figura 3** - Representação de um diagrama de fase pseudoternário.



(Fonte: dados da pesquisa)

Para determinar a região do diagrama em que há formação de MEs, os resultados podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pelo preparo de várias amostras com composições diferentes. Em ambos os métodos, são observadas as amostras que formam ME e as que formam sistemas polifásicos e assim obtêm-se vários pontos que delimitam as regiões de formação de ME (SCHMIDTS *et al.*, 2009; ZHAO, DING & WEI, 2011). Normalmente, os sistemas ME podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacos, sistemas de viscosidade elevada ou separação de fases. Já os sistemas ME líquidos são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (FORMARIZ *et al.* 2005). A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais

convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado.

#### 2.4.4 Aplicações das MEs

Nas últimas décadas houve uma revolução na utilização de MEs em uma variedade de processos químicos e industriais, com aplicações variando desde a melhora na recuperação de óleo nos anos 70, utilização na indústria de produtos químicos até a sua inserção mais recente na área farmacêutica e de cosméticos (GRAMPUROHIT *et al.*, 2011). No campo da pesquisa farmacêutica, as MEs tem sido utilizadas tanto como sistemas de liberação de fármacos quanto como base para formulação e obtenção de novos sistemas, tais como microesferas, nanocápsulas lipídicas, micro e nanopartículas, nanopartículas sólidas de lipídios, nanopartículas magnéticas, dentre outros (FANUN, 2012).

As MEs apresentam vantagens sobre outros sistemas coloidais como emulsões, suspensões e soluções micelares, o que as torna potenciais alternativas para o carreamento de fármacos (FANUN, 2012). Elas podem permitir, por exemplo, liberação sustentada ou controlada em diversas vias de administração, tais como a tópica local, transdérmica, oral, nasal, ocular e parenteral (GRAMPUROHIT *et al.*, 2011).

Reconhecidamente, as ME são sistemas de liberação de fármacos capazes de melhorar a especificidade, atividade terapêutica e reduzir a toxicidade de fármacos e devido a existência de domínios de polaridade distinta, apresentam um enorme potencial para utilização como veículos para uma diversidade de substâncias (FANUN, 2012). Sua alta capacidade de solubilização e a possibilidade de controle na liberação (NAOUI *et al.*, 2011) juntamente com o aumento dos níveis de dosagem, a biodisponibilidade tópica e oral melhorada, poucos efeitos adversos, facilidade de fabricação (formação espontânea) e estabilidade de armazenamento a longo prazo ratificam ainda mais o uso das ME como modernos sistemas de liberação úteis para aplicação em cosméticos, formulações para cuidados pessoais e para um número de outras aplicações (ALTHANYAN *et al.*, 2011; FANUN *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2010).

A co-existência de domínios hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos em sistemas compartimentalizados permite que as MEs se tornem capazes de solubilizar uma vasta gama de substâncias, podendo conter até mesmo fármacos e moléculas bioativas de diferentes polaridades em uma mesma formulação (FANUN *et al.*, 2011). Nos últimos anos, as ME vem sendo utilizadas como potenciadores da solubilização e dissolução de fármacos com baixa

solubilidade, e os trabalhos nesta área apresentam foco em dois principais aspectos: o efeito das diferentes microestruturas na capacidade de solubilização do fármaco e a comparação entre as características físico-químicas dos sistemas antes e após incorporação de um princípio ativo (FANUN, 2012).

As ME demonstraram ser capazes de aumentar a absorção cutânea tanto de fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos quando comparados a sistemas convencionais como emulsões, óleos puros e soluções aquosas (AGGARWAL, GOINDI & KHURANA, 2013; GRAMPUROHIT *et al.*, 2011) As propriedades físico-químicas das ME são capazes de influenciar a liberação de fármacos na pele: devido a baixa tensão interfacial apresentada, pode ocorrer um melhor contato da formulação com o local de aplicação (KREILGAARD, 2002). A baixa tensão, juntamente com a fluidez da interface é capaz de aumentar a biodisponibilidade do fármaco devido a facilidade de transferência do ativo desde os domínios da formulação até o estrato córneo (NAOUI *et al.*, 2011). Devido a maior solubilização dos fármacos nas MEs, estes sistemas agem como reservatórios para substâncias fracamente solúveis e sua aplicação na pele gera um gradiente de concentração aumentado, facilitando sua permeação (GRAMPUROHIT *et al.*, 2011). Os óleos e os tensoativos que compõem as MEs podem agir como promotores de permeação do fármaco através do estrato córneo (GÜNGÖR, ERDAL & AKSU, 2013).

A utilização de sistemas ME tópicos para carreamento de fármacos antifúngicos vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisa. Puranajoti *et al* (2002) formularam MEs para utilização de antifúngicos altamente lipofílicos como miconazol, cetoconazol e itraconazol. Trabalho similar foi realizado por Peira *et al.* (2008), incorporando o nitrato de miconazol em MEs positivamente carregadas. Foram evidenciadas taxas de liberação *in vitro* alcançadas pela ME comparáveis com a formulação gel, e a presença de carga na superfície indicou otimização do direcionamento do nitrato de miconazol sem aumentar sua absorção sistêmica.

Estudando a incorporação do antifúngico griseofulvina em uma ME, Aggarwal, Goindi & Khurana (2013) demonstraram aumento significativo na permeação do fármaco quando comparado a veiculação em suspensão aquosa, solução oleosa e creme convencional. Damasceno *et al.* (2012) desenvolvendo sistemas ME para incorporação da anfotericina B demonstraram que a eficácia da ME foi similar à de um sistema micelar comercial (Fungizon<sup>®</sup>), porém a ME proporcionou redução na toxicidade do fármaco. Hashem *et al.* (2011) desenvolveram formulações ME para liberação tópica do clotrimazol, obtendo maior retenção do fármaco na pele e atividade contra *Candida albicans* quando veiculado em uma ME do que em um creme convencional.

Deste modo, a utilização de sistemas ME pode ser destinada ao desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados em fármacos dificilmente incorporados em formulações comuns devido ao seu alto grau lipofílico. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a incorporação e a atividade de um antifúngico derivado do tiofeno (5CN05) em uma formulação ME.

*Objetivos*



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar um sistema transportador de fármacos baseado em microemulsão para veiculação do antifúngico 5CN05.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos têm-se:

- Desenvolver e utilizar um diagrama de fase pseudo-ternário para obtenção e identificação das regiões possíveis de formação de sistemas opticamente transparentes;
- Explorar um sistema opticamente transparente para incorporação do 5CN05;
- Realizar caracterização da morfologia da formulação selecionada, aliando os estudos de microscopia de luz polarizada, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de transmissão;
- Desenvolver metodologias para incorporação do 5CN05 na formulação obtida, avaliando e estudando os parâmetros de incorporação da molécula;
- Desenvolver um protocolo de caracterização para as formulações ME com e sem o fármaco, contemplando as análises de: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração, doseamento, eficiência de encapsulação, tamanho de gotículas, potencial zeta e reologia (testes de escoamento e oscilatórios);
- Avaliar a atividade antifúngica e concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* do 5CN05, tanto isoladamente quanto incorporado a formulação ME desenvolvida.

*Material e Métodos*

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

- 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (5CN05), obtido e sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba;
- Miristato de isopropila (Via Farma, Brasil);
- PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (LAS<sup>®</sup> - Brasquim, Brasil);
- Poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleique<sup>®</sup>, Gattefossé, França),
- Água deionizada obtida através de osmose reversa (GEHAKA, Brasil).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Determinação do EHL

O valor de EHL proporcionado pela mistura dos tensoativos foi calculado segundo a Equação 3:

$$\text{EHL}_{\text{Total}} = 0,01 \cdot (\%_{\text{tensA}} \times \text{EHL}_{\text{tensA}}) + 0,01 \cdot (\%_{\text{tensB}} \times \text{EHL}_{\text{tensB}}) \quad (3)$$

Considerando o valor de EHL para o LAS<sup>®</sup> como sendo 14 e para o Plurol Oleique<sup>®</sup> o valor de 6.

#### 4.2.2 Diagrama de Fase Pseudoternário (DFPT)

O DFPT foi obtido através da inspeção visual das misturas de tensoativos LAS<sup>®</sup> e Plurol Oleique<sup>®</sup> na proporção 2:1 (T), fase oleosa e água deionizada. À mistura de tensoativos foi adicionado miristato de isopropila nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Foram realizadas titulações para adição ao sistema de quantidades pré-determinadas de água deionizada em temperatura ambiente. Durante a titulação, as amostras foram homogeneizadas em agitador magnético (IKA, RH Basic 1, Brasil) por 3 minutos, sendo as mudanças do aspecto visual do sistema observadas contra um fundo preto. Após as titulações, as devidas proporções de T, óleo e água foram utilizadas para plotagem dos pontos onde se observaram os fenômenos de transição de fases para sistema líquido opticamente transparente

(microemulsão - ME), sistema líquido opaco ou branco-leitoso (emulsão) ou separação de fases. Os diagramas foram obtidos em duplicata e os seus pontos foram plotados com o auxílio do software Origin Pro<sup>®</sup> 8.0.

#### **4.2.3 Seleção da formulação e incorporação do 5CN05**

Partindo-se do diagrama obtido, foi selecionada uma formulação para incorporação do 5CN05. Foram propostas diferentes metodologias de incorporação do fármaco ao sistema. Para ambos os métodos, o fármaco foi inicialmente disperso na fase oleosa, diferindo entre si pelo modo como os componentes do sistema foram homogeneizados. No primeiro método, utilizou-se homogeneização em agitador magnético modelo RH Basic 1 (IKA, Brasil) por 3 minutos. A outra metodologia de incorporação avaliada consistiu em submeter os componentes da ME-5CN05 a três ciclos de homogeneização em sonda de ultrassom modelo DES500 (Unique, Brasil) por 1 minuto seguidos da retirada do excesso de bolhas de ar em banho de ultrassom USC-3300 (Unique, Brasil).

#### **4.2.4 Caracterização físico-química das formulações obtidas**

As formulações ME-5CN05 e ME-branca foram caracterizadas em termos de aspecto macroscópico, pH, condutividade, índice de refração, doseamento, eficiência de encapsulação e reologia. Para determinação da morfologia das formulações selecionadas, foram correlacionados estudos de calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

##### **4.2.4.1 Aspecto macroscópico**

Aspectos como coloração, homogeneidade das micromulsões, separação de fases ou presença de precipitados foram avaliados decorridas 48 horas após a obtenção de cada formulação. As amostras encontravam-se armazenadas em frascos de cintilação à temperatura ambiente (25 °C).

#### 4.2.4.2 Isotropia

A determinação da isotropia dos sistemas estudados foi realizada com auxílio de microscopia de luz polarizada (ZEISS, Espanha) e software analisador de imagem (ZEISS, Espanha). As amostras foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada.

#### 4.2.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise DSC foi realizada no equipamento DSCQ20 (TA Instruments, EUA). As curvas foram analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio, usando amostras de 3 mg pesadas com precisão ( $\pm 0,1$  mg) e prensadas em placas de alumínio. A calibração do equipamento para a temperatura foi realizada utilizando como padrões os pontos de fusão do índio (PF= 156,6°C) e zinco metálico (PF= 419,5°C). A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ( $\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54 \text{ Jg}^{-1}$ ). As amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento (25 a -50 °C) a uma taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup>, mantidas por 3 minutos a -50 °C. Em seguida, as amostras foram aquecidas até a temperatura de 25 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas análises dos componentes dos sistemas, bem como o próprio sistema com e sem adição do fármaco.

#### 4.2.4.4 Caracterização morfológica - MET

A morfologia das amostras foi determinada através de observação em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni, FEI Company, EUA). Alíquotas de 5 a 10µL das MES foram adicionados em grades cobertas com filme de holey carbon. O excesso de líquido foi retirado com papel de filtro e as amostras foram coradas com ácido fosfotúngstico a 2%, sendo em seguida observadas no microscópio obtendo imagens em diferentes aumentos.

#### 4.2.4.5 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado em pHmetro digital (Instrutemp, ITmPA 210, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 à uma temperatura de 25  $\pm$  0,5 °C. As determinações dos valores de pH foram obtidas em triplicata.

#### 4.2.4.6 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das formulações obtidas foi determinada em condutivímetro digital (Instrutemp, MCA 150, Brasil). O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de  $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$ , à temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.4.7 Índice de Refração (IR)

O Índice de refração foi determinado utilizando refratômetro de bancada ABBE (Biobrix, São Paulo, Brasil), aferido com água deionizada ( $\text{IR}=1,3325$ ), à temperatura de  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , em triplicata.

#### 4.2.4.8 Doseamento

Para quantificação do 5CN05 na ME foi desenvolvida metodologia analítica baseada em espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis), que encontra-se descrita no Apêndice A. Para determinação da concentração do 5CN05 na formulação foram realizadas diluições em triplicata da ME em acetonitrila de modo a obter uma solução de concentração teórica igual a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O valor médio de absorbância foi utilizado para determinação da concentração real da amostra por meio da equação da reta obtida durante a determinação do parâmetro linearidade referente ao método espectrofotométrico.

#### 4.2.4.9 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do 5CN05 foi determinada utilizando-se 1 g da ME-5CN05, a qual foi submetida à centrifugação ( $4300 g - 7000 \text{ rpm}$ ) por 1 hora. Ao término do ciclo de centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram cuidadosamente extraídas e diluídas em acetonitrila de modo a obter soluções com concentração teórica de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A eficiência de encapsulação foi calculada conforme Equação 4:

$$\text{EE} = ([5\text{CN05}]_{\text{sob}}/[5\text{CN05}]_{\text{form}}) \times 100 \quad (4)$$

Onde: **EE** = eficiência de encapsulação;  $[5\text{CN05}]_{\text{sob}}$  = Concentração do 5CN05 no sobrenadante das formulações pós-centrifugação;  $[5\text{CN05}]_{\text{form}}$  = Concentração do 5CN05 nas formulações antes da centrifugação.

#### 4.2.4.10 Tamanho de Gotícula e Potencial Zeta

Para determinação do tamanho das gotículas, bem como o índice de polidispersidade e potencial zeta, utilizou-se a análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*), através do equipamento ZetaPlus (Holtsville, Nova Iorque, Estados Unidos). As leituras foram realizadas utilizando as MEs sem diluição e diluídas 1:20 em água. Os resultados do potencial zeta das formulações ME foram obtidos paralelamente às análises de DLS, sendo fornecidas pelo mesmo equipamento e nas mesmas condições experimentais.

#### 4.2.5 Reologia dos sistemas ME

As propriedades reológicas das formulações ME-branca e ME-5CN05 foram analisadas utilizando-se ensaios de escoamento e oscilação. As análises foram realizadas utilizando-se o reômetro Physica MCR301 (Anton Paar, Austria) com a geometria de cilindros concêntricos. As leituras foram feitas no intervalo de 0 a 300 s<sup>-1</sup> para a curva ascendente e de 300 a 0 s<sup>-1</sup> para curva descendente. Durante o ensaio a temperatura foi mantida constante em 25 °C. Com auxílio do software Rheoplus/32 versão 3.40 (Anton Paar, Austria) foram plotadas curvas de escoamento relacionando a tensão de cisalhamento ou a viscosidade com a taxa de cisalhamento para descrever as características de escoamento das formulações.

Os estudos oscilatórios foram realizados expondo-se as formulações a um aumento gradual da frequência angular ( $\omega$ ), variando de 0,01 a 10 Hertz, na região viscoelástica linear, sob uma deformação constante de 10% e à temperatura de 25 °C. Obteve-se então a relação entre os módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da  $\omega$ , sendo os valores plotados graficamente em escala logarítmica.

#### 4.2.6 Atividade antifúngica

##### 4.2.6.1 Microorganismos avaliados

A atividade antifúngica dos sistemas ME-5CN05 e ME-branca foi avaliada utilizando cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. tropicalis* (ATCC 13803) fornecidas pelo Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos – LABDEM,

pertencente à Universidade Estadual da Paraíba. Avaliou-se também a atividade frente a *Cryptococcus neoformans* (LM10) fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

#### **4.2.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM das MEs foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços, consistindo na diluição em série do fármaco e das formulações ME-branca e ME-5CN05, preparadas seguindo as orientações do Clinical and Laboratory Standards Institute, norma CLSI M27-A3 para leveduras. O 5CN05 foi dissolvido em LAS<sup>®</sup> a uma concentração de 2175 µg.mL<sup>-1</sup>. As concentrações testadas para o fármaco foram de 8 a 1088 µg.mL<sup>-1</sup>. Anfotericina B (AmB) foi utilizada como referência nas concentrações de 2 a 0.015 µg.mL<sup>-1</sup>. Avaliou-se também a possível atividade do solvente utilizado para o 5CN05 (LAS<sup>®</sup>). Utilizou-se o caldo sem inóculo como controle negativo.

Os inóculos foram padronizadas em tubos contendo 5 ml de solução salina estéril a 0,9%, realizando-se suspensão dos microorganismos. As suspensões foram ajustadas espectrofotometricamente a 90% de transmitância em 530nm, equivalente a concentração de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. As amostras avaliadas foram diluídas em série no interior de poços de microdiluição contendo 100 µL de caldo Sabouraud-Dextrose (HIMEDIA, Sasti - Maharashtra, India). Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo de leveduras, utilizando-se placas distintas para cada microorganismo avaliado. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 horas e avaliadas visualmente após este tempo. A CIM correspondeu à menor diluição das amostras capaz de proporcionar inibição de crescimento das leveduras. Todos os testes foram realizados em duplicata.



## *Resultados e Discussão*

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

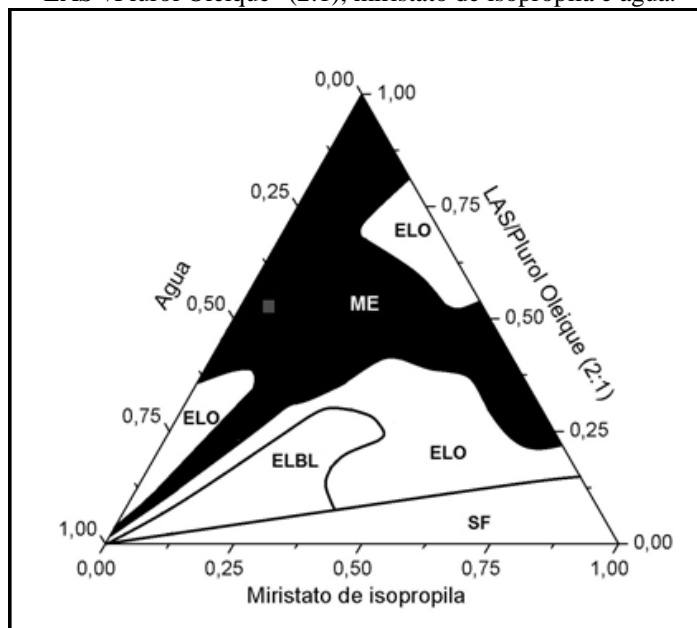
### 5.1 DIAGRAMA DE FASES

A seleção dos agentes tensoativos utilizados para obtenção de sistemas microemulsionados pode ser guiada levando-se em consideração o conceito do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). O EHL leva em consideração a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo (DAMASCENO *et al.*, 2011).

Levando em consideração o valor de EHL requerido pelo miristato de isopropila (11,5), optou-se por construir um diagrama de fases no qual a proporção de tensoativos utilizados fosse capaz de fornecer um valor próximo a este, favorecendo assim a formação de sistemas ME estáveis. Considerando o valor de EHL para o LAS<sup>®</sup> como sendo 14 e para o Plurol Oleique<sup>®</sup> o valor de 6, a proporção 2:1 foi escolhida para obtenção do diagrama, pois nesta é possível obter formulações com valor de EHL igual a 11,33.

A Figura 4 representa o diagrama de fase obtido neste estudo, caracterizando o comportamento de fase das misturas dos tensoativos, fases oleosa e aquosa. Foi observada uma diversidade de estados, ressaltando-se a presença de áreas de formação de microemulsão, que são regiões onde a energia empregada e as proporções dos componentes foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até a formação de um sistema homogêneo, límpido e translúcido (SILVA *et al.*, 2009a).

**Figura 4** - Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema LAS<sup>®</sup>/Plurol Oleique<sup>®</sup> (2:1), miristato de isopropila e água.



As áreas delimitadas representam: SF – separação de fases; ELBL – emulsão líquida branca leitosa, ELO – emulsão líquida opaca; ME – microemulsão; ■ = Formulação ME-branca.  
(FONTE: dados da pesquisa)

## 5.2 SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO ME-BRANCA

Partindo do diagrama obtido, foi selecionada uma formulação para incorporação do 5CN05. A Tabela 1 apresenta as proporções dos componentes da formulação. A escolha deste ponto se deu baseada nas observações dos trabalhos realizados por Silva *et al.* (2009a). Assim sendo, decidiu-se então avaliar qual seria o comportamento de uma formulação deste ponto do DFPT após adição do fármaco 5CN05, de modo a avaliar a possibilidade da utilização deste sistema pela via tópica.

**Tabela 1** - Composição centesimal da formulação selecionada.

Componente	Função	Proporção (%)
LAS <sup>®</sup>	Tensoativo	35,3
Plurol Oleique <sup>®</sup>	Tensoativo	17,6
Miristato de isopropila	Fase oleosa	5,9
Água destilada	Fase aquosa	41,2

(FONTE: dados da pesquisa)

Macroscopicamente observou-se que a mesma apresentou-se como um líquido de coloração levemente amarelada, translúcido e com aspecto levemente viscoso.

A classificação dos sistemas líquidos dispersos pode ser realizada por meio da determinação de sua isotropia óptica através da técnica de microscopia de luz polarizada (MLP) (DAMASCENO *et al.*, 2011). As propriedades ópticas dos sistemas podem fornecer informações sobre a estrutura e composição de materiais tais como ME e os sistemas líquidos cristalinos.

Sob um plano de luz polarizada, a amostra é considerada anisotrópica se desviar o plano da luz incidente e isotrópica se a luz não sofrer desvios; já os sistemas líquidos cristalinos lamelares e hexagonais apresentam anisotropia, enquanto os sistemas de fases cúbicas e as microemulsões são considerados isotrópicos (FORMARIZ *et al.*, 2005). Os materiais isotrópicos não apresentam restrição no plano de vibração de luz que passa através deles, mantendo as mesmas propriedades ópticas em todos os sentidos. Deste modo, sob luz polarizada os mesmos são caracterizados pela presença de um campo escuro. Por sua vez, materiais anisotrópicos apresentam propriedades ópticas que modificam a orientação da luz incidente em relação aos eixos cristalográficos, mostrando assim diferentes índices de refração dependentes da direção da propagação da luz através do sistema e da orientação do plano vibracional. Cristais líquidos anisotrópicos, devido a sua organização molecular, apresentam birrefringência e são caracterizados pela presença de Cruzes de Malta quando observados sob luz polarizada (CHORILLI *et al.*, 2011).

Ao analisar os dados da Figura 5, percebeu-se que não foram observados sinais indicativos da presença de estruturas anisotrópicas na amostra. Deste modo, pôde-se afirmar apenas que a formulação não se tratava de um cristal líquido lamelar ou uma fase hexagonal.

**Figura 5** - Fotomicrografia sob luz polarizada da formulação ME-branca.



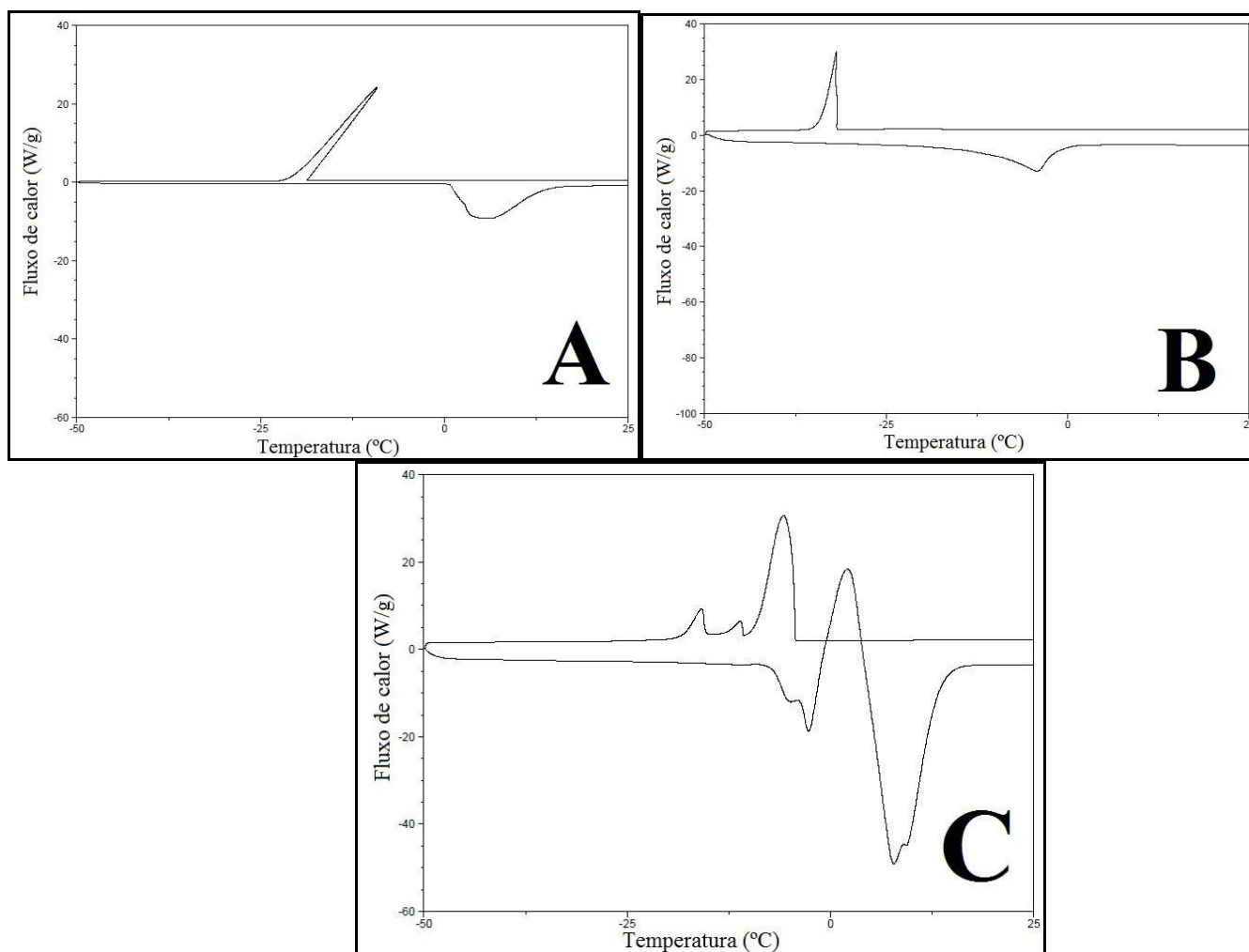
(FONTE: dados da pesquisa)

A observação da viscosidade de sistemas dispersos pode dar um indicativo de qual é a organização adotada pelo sistema. Segundo Formariz *et al.*, (2005) fases lamelares geralmente apresentam-se como um líquido viscoso e a fase hexagonal apresenta viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada. A viscosidade observada na formulação em estudo não aparentou ser elevada o suficiente para que o arranjo interno da mesma estivesse configurado como uma fase cúbica. Assim, dada a maior probabilidade de que a amostra se trate realmente de uma ME, foram realizados estudos de calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry – DSC*) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para determinar a morfologia desta formulação.

Um modo de obter informações sobre a estruturação de sistemas ME consiste na investigação do comportamento de seus componentes por meio da DSC. Zhang e Michniak-Kohn (2011) afirmaram que a estrutura de uma ME pode ser facilmente evidenciada através da interpretação dos resultados de termogramas de DSC comparativos entre a água e a fase oleosa do sistema. Estes autores descreveram três situações distintas que podem ocorrer: 1) ME do tipo água em óleo (A/O) não apresentam picos relativos ao congelamento e fusão da água, assumindo o comportamento térmico da fase oleosa; 2) ME do tipo bicontínua apresentam picos separados e distintos relacionados às fases aquosa e oleosa; 3) ME do tipo óleo em água (O/A) apresentam apenas os picos relacionados à fase aquosa.

A Figura 6 apresenta os termogramas obtidos durante a análise de DSC dos componentes isolados óleo e água, bem como da formulação ME-branca.

**Figura 6** - Termogramas de calorimetria exploratória diferencial da água (A), ME-branca (B) e do miristato de isopropila (C).



(FONTE: dados da pesquisa)

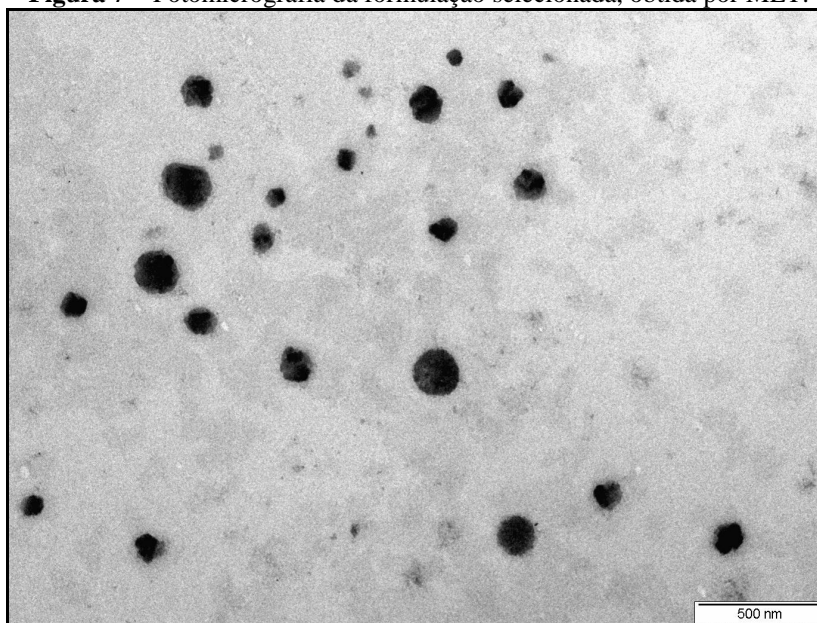
O termograma obtido durante a análise da água apresentou um pico exotérmico na temperatura de  $-9,21\text{ °C}$ , correspondendo ao processo de solidificação da mesma, e um pico endotérmico a  $5,82\text{ °C}$  relacionado à sua fusão. É importante salientar que em outros estudos do comportamento térmico da água (BOONME *et al.*, 2006; JUNYAPRASERT *et al.*, 2007) utilizando a mesma razão de resfriamento e aquecimento que a do presente trabalho, os picos relativos à solidificação e fusão da água pura encontraram-se respectivamente em  $-18\text{ °C}$  e  $0\text{ °C}$ . Observou-se que no termograma relativo ao miristato de isopropila foram evidenciados picos exotérmicos nas temperaturas de  $-11,12$ ;  $-15,43$  e  $-15,90\text{ °C}$ , bem como picos endotérmicos à  $-4,85$  e  $7,64\text{ °C}$ .

No termograma da ME-branca foi evidenciado um pico exotérmico a  $-31,84\text{ °C}$  e um pico endotérmico a  $-4,22\text{ °C}$ . Levando em consideração os dados discutidos anteriormente, percebe-se a presença dos picos referentes ao comportamento térmico da água e a ausência

dos picos relacionados à fase oleosa. O tamanho e a posição dos picos encontrados estão relacionados ao estado físico da água dentro da ME (GOEBEL *et al.*, 2011). Segundo Junyaprasert *et al.* (2007) a presença de tensoativos altera as propriedades termodinâmicas da água, como os pontos de fusão e solidificação, entalpia e calor específico. Devido a fortes interações entre as moléculas de água e os tensoativos presentes no sistema, o pico de solidificação da água aparece a uma temperatura mais baixa em comparação com os picos evidenciados durante a análise do componente aquoso isolado (BOONME *et al.*, 2006; HEUSCHKEL, WOHLRAB, & NEUBERT, 2009).

Com isso, pode-se inferir que a organização do sistema nesta formulação baseia-se na existência de uma fase interna (descontínua) composta por gotículas de óleo envolvidas por um filme de tensoativos e uma fase externa (contínua) representada pela água. Deste modo, formulação foi submetida à visualização através da MET para observação de sua morfologia (Figura 7).

**Figura 7** – Fotomicrografia da formulação selecionada, obtida por MET.



Barra de escala: 500 nm.

(FONTE: dados da pesquisa)

Em determinadas condições experimentais (composição e temperatura) as MEs exibem uma forma muito similar à das nanoemulsões (NE), apresentando nestes pontos a formação de gotículas nanométricas dispersas em uma fase contínua, o que pode gerar confusão durante a classificação de uma formulação (ANTON; VANDAMME, 2011). Esses autores afirmam ainda que um ponto fundamental na investigação da natureza de uma formulação micro ou nanoemulsionada está relacionado à influência na ordem em que os diferentes componentes do sistema são misturados para sua obtenção. Para as NE, sua

formação ocorre apenas se os tensoativos forem inicialmente misturados à fase oleosa, a mudança nesta ordem permitiria apenas a formação de emulsões comuns. Já as ME, por sua vez, não sofrem influência na ordem de mistura dos componentes, sendo formadas independentemente de variações nessa ordem.

A fim de confirmar que a formulação utilizada na presente pesquisa trata-se realmente de uma ME e não se tratava de uma NE, foram preparadas formulações variando a ordem de mistura dos componentes. Na primeira, os tensoativos foram misturados à fase oleosa antes da adição da água. Após submissão dos componentes à homogeneização ultrassônica, o sistema apresentou aspecto característico isotrópico e transparente. Uma nova tentativa de obtenção da formulação foi realizada adicionando primeiramente a fase oleosa, seguida da água e por fim os tensoativos. Esta mistura foi também submetida a homogeneização, e o resultado obtido foi idêntico ao anterior, com formação de um sistema com as mesmas características já descritas anteriormente. Fato este que nos leva a afirmar que, independente da ordem de adição dos componentes na farmacotécnica de obtenção da formulação, a mesma trata-se de uma ME do tipo O/A, sendo então denominada ME-branca.

### 5.3 INCORPORAÇÃO DO 5CN05

Para incorporação do 5CN05 na ME, diferentes metodologias foram propostas e avaliadas. Damasceno *et al.* (2011) afirmaram que a encapsulação máxima de um fármaco pode ser alcançada incorporando o mesmo durante a formação da ME. Assim, propôs-se adição do 5CN05 aos componentes da formulação antes da obtenção do sistema ME.

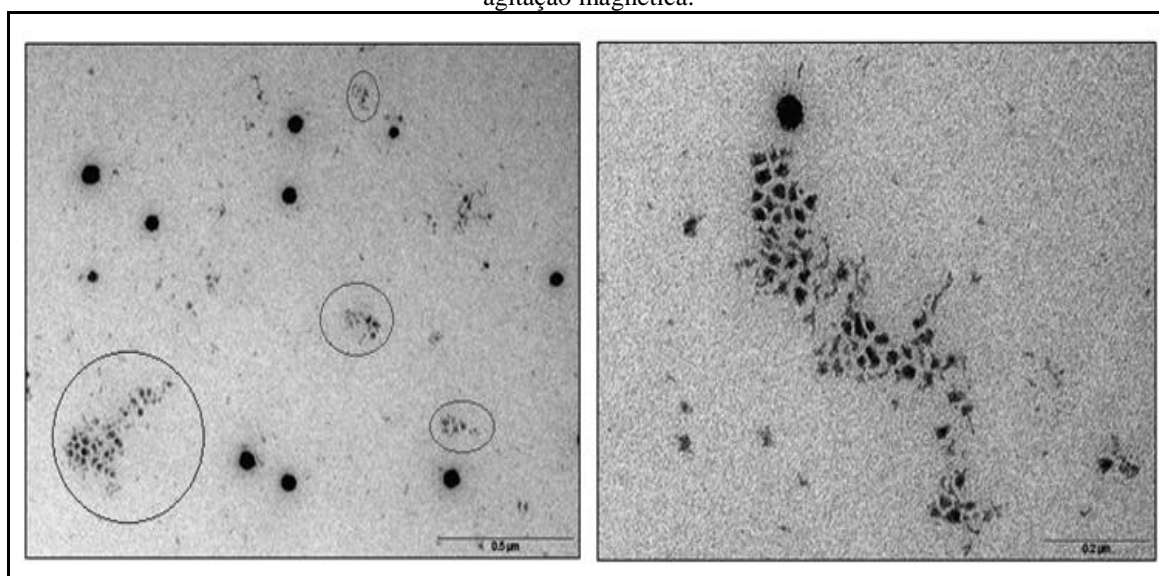
Deste modo, a uma determinada massa do 5CN05 foi adicionado o miristato de isopropila. Percebe-se que esta mistura apresentou coloração amarelo opaca, caracterizando dispersão do fármaco ao invés de solubilização. O sistema foi agitado manualmente até que a mistura se tornasse homogênea e monofásica. Em seguida, adicionou-se a mistura de tensoativos, sendo levada para homogeneização em agitador magnético por 3 minutos. Após esta etapa, adicionou-se a fase aquosa enquanto repetia-se a homogeneização. Logo em seguida, observou-se mudança do sistema, que passara de uma mistura com coloração amarelo opaca para um sistema translúcido e de coloração amarelada. Macroscopicamente, a solubilização do fármaco demonstrou ter sido adequada devido a ausência de precipitação mesmo após decorridas 48 horas.

A literatura (DAMASCENO *et al.*, 2011; FORMARIZ *et al.*, 2005) afirma que a incorporação de fármacos lipofílicos em sistemas ME do tipo O/A pode ocorrer por meio da



solubilização das moléculas do ativo no filme interfacial de tensoativos ou no núcleo oleoso das gotículas, que apresentam propriedades distintas das do meio aquoso externo. Porém, quando a amostra obtida durante a incorporação por agitador magnético foi visualizada através da MET (Figura 8), observou-se a presença de artefatos de origem desconhecida, que poderiam estar associados à baixa incorporação do fármaco no sistema.

**Figura 8** - Fotomicrografias em diferentes aumentos da formulação contendo o 5CN05 incorporado através de agitação magnética.



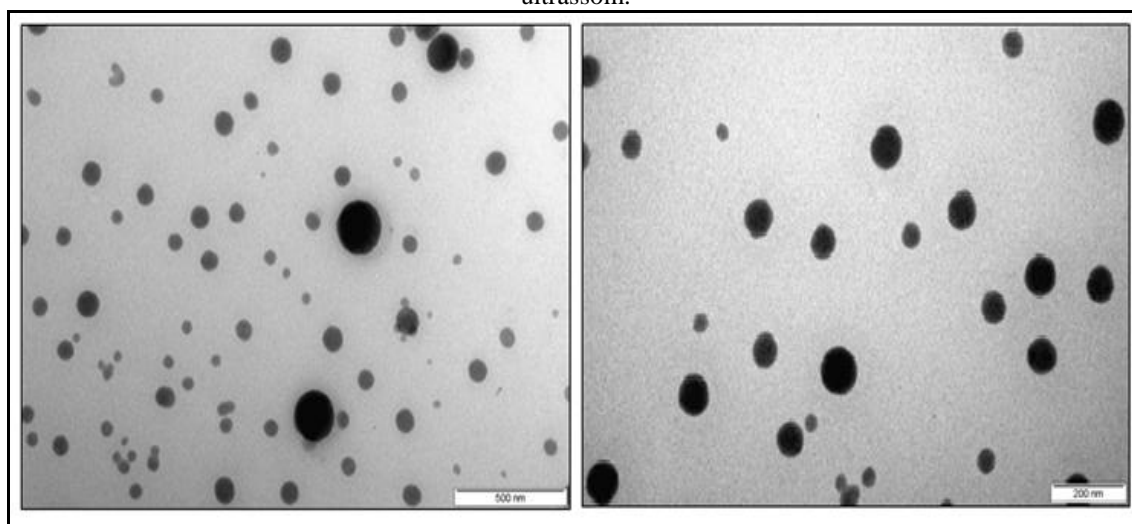
(FONTE: dados da pesquisa)

Foi avaliado também um método de incorporação do 5CN05 baseado na homogeneização dos componentes por ultrassom. A literatura relata que este é um método rápido e eficiente na formação de sistemas líquidos dispersos como as ME e NE, conferindo às mesmas alta estabilidade, pequeno tamanho de gotícula e baixo índice de polidispersidade (IPD) (LIN & CHEN, 2008). Basicamente, o método consiste na utilização de ondas sonoras de alta frequência (acima de 20 kHz) para ocasionar vibrações mecânicas no sistema por meio de cavitação acústica (nucleação, crescimento e colapso de bolhas no interior do líquido exposto). O colapso destas bolhas gera fortes ondas de choque que são capazes de ocasionar a ruptura de gotículas de tamanho elevado, formando gotículas de diâmetro bastante reduzido (GHOSH, MUKHERJEE & CHANDRASEKARAN, 2013).

Nesta tentativa, o fármaco foi inicialmente disperso na fase oleosa, e em seguida o restante dos componentes do sistema foi adicionado, incluindo a água. Esta mistura multifásica foi então submetida a homogeneização em sonda de ultrassom (DES500, Unique, Brasil) por 1 minuto e após teste tempo observou-se o aspecto apresentado pelo sistema. Após o primeiro ciclo no sonicador, percebeu-se que a amostra apresentou aspecto opaco devido à

grande incorporação de bolhas de ar propiciado pelo método. Deste modo, procedeu-se a retirada do excesso dessas bolhas através da submissão da formulação a um banho de ultrassom (USC-3300, Unique, Brasil) por 1 minuto. Para permitir melhor mistura dos componentes e proporcionar a incorporação adequada do fármaco ao sistema ME, padronizou-se que a amostra fosse submetida a 3 ciclos alternados de homogeneização e retirada das bolhas. Ao final do processo, a formulação obtida apresentou aspecto característico de ME do mesmo modo que durante a incorporação por agitação magnética. A formulação ME-5CN05 obtida via sonicador foi submetida a visualização por MET (Figura 9).

**Figura 9** - Fotomicrografias em diferentes aumentos da formulação ME-5CN05 obtida com homogeneização por ultrassom.



(FONTE: dados da pesquisa)

Microscopicamente, foi possível evidenciar a presença de gotículas esféricas bem definidas e ausência dos artefatos evidenciados durante a visualização da ME-5CN05 obtida em agitador magnético.

Uma vez que os artefatos encontrados na visualização da ME-5CN05 obtida por agitação magnética poderiam estar associados à uma baixa incorporação do fármaco com esta metodologia, realizou-se uma comparação da eficiência de encapsulação (EE) do 5CN05 em formulações obtidas pelas duas metodologias. Para esta análise utilizou-se um método analítico espectrofotométrico desenvolvido e validado capaz de quantificar o 5CN05 na ME (APÊNDICE A). As formulações foram submetidas a centrifugação (4300g por 1h) em microcentrífuga de bancada e em seguida doseadas. A EE foi calculada através da comparação entre os valores de concentração das amostras antes e após a centrifugação. Os dados obtidos na determinação da EE encontram-se descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Determinação da eficiência de encapsulação do 5CN05 na formulação ME.

Amostra	Metodologia	Pré-centrifugação	Pós-centrifugação	EE (%)
		[5CN05] (média ± DP)	[5CN05] (média ± DP)	
ME-5CN05	1	11,25 ± 0,015	9,81 ± 0,015	87,22
	2	10,73 ± 0,004	9,83 ± 0,005	91,59

Legenda: 1) Incorporação em agitador magnético; 2) Incorporação por ultrassom;  
(FONTE: dados da pesquisa)

Apesar de não ser observada separação de fases em nenhuma das formulações após o processo de centrifugação, na amostra obtida em agitador magnético observou-se discreta precipitação do fármaco e com esta metodologia o percentual de fármaco incorporado ao sistema foi de 87,22%. No entanto, o método de incorporação via ultrassom foi capaz de proporcionar um valor de EE do fármaco discretamente mais elevado (91,59 %). Devido à proximidade dos valores de EE proporcionados pelas duas metodologias, não foi possível afirmar que os artefatos evidenciados na Figura 8 tinham como explicação a presença de fármaco não-incorporado nas gotículas. A presença de gotículas com morfologia esférica mais definida fez com que a homogeneização por ultrassom fosse adotada como metodologia de escolha para preparo e incorporação do 5CN05 no sistema ME desenvolvido.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

Durante a obtenção da formulação ME-5CN05, observou-se que a adição do fármaco não modificou o aspecto translúcido e a consistência apresentada da formulação, diferindo da ME sem o fármaco principalmente quanto à coloração, que se tornou fortemente amarelada. Esta mudança se deve ao fato de que o 5CN05 apresenta-se como um pó amorfo de coloração amarela, conferindo ao sistema esta característica. A Tabela 3 traz resumidamente os dados obtidos durante a caracterização físico-química das formulações com e sem o fármaco.

**Tabela 3** - Caracterização das formulações ME.

Parâmetros	Formulações	
	ME-branca	ME-5CN05
Aspecto macroscópico	Límpido	Límpido
pH	6,60 ± 0,03	6,58 ± 0,03
Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	105,00 ± 5,80	97,23 ± 1,38
Índice de refração	1,410 ± 0,02	1,412 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-3,75	-0,284
Tamanho da gotícula (nm)	427,8	355,0
IPD	0,344	0,399
Doseamento ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	-	560,02 ± 2,48

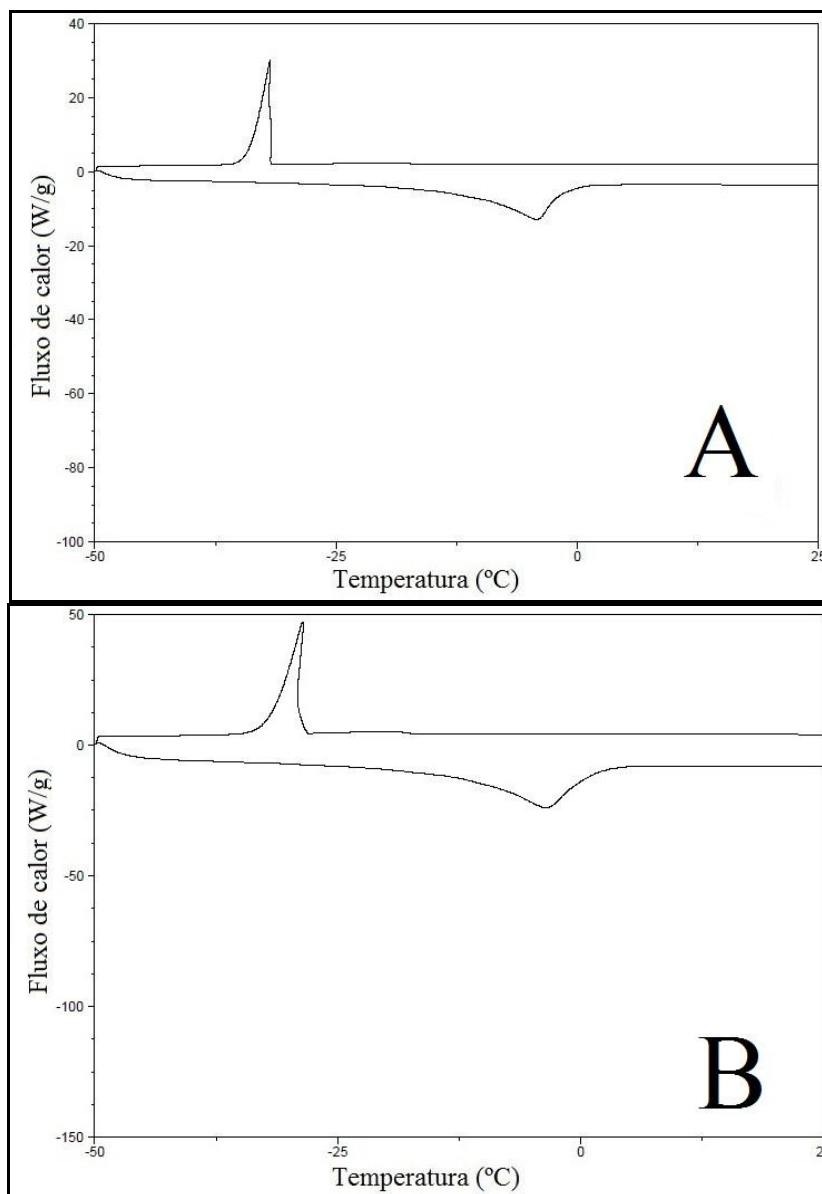
(FONTE: dados da pesquisa)

Todas as amostras foram manipuladas e mantidas à temperatura ambiente por 48 horas antes da caracterização. Nestas condições, todas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, livre de indícios de separação de fases ou formação de precipitados.

O pH ideal de uma formulação tópica é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele, sendo aceitáveis valores entre 5,5 e 8,0 (SILVA *et al.*, 2009a). Os valores de pH evidenciados para as formulações ME-branca e ME-5CN05 encontraram-se dentro desta faixa, fato que permite a aplicação tópica destes sistemas. Percebe-se também que este parâmetro não foi afetado pela incorporação do 5CN05.

A condutividade elétrica está relacionada ao tipo de microestrutura apresentada pela ME, sendo importantes para determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos (LAWRENCE & REES, 2000). Os valores apresentados em ambas as formulações estão relacionados às propriedades de condutividade da fase externa aquosa. Os termogramas obtidos pela análise DSC das formulações (Figura 10) demonstram que a adição do fármaco não ocasionou alteração na microestrutura do sistema, fato este comprovado pela presença dos picos relativos aos processos de solidificação e fusão da água em ambas as formulações, o que conforme discutido anteriormente demonstra a presença de água como fase externa das MEs.

**Figura 10** – Termogramas de calorimetria exploratória diferencial das formulações ME-branca (A) e ME-5CN05 (B)



(FONTE: dados da pesquisa)

Quanto ao índice de refração, percebeu-se que a adição do fármaco não modificou a este parâmetro uma vez que não foram evidenciadas diferenças significativas entre os valores das amostras com e sem o fármaco (Tabela 3). O doseamento do 5CN05 na ME foi realizado diluindo-se alíquotas da formulação ME-5CN05 em acetonitrila e submetendo-se esta diluição a leitura em espectrofotômetro modelo UV-MINI 1240 (Shimadzu, Japão) ajustado ao comprimento de onda de 387 nm. As leituras foram realizadas em triplicata. O valor médio de concentração do 5CN05 foi obtido aplicando-se a média das absorbâncias na equação da reta proveniente da determinação do parâmetro linearidade durante o desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico (APÊNDICE A).

A determinação do tamanho de gotículas em sistemas dispersos como as MEs e NEs pode ser realizada pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS). Quando as gotículas presentes no sistema são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento da luz, sendo que essa intensidade de luz espalhada varia numa taxa dependente da velocidade de difusão das gotículas, as quais, por sua vez, são governadas pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006).

Na tentativa de leitura das amostras sem diluição, o equipamento não foi capaz de fornecer medidas do tamanho de gotícula dos sistemas, fato este que poderia estar relacionado à viscosidade apresentada pelas formulações ME estudadas, estando em concordância com a literatura (SAHLE *et al.*, 2012; SHUKLA & NEUBERT, 2006) onde foi observado que se o sistema é concentrado ou viscoso, a interpretação torna-se dificultada em razão das interações existentes entre as gotículas. Para suprimir esta interação, faz-se necessário realizar diluição do sistema (LAWRENCE & REES, 2000; ABOOFAZELI *et al.*, 2000). Deste modo, para a análise de DLS das amostras ME-branca e ME-5CN05, as mesmas foram diluídas em água na proporção 1:20 antes da leitura. Percebe-se que o tamanho médio de gotículas evidenciado por esta técnica (427,8 e 355 nm, respectivamente) estão em discrepância aos observados durante a visualização das amostras por MET (143,2 e 288,9 nm). Neste caso, é importante salientar que o comportamento de um sistema ME frente à diluição pode dificultar a interpretação do resultado obtido, uma vez que aspectos como morfologia e tamanho de gotículas são fortemente afetadas e até mesmo destruídas por mudanças de temperatura e/ou diluições (BRUXEL *et al.*, 2012).

MEs quando diluídas perdem sua estabilidade termodinâmica, pois a concentração de tensoativos se torna insuficiente para manter a baixa tensão interfacial (SOLÈ *et al.*, 2012), podendo ocorrer mudanças drásticas no tamanho das gotículas (SHARMA *et al.*, 2010; DJEKIC & PRIMORAC, 2008). Devido a esta característica intrínseca das ME estudadas, presumimos que a técnica DLS não foi eficiente devido à impossibilidade de realização de leituras confiáveis nas amostras sem a diluição.

Quanto ao potencial zeta, percebe-se que as formulações apresentaram valores negativos, sendo -3,75 mV para ME-branca e -0,284 mV para a ME-5CN05, no qual foi observado que com a adição do fármaco ocorreu a diminuição dos mesmos. Shah *et al.* (2010), desenvolvendo MEs para incorporação do aceclofenaco, utilizando os tensoativos de composição similar às MEs do presente estudo também evidenciaram valores pequenos de carga negativa na superfície das gotículas.

O potencial zeta tem um papel importante na determinação da estabilidade de sistemas dispersos e nas interações entre as gotículas presentes (KHAN *et al.*, 2013). Sistemas mais estáveis apresentam valores de potencial zeta iguais ou superiores a 20 mV, uma vez que cargas superficiais elevadas ocasionam o predomínio das forças de repulsão entre as gotículas, superando o caráter de atração das forças de Van der Waals (BOSE *et al.*, 2013). Esta maior repulsão é importante no sentido de prevenir o contato e aglomeração das gotículas (BHANDARI & KAUR, 2013). Deste modo, os valores de potencial zeta encontrados para as formulações ME-branca e ME-5CN05 poderiam indicar que as mesmas apresentem baixa estabilidade a longo prazo. Porém, a literatura (AGGARWAL *et al.*, 2013) afirma que a estabilidade de MEs contendo em sua composição tensoativos não-iônicos, como as formulações do presente estudo, não depende unicamente do potencial zeta. Deste modo, apenas estudos posteriores de estabilidade a longo prazo podem esclarecer melhor o perfil de estabilidade das formulações ME.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DOS SISTEMAS ME

As propriedades reológicas e de transporte de sistemas ME geralmente revelam informações importantes acerca da microestrutura dos mesmos. As curvas de escoamento são resultados que demonstram o comportamento de escoamento de um líquido, correlacionando com a sua tensão de cisalhamento (*Shear stress*,  $\tau$ ) e a taxa de cisalhamento (*Shear rate*,  $\dot{\gamma}$ ). Elas geralmente são representadas em dois momentos distintos do experimento, uma pela curva ascendente e a outras a curva descendente, que representam respectivamente o aumento e a redução gradual da  $\dot{\gamma}$ , caracterizando o comportamento de escoamento de um material (SCHRAMM, 2006).

O comportamento dos fluidos pode ser inicialmente dividido em newtoniano e não-newtoniano. Para um fluido newtoniano, sua curva de escoamento gera uma reta que passa pela origem, onde todos os pares de valores de taxa e tensão de cisalhamento pertencentes a esta reta demonstram uma relação linear. Isto significa que a viscosidade do fluido é constante e não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento. Os outros tipos que não seguem esse comportamento de escoamento ideal são chamados de não-newtonianos e podem ser divididos em dois grupos: dependentes do tempo e independentes do tempo. Fluidos dependentes do tempo podem ser classificados como reopéticos ou tixotrópicos. Os fluidos independentes do tempo são: pseudoplástico, plástico, dilatante e plástico de Bingham (ZÜGE, 2012).

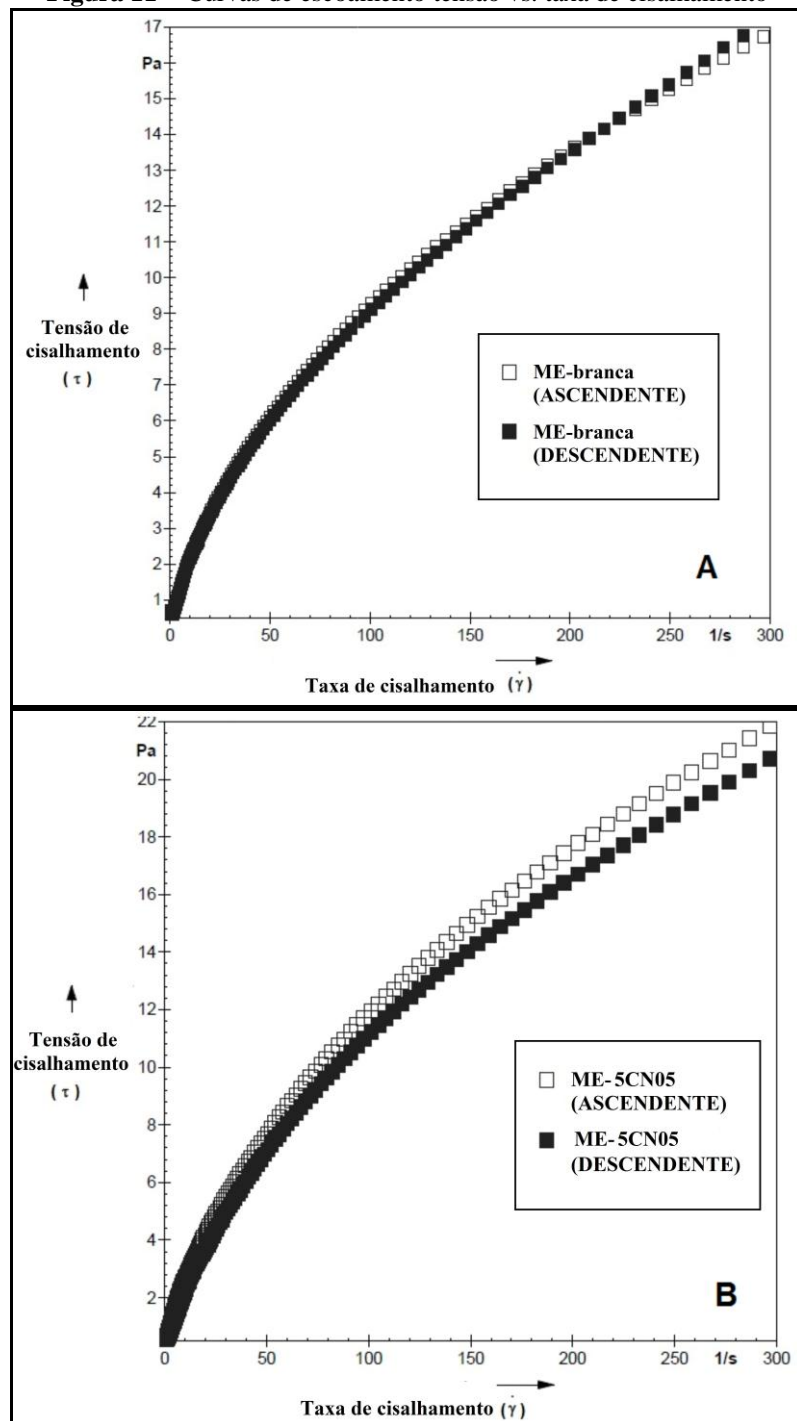
O comportamento pseudoplástico ocorre em materiais que sofrem diminuição em sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, quando representados graficamente, a curva apresenta curvatura côncava acima da curva dos fluidos newtonianos. Para as formulações dermocosméticas, o comportamento pseudoplástico é o mais comum (CORRÊA *et al.*, 2005). O comportamento plástico apresenta a mesma descrição dos pseudoplásticos, porém com limite de escoamento. Somente quando as forças externas são fortes o suficiente para superar as forças de reticulação (tensão de cisalhamento) a estrutura entra em colapso. Nesta curva a ordenada é interceptada no ponto crítico (yield point) e não na origem. O comportamento dilatante ocorre em materiais que quando submetidos ao aumento da taxa de cisalhamento sofrem aumento da viscosidade (SILVA *et al.*, 2012).

As propriedades reológicas de sistemas ME são afetadas por diversos fatores, dentre as quais destacam-se o volume de fase oleosa dispersa, a distribuição do tamanho das gotículas, a reologia interfacial do filme de tensoativos bem como as características dos mesmos, a viscosidade e sua composição (FORMARIZ *et al.*, 2010). Pestana *et al.* (2008), estudando MEs contendo fosfatidilcolina de soja e Tween 20 como tensoativos evidenciaram que suas formulações comportaram-se como flúidos não-newtonianos do tipo pseudoplástico. Comportamentos similares foram encontrados por Silva *et al.* (2012) e Formariz *et al.* (2010) em sistemas ME com diferentes composições.

A Figura 11 mostra o comportamento reológico das ME na ausência e presença do fármaco. Percebeu-se que as amostras apresentaram comportamento de fluido não-newtoniano, pois não foi observada linearidade entre os valores de tensão e a taxa de cisalhamento. As curvaturas observadas são também indicativas de que as MEs apresentaram comportamento pseudoplástico.



**Figura 11** - Curvas de escoamento tensão vs. taxa de cisalhamento



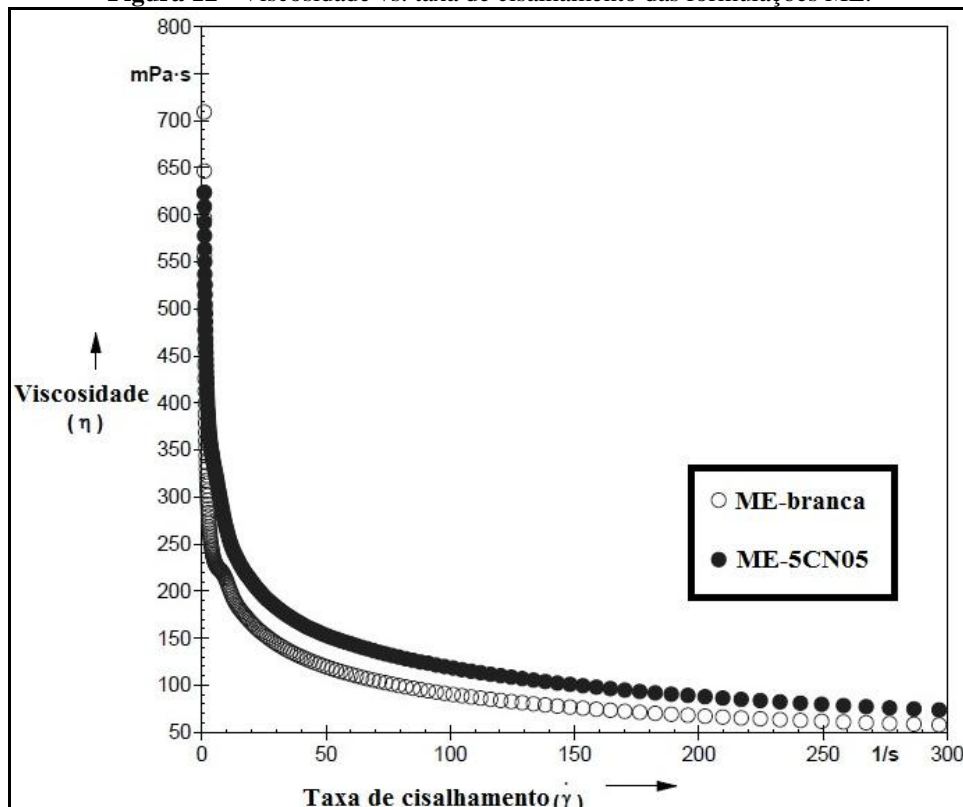
Legenda: A - fórmulação ME-branca; B - ME-5CN05.  
(FONTE: dados da pesquisa)

O comportamento pseudoplástico em MEs pode ser resultante do alinhamento das gotículas coloidais formadas pelos componentes do sistema na direção do escoamento com o aumento a tensão ou velocidade de cisalhamento. Ocorre uma redução da resistência interna do sistema, o que diminui a sua viscosidade e caracteriza o fenômeno de *shear thinning*, podendo-se dizer que as ME “afinam-se” sob ação do cisalhamento. A pseudoplasticidade se mostra uma propriedade desejável em dispersões coloidais farmacêuticas uma vez que a

diminuição da viscosidade facilita o preparo e a aplicação sobre a pele destes sistemas (FORMARIZ *et al.*, 2010).

A Figura 12 representa a variação da viscosidade das formulações ME em função da taxa de cisalhamento. A viscosidade de fluídos não-newtonianos (fluídos pseudoplásticos, plásticos entre outros), é denominada viscosidade aparente, pois neste caso, além da temperatura e pressão (características de fluídos newtonianos), ela é dependente também da velocidade de cisalhamento e do tempo (ATKINSON, 2005). Como os materiais pseudoplásticos têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor. A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (CORRÊA *et al.*, 2005). Diferentemente de um fluido newtoniano, que mantém o valor de viscosidade mesmo com o aumento da taxa de cisalhamento, os valores de viscosidade das formulações ME-branca e ME-5CN05 apresentaram decréscimo a partir de um valor inicial à medida que a taxa de cisalhamento aumentou, confirmando o comportamento pseudoplástico.

**Figura 12** - Viscosidade vs. taxa de cisalhamento das formulações ME.

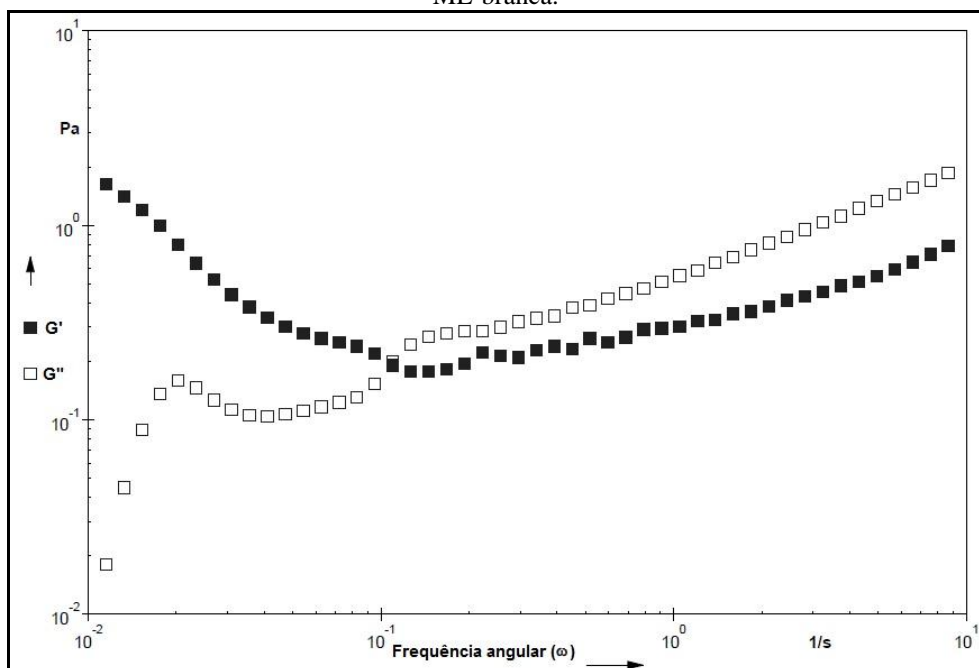


(FONTE: dados da pesquisa)

Algumas informações sobre a estrutura dos sistemas podem ser obtidas por análises reológicas a partir da aplicação de solicitação oscilatória. Neste ensaio, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal e a relação entre as ondas de tensão aplicada e a deformação resultante fornecem informações sobre os tipos de resposta do sistema, que pode ser classificada em elástica ou viscosa. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo ( $G^*$ ). O componente real do módulo elástico é denominada de módulo de armazenagem (módulo elástico -  $G'$ ) e representa a energia armazenada durante a deformação a uma tensão crescente e liberada quando a tensão é relaxada. A parte imaginária do módulo, representada como  $G''$ , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, pois a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Assim sendo, denomina-se  $G''$  como sendo o módulo de perda ou módulo viscoso, que leva em conta esta dissipação de energia (SCHWARZ *et al.*, 2012). Deste modo, realizou-se o estudo da evolução dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) em função da frequência aplicada para as formulações ME.

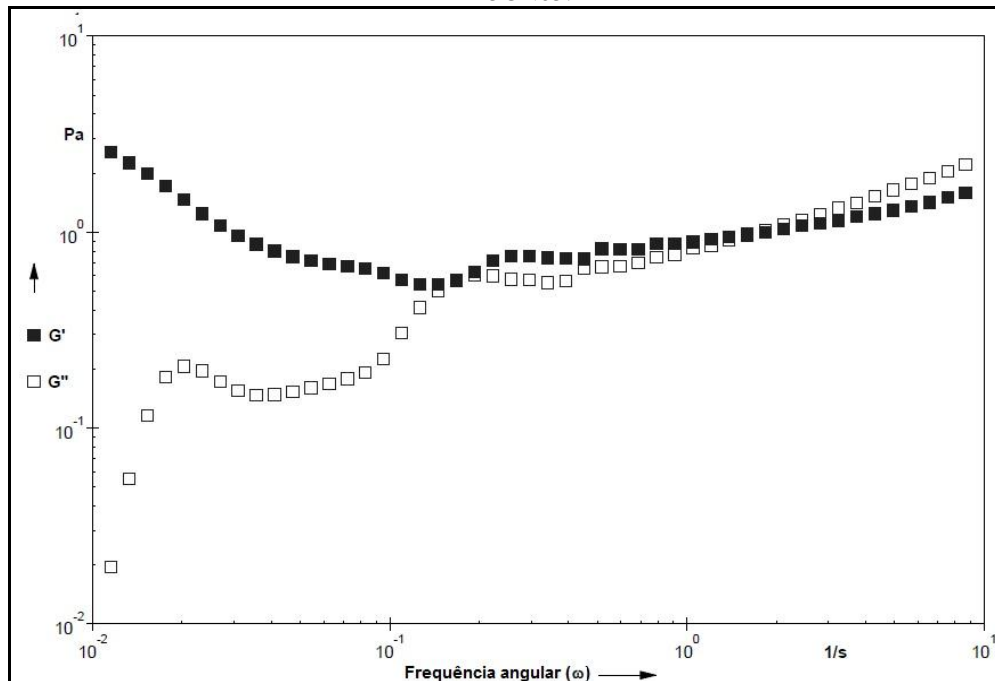
As Figura 13 e 14 representam, respectivamente, os valores de  $G'$  e  $G''$  apresentados pelas formulações ME-branca e ME-5CN05 no intervalo de frequência angular de 0,01 a 10 Hz, dentro da região viscoelástica linear. A presença dos dois módulos em ambas as formulações significa que as mesmas apresentaram comportamento tanto viscoso quanto elástico (viscoelástico), porém com diferentes perfis.

**Figura 13** - Evolução dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) da formulação ME-branca.



(FONTE: dados da pesquisa)

**Figura 14** - Evolução dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) da formulação ME-5CN05.



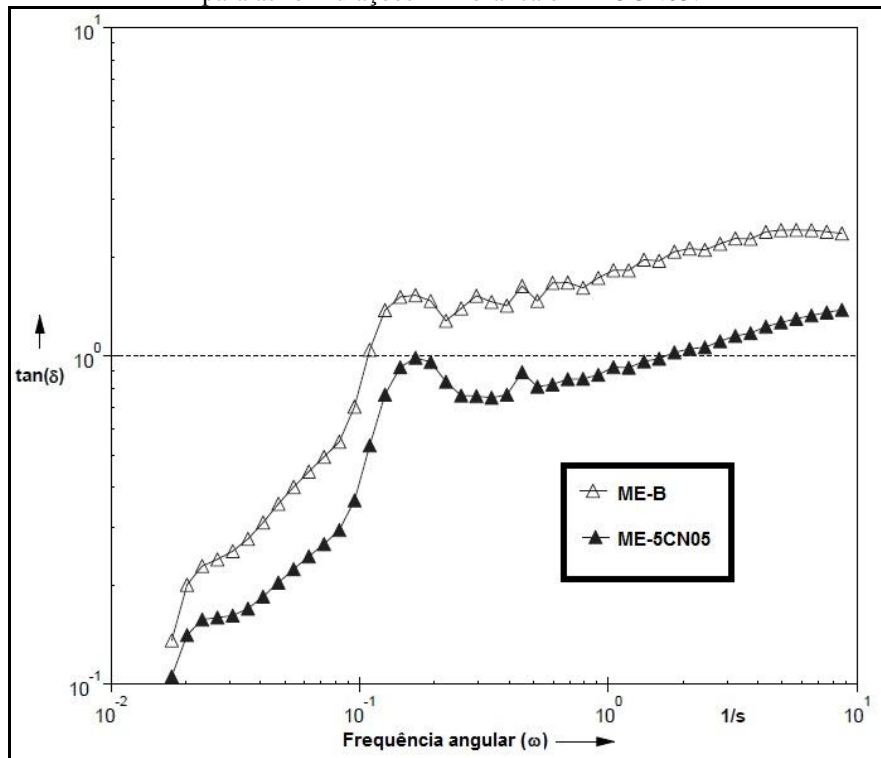
(FONTE: dados da pesquisa)

Para a formulação ME-branca (Figura 13), em frequências abaixo de 0,1 Hz o sistema apresentou predomínio do componente elástico ( $G' > G''$ ) e acima deste valor de frequência prevaleceu o componente viscoso ( $G' < G''$ ). Pode-se afirmar então que para frequências menores que 0,1 Hz a formulação comportou-se como um sólido elástico enquanto que em valores superiores o seu comportamento característico é de um líquido viscoso.

Já para a formulação ME-5CN05, Figura 14, percebeu-se o predomínio do componente  $G'$  exceto em frequências acima de 0,44 Hz. Com isso, pode-se afirmar que abaixo deste valor o sistema apresenta um caráter elástico mais pronunciado indicando que o sistema comportou-se como um sólido elástico. Acima desta frequência os valores de  $G'$  e  $G''$  são bastante próximos, com discreto predomínio do componente viscoso.

Como as formulações estudadas apresentaram comportamento viscoelástico, a análise do ângulo de defasagem ( $\tan \delta$ ) pode representar uma ferramenta simples e direta que possibilita quantificar a viscoelasticidade, ou seja, definir o quanto a ME se comporta como um sólido elástico ou um líquido viscoso. O  $\tan \delta$  representa a razão entre  $G''$  e  $G'$ ; quando  $\tan \delta$  é maior que 1, indica que  $G'' > G'$  e o material tem um comportamento semelhante a um líquido viscoso e quando  $\tan \delta < 1$ ,  $G'' < G'$  e o comportamento é de um sólido elástico (XU & KOELLING, 2005). A Figura 15 mostra a variação de  $\tan \delta$  em função da frequência para as formulações ME-branca e ME-5CN05.

**Figura 15** - Variação do ângulo de defasagem ( $\tan \delta$ ) em função da frequência para as formulações ME-branca e ME-5CN05.



(FONTE: dados da pesquisa)

Percebeu-se que a formulação ME-branca comportou-se inicialmente como um sólido elástico, porém com o aumento da frequência seu comportamento passou a ser essencialmente o de um líquido viscoso ( $\tan \delta > 1$ ). Por outro lado, a formulação ME-5CN05 apresentou em quase todo o intervalo de frequência estudado valor de  $\tan \delta$  menor do que 1, indicando comportamento de um sólido elástico. Apenas em frequências mais elevadas a ME-5CN05 apresentou características de líquido viscoso. O comportamento de sólido elástico se mostra de grande interesse para produtos destinados à aplicação tópica, como é o caso da formulação ME objeto deste estudo. Após a aplicação da tensão, a formulação apresentará facilidade em fluir, refletindo em um bom espalhamento durante a aplicação e formação de uma camada uniforme sobre a pele (MORAIS, 2006). Estas características juntamente com a pseudoplasticidade tornam a formulação ME-5CN05 como um sistema promissor para aplicação tópica.

## 5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Durante a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco e dos sistemas ME evidenciou-se que as condições utilizadas foram adequadas para crescimento das leveduras uma vez que o controle realizado em poços contendo apenas o meio de cultura e o inóculo demonstrou crescimento das leveduras, fato este não observado nos poços de controle apenas com o caldo. O valor de CIM para o controle positivo (AmB) foi de  $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A Tabela 4 ilustra os resultados da determinação da CIM das formulações ME. Os testes foram realizados em duplicata sendo que os valores de CIM apresentados representam a média dos valores obtidos.

**Tabela 4** - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos.  
CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

Microorganismos	5CN05	ME-branca	ME-5CN05
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	270	R	70
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	270	R	70
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	540	R	140
<i>Cryptococcus neoformans</i> LM10	17	R	2,2

Legenda: R = resistente.

(FONTE: dados da pesquisa)

Os microorganismos avaliados apresentaram-se sensíveis ao 5CN05, que demonstrou moderada atividade contra as cepas de *Candida* ( $270\text{-}540 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Entretanto, houve ótima atividade do fármaco contra *C. neoformans*, com valor de CIM igual a  $17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Quanto às formulações ME, não foi observada sensibilidade dos microrganismos à ME-branca. As leveduras do gênero de *Candida* apresentaram sensibilidade a ME-5CN05, sendo mais ativo contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* ( $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Porém, o produto mostrou ótima atividade contra *C. neoformans*, com CIM de  $2.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A utilização de sistemas ME tópicos com a finalidade de proporcionar melhoras na atividade de moléculas antifúngicas vem sendo uma estratégia adotada por alguns pesquisadores. Jadhav *et al.* (2010) desenvolvendo MEs tópicos contendo fluconazol evidenciaram maior atividade em suas formulações do que em géis convencionais disponíveis no mercado, fato atribuído a melhor difusão do fármaco proporcionada pela presença dos tensoativos e fase oleosa. El-Hadidy *et al.* (2012) ao investigar a aplicação de MEs como carreadores tópicos para o fármaco voriconazol observaram que as formulações ME

apresentaram atividade antifúngica consideravelmente maior contra *C. albicans* do que uma solução supersaturada do fármaco.

O 5CN05 demonstrou maior atividade contra *C. neoformans* do que contra leveduras do gênero *Candida*. Este perfil de atividade está em concordância com os estudos de Mendonça Júnior *et al.* (2011), onde evidenciaram que os derivados tiofênicos demonstraram moderada ou fraca atividade antifúngica contra cepas de *Candida* e resultados consideráveis de sensibilidade de *C. neoformans*. Os valores de CIM do fármaco na ME também apresentaram este perfil, atingindo um valor ótimo para *C. neoformans*.

Na atualidade, as infecções fúngicas são tratadas utilizando-se um número limitado de agentes terapêuticos, sendo os principais: equinocandinas, poliênicos (AmB), antimetabólitos (flucitosina) e azóis (fluconazol), sendo que apenas os três últimos apresentam atividade contra *C. neoformans* (HAST *et al.*, 2011). Apesar de seu grande uso, a AmB apresenta alta nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, podendo ocasionar também uma severa anemia (TONOMURA *et al.*, 2009). Os azóis são os fármacos de escolha na terapia de infecções por *Cryptococcus* e, apesar de não se conhecer casos de resistência de *C. neoformans* aos antifúngicos usuais, é certo que cepas menos susceptíveis irão surgir como resultado do uso extensivo do fluconazol em terapias de longo prazo ou de manutenção (GUERRA *et al.*, 2012).

Um dos fatores de virulência mais importantes de *C. neoformans* é a sua cápsula polissacarídica, pois elas apresentam em sua composição dois polissacarídeos diferentes (glucoroxilomanana - 90 a 95%; galactoxilomanana - 5 a 8%) e manoproteínas (VECCHIARELLI & MONARI, 2012). Este fungo apresenta a habilidade de modular a estrutura e o tamanho de sua cápsula durante o processo de infecção de modo a permitir sua adaptação a diferentes ambientes e facilitar sua disseminação por diferentes tecidos (CHARLIER *et al.*, 2005). Essas modificações estruturais na cápsula têm sido relacionadas como fator importante para a passagem do microrganismo pela barreira hemato - encefálica (GUERRERO *et al.*, 2006; JAIN *et al.*, 2006). Assim sendo, podemos presumir que a atividade deste fármaco (5CN05), após incorporação em um sistema ME, provavelmente, esteja relacionado a interação entre os componentes lipídicos do sistema e a cápsula do fungo, aumentando, portanto, a área de contato e o acesso do fármaco ao microorganismo. Provavelmente a ME-5CN05 possa estar agindo como facilitador da permeação do fármaco através do material capsular do *C. neoformans*.

Deste modo, concluiu-se que os resultados do presente trabalho mostram-se promissores uma vez que o mesmo possa vir a representar uma alternativa terapêutica contra *C. neoformans*.



*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- A técnica empregada para a determinação do diagrama de fases, destes sistemas, mostrou-se bastante simples e reprodutível, pois foi possível definir com clareza as várias regiões do diagrama, incluindo as regiões possíveis de formação de ME utilizando os tensoativos LAS<sup>®</sup> e Plurol Oleique<sup>®</sup> juntamente com o miristato de isopropila e a água;
- A metodologia proposta para incorporação do 5CN05 na formulação ME por ultrassom mostrou-se adequada, uma vez que após a incorporação, os sistemas obtidos apresentaram-se límpidos, transparentes e isotrópicos, mostrando que o 5CN05 não ocasionou perturbação da estabilidade termodinâmica da ME;
- Os dados de calorimetria exploratória diferencial demonstraram ser importantes para confirmação da estruturação da ME, bem como a microscopia eletrônica de transmissão mostrou-se eficiente para caracterizar morfologicamente as MEs desenvolvidas;
- As formulações estudadas apresentaram características físico-químicas e reológicas favoráveis a sua aplicação cutânea;
- Os resultados apresentados nesta pesquisa sugerem que o 5CN05 veiculado em uma formulação ME pode ser utilizado como potencial agente antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* e pode ser considerado composto promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antifúngicos.

Vale ressaltar que estudos mais aprofundados de ordem farmacológica, farmacocinética e clínica se fazem necessários para complementar os resultados obtidos nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOTTALEB, M.M.; MORTADA, N.D.; ELSHAMY, A.A.; AWAD, G.A. Preparation and evaluation of fluconazole gels. **Egyptian Journal of Biomedical Sciences**, v.23, n.1, 2007.

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci**, v.2, n.3, E.19, 2000.

ABRANTES, P.M.; MAGALHÃES, S.M.S.; ACURCIO, F. A.; SAKURAI, E. Avaliação da qualidade das prescrições de antimicrobianos dispensadas em unidades públicas de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.1, p.95-104, 2007.

AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.105, p. 158-66, 2013.

ALTHANYAN, M.S.; ASSI, K.H.; CLARK, B.J.; HANAEE, J. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.3, p.397-402. 2011.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical research**, v.28, n.5, p.978-85. 2011.

ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.64, n.1, p.23-35, 2006.

ATKINSON, H.V. Modelling the semisolid processing of metallic alloys. **Progress in Materials Science**, v. 50, p.341-412, 2005.

BHANDARI, R.; KAUR, I.P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n.1-2, p.202-12, 2013.

BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M.G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J.P.; COSSON, P. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**, v. 9, p.1336-1342, 2007.

BHUSHAN, B. Springer Handbook of Nanotechnology. Nova Iorque: **Springer**, 2004.

BOONME, P.; KRAUEL, K.; GRAF, A.; RADES, T.; JUNYAPRASERT, V. B. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. **AAPS PharmSciTech**, v.7, n.2, 2006.

BOSE, S.; DU, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v35, n.9, p.1827-40, 2012.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.7, p.327-335, 2001.

CARROLL, S.F.; LAFFERTY, E.I.; FLACZYK, A.; FUJIWARA, T.M.; HOMER, R.; MORGAN, K.; LOREDO-OSTI, J.C.; QURESHI, S.T. Susceptibility to progressive *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection is regulated by loci on mouse chromosomes 1 and 9. **Infection and immunity**, v.80, n.12, p. 4167-76, 2012.

CHARLIER, C.; CHRETIEN, F.; BAUDRIMONT, M.; MORDELET, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **American Journal of Pathology**, v.166, p.421-32, 2005.

CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B., LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.85, n.2, p.182-8, 2011.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p. 599-607, 2003.

CORRÊA, N.M.; BUENO, F.; JÚNIOR, C.; FERNANDA, R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, 2005.

DALMORA, M.E.A.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v.222, p.45-55, 2001.

DAMASCENO, B.P.G.L., SILVA, J.A., OLIVEIRA, E.E., SILVEIRA, W.L.L., ARAÚJO, I.B., OLIVEIRA, A.G., EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.9-18, 2011.

DAMASCENO, B.P.G.L.; DOMINICI, V.A.; URBANO, I.A.; SILVA, J.A.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SILVA, A.K.A.; MEDEIROS, A.C.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.8, n.2, p.290-300, 2012.

DE BERNARDIS, F.; TACCONELLI, E.; MONDELLO, F.; CATALDO, A.; ARANCIA, S.; CAUDA, R.; CASSONE, A. Antiretroviral therapy with protease inhibitors decreases

virulence enzyme expression in vivo by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.41, n.1, p.27-34, 2004.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p.231-39, 2008.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; FILIPIC, S.; AGBABA, D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.433, n.1-2, p.25-33, 2012.

EL-HADIDY, G. N.; IBRAHIM, H. K.; MOHAMED, M. I.; EL-MILLIGI, M.F. Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: formulation and in vitro evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.38, n.1, p.64-72, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v.26, n.1, p.15-22, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M. FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; HAGEN, F.; GOVENDER, N.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S.R.; MARTINS, M.A.; MEIS, J.F.; MELHEM, M.S.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M.A.; SCHELL, W.A.; TRILLES, L.; KIDD, S.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.56, n.6, p.3107-13, 2012.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, n.5, p.306-313, 2012.

FANUN, M.; PAPADIMITRIOU, V.; XENAKIS, A. Characterization of cephalexin loaded nonionic microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.361, n. 1, p.115-21, 2011.

FERREIRA, I. C. F. R.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L. M.; QUEIROZ, M.-J. R. P. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophene series: a structure-activity evaluation study. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.14, n.23, p.5831-3, 2004.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C.; SILVA-JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorrubicina**. 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho, São Paulo. 2008.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; EGITO, E.S.; TERRUGI, C.H.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.; OLIVEIRA, A.G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.77, n.1, p.47-53, 2010.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI, C. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v.28, n.3, p.511-518, 2005.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v.20, n.1, p.338-44, 2013.

GOEBEL, A. S. B.; NEUBERT, R. H. H.; WOHLRAB, J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n.1-2, p.159-68, 2011.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use – A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.45, n.1, p.100-107, 2011.

GUERRA, C. R.; ISHIDA, K.; NUCCI, M.; ROZENTAL, S. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.5, p.582-90, 2012.

GUERRERO, A.; JAIN, N.; GOLDMAN, D.L.; FRIES, B.C. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.152, n.1, p.3-9, 2006.

GÜNGÖR, S.; ERDAL, M.S.; AKSU, B. New Formulation Strategies in Topical Antifungal Therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, v.3, n.1, p.56-65, 2013.

HASHEM, F. M.; SHAKER, D. S.; GHORAB, M. K.; NASR, M.; ISMAIL, A. Formulation, characterization, and clinical evaluation of microemulsion containing clotrimazole for topical delivery. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n.3, p.879-86, 2011.

HAST, M.A; NICHOLS, C.B.; ARMSTRONG, S.; KELLY, S.M.; HELLINGA, H.W.; ALSPAUGH, J.A.; BEESE, L.S. Structures of *Cryptococcus neoformans* protein farnesyltransferase reveal strategies for developing inhibitors that target fungal pathogens. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n.40, p.35149-62, 2011.

HAY, R. Superficial fungal infections. **Medicine**, v.37, n.11, p.610-612, 2009.

HESSE, S.; PERSPICACE, E.; KIRSCH, G. Microwave-assisted synthesis of 2-aminothiophene-3-carboxylic acid derivatives, 3H-thieno[2,3-d]pyrimidin-4-one and 4-chlorothieno[2,3-d]pyrimidine. **Tetrahedron Letters**, v.48, p.5261-5264, 2007.

HEUSCHKEL, S.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R. H. H. Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, n.3, p.552-60, 2009.

HICKEY, S.; HAGAN, S. A.; KUDRYASHOV, E.; BUCKIN, V. Analysis of phase diagram and microstructural transitions in an ethyl oleate/water/Tween 80/Span 20 microemulsion system using high-resolution ultrasonic spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.388, p.213–222, 2010.

JADHAV, K. R.; SHETYE, S. L.; KADAM, V. J. Design and Evaluation of Micro emulsion Based Drug Delivery System. **Asian Journal Of Experimental Biological Sciences**, v.1, n.3, p.580-591, 2010.

JAIN, N.; GUERRERO, A.; FRIES, B.C. Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v.6, n.4, p.480–488, 2006.

JUNYAPRASERT, V. B.; BOONME, P.; SONGKRO, S.; KRAUEL, K.; RADES, T. Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.3, p.288-298, 2007.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.20, n.19, p.5678-98, 2012.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; SARAF, SWARNLATA; SARAF, SHAILENDRA. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Controlled Release**, v.168, n.1, p.50-60, 2013.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, S77–98, 2002.

KRONSTAD, J.; SAIKIA, S.; NIELSON, E.D.; KRETSCHMER, M.J.; WONHEE HU, G.; GEDDES, J.M.H.; GRIFFITHS, E.J.; CHOI, J.; CADIEUX, B.; CAZA, M.; ATTARIAN, R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryotic cell**, v.11, n.2, p.109-18, 2012.

KROUPA, A. Modelling of phase diagrams and thermodynamic properties using Calphad method – Development of thermodynamic databases. **Computational Materials Science**, v.66, p.3-13, 2013.

LAWRENCE, M. J.; RESS, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.

LEITE, F.S.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A.C.; CASAS, C.; HERRERO, E.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RODRIGUEZ-TUDELLA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v.13, p.457-467, 2011.

LEONGSON, K.; COUSINEAU-CÔTÉ, V.; GOUPIL, M.; AUMONT, F.; SÉNÉCHAL, S.; GABOURY, L.; JOLICOEUR, P.; KRONSTAD, J.W.; REPENTIGNY, L. Altered Immune Response Differentially Enhances Susceptibility to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Infection in Mice Expressing the HIV-1 Transgene. **Infection and immunity**, v.81, n.4, p.1100-1113, 2013.

LEWIS, R. E.; VIALE, P.; KONTOYIANNIS, D. P. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. **Virulence**, v.3, n. 4, p.368-76, 2012.

LI, G.; FAN, Y.; LI, X. WANG, X.; LI, Y.; LIU, Y.; LI, M. In vitro and in vivo evaluation of a simple microemulsion formulation for propofol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.425, n.1-2, p. 53-61, 2012.

LIMA, A.A.N.; SOARES SOBRINHO, J.L.; CORREA JUNIOR, R.A.C.; ROLIM NETO P.J. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.27, p.789-797, 2008.

LIN, C., CHEN, L. Comparison of fuel properties and emission characteristics of two- and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically homogenizing emulsification methods. **Fuel**, v.87, n.10–11, p. 2154–2161, 2008.

MARIN, N.; LUIZA, V.L.; CASTRO, C.G.S.; SANTOS, S.M. Assistência farmacêutica para gerentes municipais. Rio de Janeiro: **OPAS/OMS**; 2003.

MATOS, C.S.; SOUZA ANDRADE, A.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.31, n.7, p.1647-52, 2012.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **Journal of infection and chemotherapy**, v.18, n.1, p.1-9, 2012.

MENDONÇA JUNIOR, F.J.B.; LIMA-NETO, R.G.; OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; CRUZ, R.M.D.; ARAÚJO, R.S.A.; NEVES, R.P. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, n.8, p.1492-1499, 2011.

MEOTTI, F.C.; SILVA, D.O.; SANTOS, A.R.S.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.15, n.1, p.37-44, 2003.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G.G.; COOPER, R.E. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, V.18, n.2, p.113-120, 2003.



MOHAMMAD, A. I. C.; SATYENDRA, D.; APURBA, T.; PATEL, M.; MONIKA, K.; GIRISH, K.; MOHAN, S.; SARAVANAN, J. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. **Hygeia Journal for Drugs and Medicines**, v.4, n.1, p.112-118, 2012.

MONTANARY, C.A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova**, v.18, n.1, p. 56-64. 1995.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MOURA, R.O; OLIVEIRA, J.G.B.; CRUZ, R.M. D.; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v.17, n.3, p.2298-315, 2012.

NADAGIR, S.D.; CHUNCHANUR, S.K.; HALES, L.H.; YASMEEN, K.; CHANDRASEKHAR, M.R.; PATIL, B.S. Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-albicans species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.39, n.3, p.492-5, 2008.

NAOUI, W.; BOLZINGER, M.A.; FENET, B.; PELLETIER, J.; VALOUR, J.P.; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. **Pharmaceutical research**, v.28, n.7, p.1683-95, 2011.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J.W.L.; GRECO, K.V.; MENEZES, F.G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13(Sup), p.689-96, 2008.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista eletrônica de enfermagem**, v.10, n.1, 2008.

OLIVEIRA, A., G.; SCARPA, M., V.; CORREA, M., A.; CERA, L., F., F., R.; FORMARIZ, T., P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1, p.131-138, 2004.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.120, p.1-3, 2007.

PEIRA, E.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, C.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Positively charged microemulsions for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v.346, n.1-2, p.119-23, 2007.

PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-9, 2008.

PINTO, E.; QUEIROZ, M.J.R.P.; VALE-SILVA, L.A.; OLIVEIRA, J.F.; BEGOUIN, A.; BEGOUIN, J.M.; KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8172-7, 2008.

PURANAJOTI, P.R.; PATIL, T.; SHETH, P.D.; BOMMAREDDY, G.P.; EGBARIA, D.K. Design and Development of Topical Microemulsion for Poorly Water-Soluble Antifungal Agents. **The Journal of Applied Research**, v.2, n.1, 2002.

QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R.; DE GAETANO, Y.; KIRSCH, G.; CALHELHA, R.C.; ESTEVINHO, L.M. Synthesis and antimicrobial activity studies of ortho-chlorodiarylamines and heteroaromatic tetracyclic systems in the benzo[b]thiophene series. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.14, n.20, p.6827-31, 2006.

RAM, V.J.; GOEL, A.; SHUKLA, P.K.; KAPIL, A. Synthesis of thiophenes and thieno[3,2-c]pyran-4-ones as antileishmanial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.7, n.24, p.3101-06, 1997.

ROSSETI, F. C. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

RYU, C.K.; LEE, S.K.; HAN, J.Y.; Jung, O.J.; Lee, J. Y.; Jeong, S.H. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[b]thiophenes. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.15, n.10, p.2617-20, 2005.

SAHLE, F.F.; METZ, H.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.1, p.139-50, 2012.

SAKAMOTO, J.H.; VAN DE VEN, A.L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R.E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S.I.; DE ROSA, E.; MARTINEZ, J.O.; SMID, C.A.; BUCHANAN, R.M.; LEE, S.Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOTTI, E.; LIU, X.; DECUZZI, P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological research**, v.62, p.57-89, 2010.

SARDI, J.C.O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J.S. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v.62, n.1, p. 10-24, 2013.

SARRAZIN, P.; CHAUSSY, D.; VURTH, L.; STEPHAN, O.; BENEVENTI, D. Surfactant (TTAB) role in the preparation of 2,7-poly(9,9-dialkylfluorene-co-fluorene)nanoparticles by miniemulsions. **Langmuir**, v. 25, p.6745-52, 2009.

SCHMIDTS, T.; DOBLERA, D.; HOFFA, S.V.D.; SCHLUPPA, P.; GARNB, H.; RUNKEL, F. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary

diagrams using the example of a microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.340, p.187-92, 2009.

SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: **Artliber**, 2006.

SCHWARZ, J.C.; WEIXELBAUM, A.; PAGITSCH, E. L.M.; RESCH, G.P.; VALENTA, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n.1-2, p.83-8, 2012.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; LIMA, E.O.; SILVA, M.S.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; MOURA, R.O.; OLIVEIRA, J.G.B.; CRUZ, R.M.D.; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v.17, n.3, p.2298-315, 2012.

SHAH, R.R.; MAGDUM, C.S.; PATIL, S.S.; NIAKWADE, N.S. Preparation and Evaluation of Aceclofenac Topical Microemulsion. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.9, n.1, p.5-11, 2010.

SHAO, L.C.; SHENG, C.Q.; ZHANG, W.N. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **YaoXue XueBao**, v.42, p.1129-1136, 2007.

SHARMA, G.; WILSON, K.; VAN DERWALLE, C.F.;SATTAR, N.; PETRIE, J.R.; KUMAR, R.M.N. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.76, p.159-69, 2010.

SHI, Y.; LUO, H.Q.; LI, N.B. Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe. **Spectrochimica Acta Part A**, v.78, p.1403-1407, 2011.

SHUKLA, A.; NEUBERT, R.H.H. Diffusion behavior of pharmaceutical O/W microemulsions studied by dynamic light scattering. **Colloid Polymer Science**, v.284, n.5,p.568-573, 2006.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v.61, n.3, p. 216-220, 2004.

SILVA, G.C.; MORAIS, W.A.; NETO, A.A.D.; DANTAS, T.N.C.; FONSECA, J.L.C. The relationship between rheology and dynamic light scattering for a xylene/water/ButOH/C12E9 microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.397, p.42-47, 2012.

SILVA, J. A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.C.G.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1389-1393, 2009a.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; SOUSA, C.E.M.; SANTANA, D.P.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.1, p.41-46, 2010.

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n.1, p.1-8. 2009b.

SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.376, p.133–39, 2012.

SOUSA, H.; RANGEL, C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1860-1870, 2009.

SOUZA, B.C.C.; OLIVEIRA, T.B.; AQUINO, T.M.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L.; LIMA, E.O.; GONÇALVES-SILVA, T.; MILITÃO, G.C.G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; MENDONÇA JUNIOR, F.J.B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta pharmaceutica**, v.62, n.2, p.221-36, 2012.

SRIDHAR, M.; RAO, R.M.; BABA, N.H.K.; KUMBHARE, R.M. Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters**, v.48, p.3171-3172, 2007.

SURENDIRAN, A.; SANDHIYA, S.; PRADHAN, S. C.; ADITHAN, C. Novel applications of nanotechnology in medicine. **Indian Journal of Medical Research**, v.130, n.6, p.689-701, 2009.

SURMAN, L. L. Potencialidades de Veículos Microemulsionados para Fotoprotetores Físicos. **Latin America Journal of Pharmacy**, v.28, p.133-140, 2009.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.16, n.5, p.461-521, 1999.

TONOMURA Y.; YAMAMOTO, E.; KONDO, C.; ITOH, A.; TSUCHIYA, N.; UEHARA, T.; BABAHUMAN, T. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: characterization of blood and urinary biochemistry and renal morphology in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v.28, p.293-330, 2009.

TSAI, Y.; LEE, K.; HUANG, Y.; HUANG, C.; WU, P. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p.257–262, 2010.

VAUTHIER, C.; COUVREUR, P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, p.223-234, 2007.

VECCHIARELLI, A.; MONARI, C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. **Mycopathologia**, v.173, p.375-386, 2012.

VYAS, T. K.; BABBAR, A.K.; SHARMA, R.K.; SINGH, S.; MISRA, A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsions of sumatriptan. **AAPS Pharmscitech**, v.7, n.1, p.E1-E9, 2008.

WENNERSTRÖM, H.; OLSSON, U. Microemulsions as model systems. **Comptes Rendus Chemie**, v.12, p.4-17, 2009.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.309-17, 2004.

XU, J.; KORLLING, K. W. Temperature dependence of rheological behavior of a metallic automotive waterborne basecoat. **Progress in Organic Coatings**, v.53, p.169-176, 2005.

ZAPF, A; BECK, R.; PLATZ, G.; HOFFMANN, H. Calcium surfactants: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 102, 349-380, 2003.

ZHANG, J.; HAN, B. Supercritical CO<sub>2</sub>-continuous microemulsions and CO<sub>2</sub>-expanded reverse microemulsions. **Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.531-36, 2009.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.1, p.34-44, 2011.

ZHAO, Y.G.; DING, W.; WEI, J. Preparation of a bis-demethoxy curcumin microemulsion based on pseudoternary phase diagrams and an orthogonal test analysis. **Journal of Pesticide Science**, v.36, p.248-251, 2011.

ZÜGE, L.C.B. **Estudo da inversão catastrófica e transicional de emulsões de óleo de soja com diferentes tensoativos**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2012.

*Apêndices*

---

APÊNDICE A - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS  
ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO EM  
SISTEMAS MICROEMULSIONADOS

**(Artigo aceito para publicação na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada)**

**Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados**

**Development and validation of analytical methodologies for measurement of a thiophene derivative in microemulsion systems**

Geovani Pereira Guimarães<sup>1</sup>, Yuri Basílio Gomes Patriota<sup>1</sup>, Natan Emanuél de Sobral e Silva<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Miranda de Sousa<sup>3</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior<sup>1,4</sup>, Davi Pereira de Santana<sup>3</sup>, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno<sup>1,2</sup>, José Alexsandro da Silva<sup>\*1,2</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Departamento de Farmácia, Campina Grande/PB.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus V, João Pessoa/PB, Brasil

Autor para correspondência:

**José Alexsandro da Silva**, e-mail: [alexuepb@pq.cnpq.br](mailto:alexuepb@pq.cnpq.br)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)

Rua Juvêncio Arruda, s/n - Bairro Universitário

CEP: 58429-600 – Campina Grande-PB, Brasil.



## RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo validar métodos por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o doseamento de um derivado do tiofeno, o 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, referido neste trabalho como 5CN05, e aplicá-los no doseamento da molécula em microemulsões. Os métodos propostos foram validados conforme a Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O fármaco 5CN05 foi detectado por UV em 387nm. O método espectrofotométrico validado mostrou-se seletivo, apresentando linearidade na faixa de 3 a 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998 e limites de detecção e quantificação de 0,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Para o método cromatográfico, observou-se linearidade na faixa de 0,1 a 3,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r = 0,99915$ , limites de detecção e quantificação de 0,07  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente. Para ambos os métodos, os parâmetros precisão, exatidão e robustez mostraram-se adequados para o uso pretendido. As metodologias propostas podem ser seguramente aplicadas para quantificação do 5CN05 em produtos farmacêuticos como microemulsões.

**Palavras-chave:** Microemulsão, derivado do tiofeno, validação espectrofotometria e por CLAE.

## ABSTRACT

### **Development and validation of analytical methodologies for measurement of a thiophene derivative in microemulsion systems**

This study aims to validate methods of spectrophotometry absorption in ultraviolet/visible (UV/VIS) and high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of a thiophene derivative, 2 - [(3,4-dichloro -benzylidene)-amino] -5,6-dihydro-4H-cyclopentyl-thiophene-3-carbonitrile referred in this study as 5CN05, and apply them to quantify the 5CN05 in microemulsions. The proposed methods were validated according to the Resolution RE 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The 5CN05 was detected by UV at 387nm. The validated spectrophotometric method proved to be selective, showing linearity in the range of 3-16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , correlation coefficient (r) of 0.9998 and limits of detection and quantification of 0.12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 0.41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively. For the chromatographic method, linearity was observed in the range 0.1 to 3.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r = 0.99915$ , limits of detection and quantification of 0.07  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 0.10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively. For both methods, the parameters precision, accuracy and robustness were adequate for the intended use. The proposed methodologies can be safely applied to quantify the 5CN05 in pharmaceuticals products as microemulsions.

**Keywords:** Microemulsion, thiophene derivative, validation spectrophotometry and HPLC.

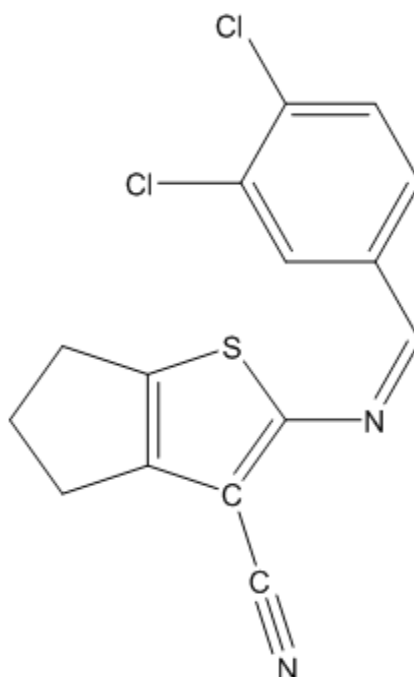
## INTRODUÇÃO

A emergente importância clínica das infecções fúngicas, juntamente à resistência a múltiplos fármacos antifúngicos e o pequeno número destes agentes terapêuticos disponíveis

no mercado torna necessária a descoberta de novas alternativas efetivas (Pinto et al., 2008; Ccahuana-Vasquez et al., 2007).

Os compostos heterocíclicos derivados do tiofeno apresentam várias atividades biológicas já comprovadas, entre as quais se podem destacar: antivirais (Bonini et al., 2004), analgésica, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e anestésica local (Mohammad et al., 2012), antibacterianas, herbicidas e, especialmente, antifúngicas principalmente contra espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*) e do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, e *A. flavus*) (Pinto et al., 2008).

Microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes formados a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um filme interfacial de tensoativos (Silva et al., 2009; Fanun, 2010), sendo geralmente formados pela combinação de diferentes componentes tais como óleo, água, tensoativos e co-tensoativos (Damasceno et al., 2011). As propriedades específicas dos sistemas microemulsionados relacionam-se principalmente à sua baixa tensão interfacial, grande área de interface, tamanho reduzido das gotículas e alta capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos, hidrossolúveis e anfifílicos (Fanun, 2010). Assim sendo, a utilização destes sistemas pode ser destinada ao desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados em fármacos dificilmente incorporados em formulações comuns devido ao seu alto grau lipofílico. Neste contexto se inserem os derivados do tiofeno, em especial o 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (Figura 1), que é o objeto de estudo desta pesquisa.



**Figura 1.** Estrutura química da molécula 5CN05.

Nesse sentido, pode-se afirmar que o desenvolvimento de metodologias analíticas é fundamental na avaliação quantitativa de um fármaco em uma formulação, bem como em estudos de solubilidade e estabilidade. Para que os resultados obtidos por um método possam ser considerados confiáveis e reprodutíveis faz-se necessária a determinação experimental de alguns parâmetros, sendo este processo conhecido como validação (Silva et al., 2010).

As informações geradas durante a validação de um método analítico devem demonstrar que o mesmo preenche uma série de requisitos que permitam a sua aplicação analítica, ressaltando a confiabilidade dos seus resultados. Os testes devem comprovar, por exemplo, que o método demonstre especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas para a análise proposta (ICH, 2005; Brasil, 2003).

Por conseguinte, e devido a inexistência de métodos normalizados ou farmacopéicos para avaliação do 5CN05 em produtos farmacêuticos faz-se necessário desenvolver e validar metodologias analíticas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) e

por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação desta molécula em formulação de microemulsão para aplicação tópica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Materiais**

O derivado tiofênico 5CN05 foi obtido e sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba. Para formulação da microemulsão foram utilizados os componentes miristato de isopropila (Via Farma, Brasil – fase oleosa, 5,9% m/m), PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (LAS<sup>®</sup>, Brasquim, Brasil – tensoativo, 35,3% m/m), Poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleique<sup>®</sup>, Gattefossé, França – tensoativo, 17,6% m/m) e água obtida em sistema purificador de água OS10 LX (Gehaka, Brasil – fase aquosa, 41,2% m/m). No desenvolvimento dos métodos analíticos foram utilizados: clorofórmio P.A. (F. Maia, Brasil), acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, EUA) e acetonitrila UV/HPLC (Vetec, Brasil).

### **Instrumentação e condições analíticas**

Utilizou-se neste estudo um espectrofotômetro com detector UV-VIS, modelo UV MINI - 1240 (Shimadzu, Japão). Inicialmente realizou-se uma varredura espectrofotométrica de soluções do 5CN05 na faixa de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 600 nm. Em seguida, determinou-se o valor de  $\lambda$  onde a solução apresentou maior absorbância, sendo então considerado como comprimento de onda adequado para quantificação do 5CN05.

Para o método cromatográfico, as análises foram realizadas utilizando-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu com detector de UV/VIS (SPD 10Avvp), apresentando forno de coluna (CTO 10Avp), mostruário automático (SIL 10ADvp), controlador do sistema (LCC 10Avp) e duas bombas (LC 10ADvp). Como fase estacionária foi utilizada coluna analítica tipo C18 150 x 4,6  $\mu$ m Gemini (Phenomenex), acoplada a uma

pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex), com temperatura do forno ajustada em 40 °C. Como fase móvel, utilizou-se mistura de acetonitrila e água (95:5, v/v), sendo bombeada a um fluxo de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com volume de amostras de 30  $\mu\text{L}$ .

### **Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos**

As validações das metodologias analíticas foram conduzidas segundo as exigências da Resolução da ANVISA RE n° 899 (Brasil, 2003), a qual determina que os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação (intervalo), precisão, exatidão e robustez, limite de detecção e de quantificação devem ser analisados.

O desenvolvimento dos métodos teve início com a realização de uma varredura espectrofotométrica na região o UV/VIS, em uma faixa de 300 a 600 nm do 5CN05 puro, objetivando-se identificar em qual comprimento de onda o fármaco apresentava valores de absorvância máximos.

A seletividade do método espectrofotométrico foi determinada comparando-se as curvas espectrais obtidas através das leituras de diluições individuais de cada sistema em acetonitrila, comparando o comportamento da matriz isenta da substância de interesse (ME-Branca), e a matriz contendo o 5CN05 (ME-5CN05,  $C = 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A seletividade do método cromatográfico foi determinada pela avaliação da interferência dos componentes dos sistemas utilizados para carreamento do fármaco (excipientes da formulação de ME). Para tanto, foram analisadas e comparadas amostras das formulações ME-Branca, ME-5CN05 ( $C = 6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e amostras de solução do fármaco em acetonitrila ( $C = 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A linearidade e a faixa de aplicação do método espectrofotométrico foi verificada a partir de solução padrão ( $n=3$ ) de  $1,0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtida pela dissolução de 10 mg do 5CN05 em 10 mL de clorofórmio. Em seguida, diluiu-se 800  $\mu\text{L}$  desta solução em 10 mL de acetonitrila, obtendo-se uma solução (S1) com concentração de  $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A partir desta solução (S1),

foram feitas diluições de forma a obter soluções de 3; 5; 7; 9; 10; 11; 12; 14; 15 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do fármaco em acetonitrila.

O parâmetro linearidade, para o método cromatográfico, foi determinado partindo da análise de três curvas analíticas em 7 níveis de concentração em uma faixa de 0,1000 a 3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para a obtenção de cada curva, uma solução padrão (SP) de 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 10 mg do 5CN05 em 10 mL de clorofórmio. Em seguida, diluiu-se 200  $\mu\text{L}$  da SP em 10 mL de acetonitrila, obtendo-se uma solução (S1) com concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir desta solução (S1), foram feitas diluições de forma a obter soluções de 0,1000; 0,1500; 0,3000; 0,5000; 1,0; 2,0 e 3,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A linearidade, tanto do método espectrofotométrico quanto cromatográfico, foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações  $\text{LD} = \text{DP} \times 3/\text{IC}$  e  $\text{LQ} = \text{DP} \times 10/\text{IC}$ , em que DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com três curvas analíticas e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas (Brasil, 2003).

A precisão do método espectrofotométrico foi determinada através da leitura em sextuplicata de diluições da solução padrão de 1,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  na concentração do ponto médio da curva de calibração (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Já a precisão do método cromatográfico foi determinada, também, por análises em sextuplicatas na concentração do ponto médio da curva (1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em ambos os casos, a precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas), por analistas distintos, sendo expressas como coeficiente de variação (CV%) segundo a equação  $\text{CV} = \text{DP}/\text{CMD}$ , em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

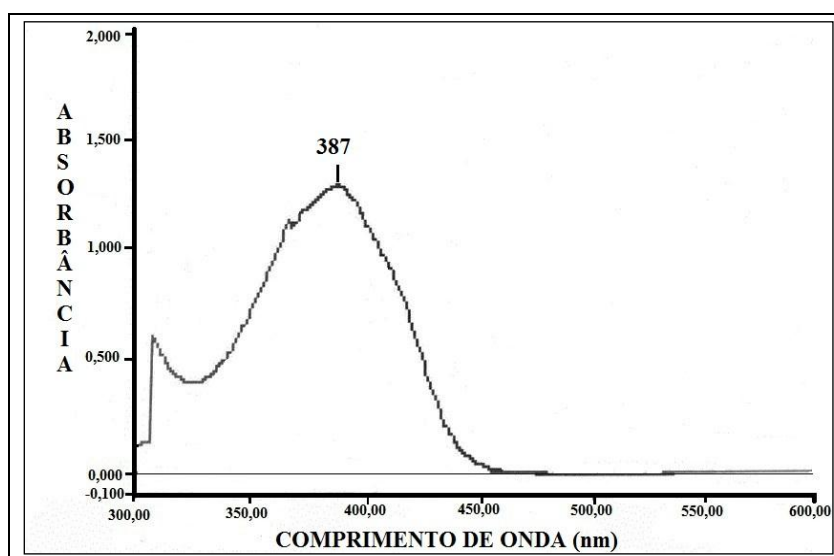
A exatidão dos métodos espectrofotométrico e do método cromatográfico foi determinada por análises em triplicata de três soluções do fármaco em diferentes faixas de concentração, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração,

respectivamente 5; 10 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o método espectrofotométrico e 0,5; 1,0 e 1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o método cromatográfico. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A robustez dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico foram observadas mediante variações ocasionadas pela marca do solvente acetonitrila adquiridos por diferentes fornecedores e diferentes equipamentos (método espectrofotométrico) e a temperatura do forno da coluna (25 e 40 °C) para o método cromatográfico.

## RESULTADOS

A varredura espectrofotométrica, 300-600 nm (Figura 2), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que a 5CN05 apresentou pico máximo de absorvância em 387 nm, cujo valor foi definido para utilização no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos tanto por espectrofotometria quanto por CLAE.

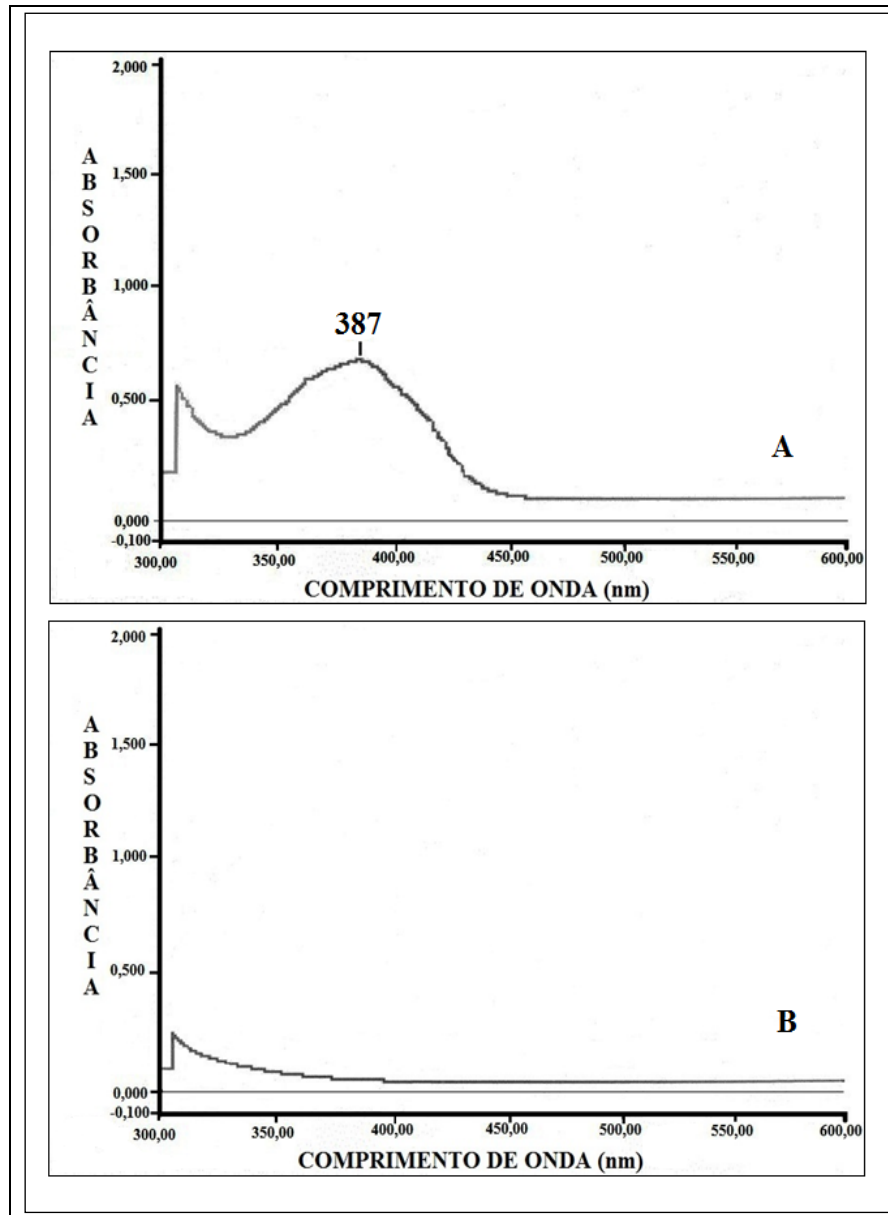


**Figura 2.** Varredura espectrofotométrica da solução do 5CN05 (300 a 600 nm, C = 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A seletividade do método espectrofotométrico foi o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, na qual foi observado que a ME-

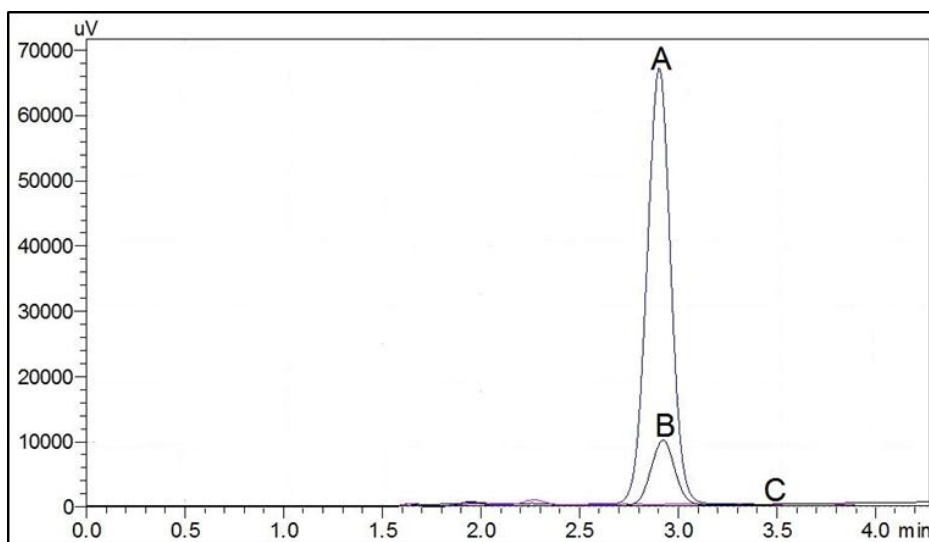


5CN05 apresentou pico de absorção no comprimento de onda de 387 nm, o mesmo não acontecendo com a formulação ME-Branca (Figura 3).



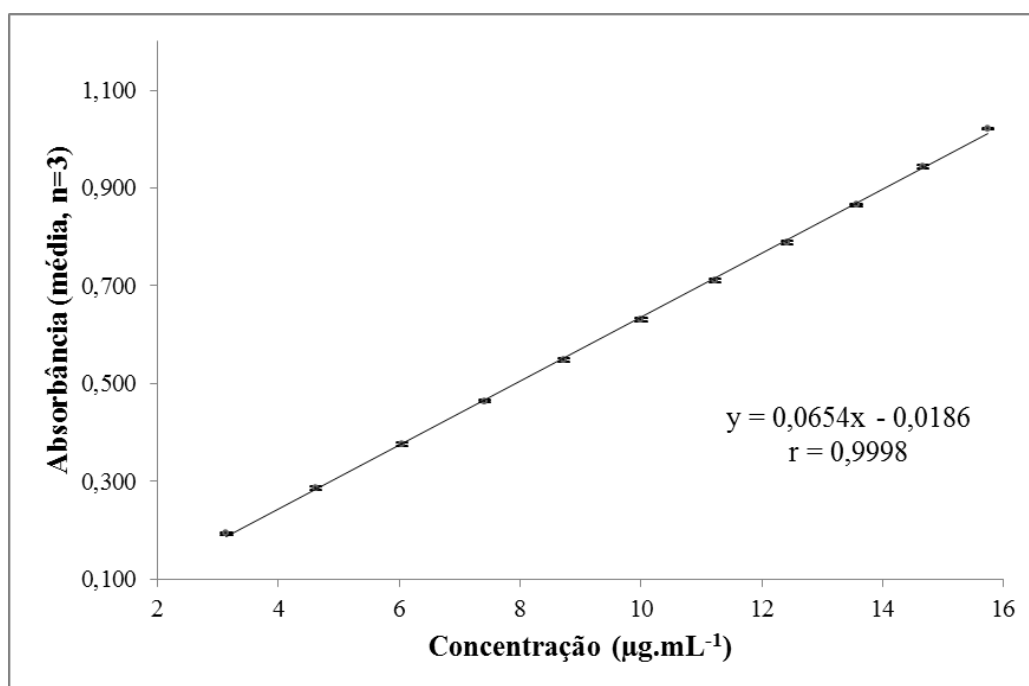
**Figura 3.** Varredura espectrofotométrica das amostras ME-5CN05 (A) e ME-Branca (B) (300 a 600 nm,  $C = 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

O método cromatográfico também demonstrou seletividade, uma vez que no tempo de retenção encontrado para o fármaco (2,9 minutos) não foram evidenciados picos interferentes relacionados aos componentes da formulação com um tempo de corrida de 4 minutos conforme observado na Figura 4.



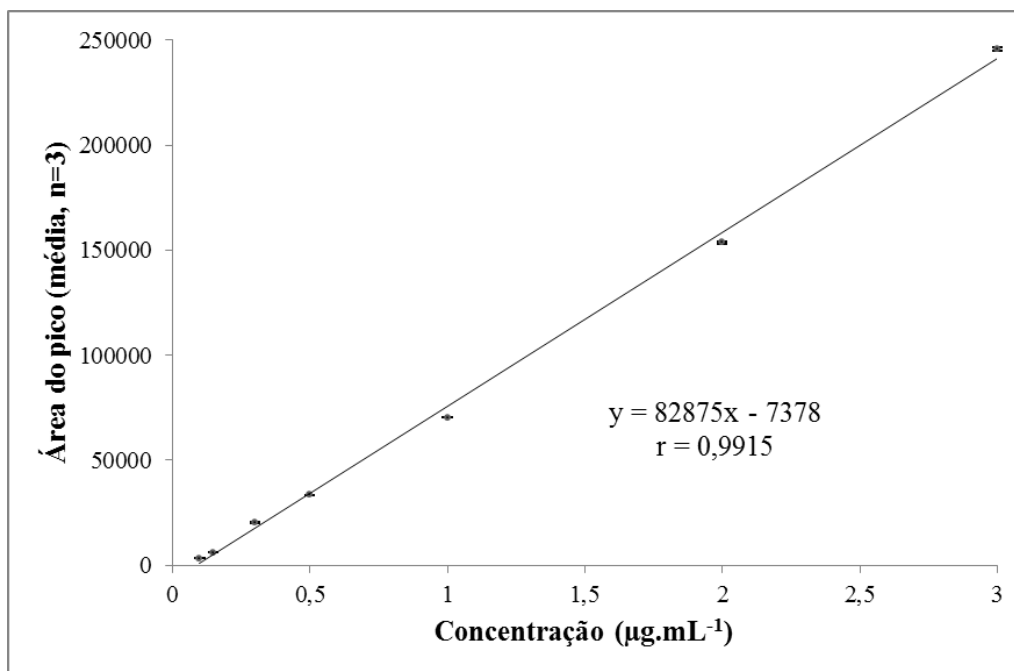
**Figura 4.** Representação do cromatograma da ME-5CN05 ( $C = 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (A), solução 5CN05 ( $C = 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (B) e ME-Branca (C) (Fase móvel: acetonitrila e água 95:5, v/v).

O método proposto por espectrofotometria apresentou linearidade em uma faixa de 3 a  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva analítica (Figura 5) pôde ser descrita através da equação  $y = 0,0654x - 0,0186$  obtidas pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9998. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de  $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,41 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 5.** Curva analítica para solução de 5CN05 utilizando o método espectrofotométrico.

O método cromatográfico, por sua vez, apresentou linearidade em uma faixa de 0,1 a 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e sua curva analítica (Figura 6) apresentou como equação  $y = 82875x - 7378$  e coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,99915. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,07  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 0,10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 6.** Curva analítica para solução de 5CN05 utilizando o método cromatográfico.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os dados obtidos durante a determinação dos parâmetros precisão e exatidão dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico, respectivamente.

**Tabela 1.** Valores correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) e Exatidão (n=3) do método espectrofotométrico validado.

Parâmetro	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
<b>Precisão</b>				
Repetibilidade	10,00	$9,86 \pm 0,005$	0,87	98,59
Precisão intermediária				
Analista 1	10,00	$10,27 \pm 0,006$	0,90	102,74
Analista 2	10,00	$10,08 \pm 0,008$	1,23	100,83
<b>Exatidão</b>				
Nível Baixo	5,00	$4,66 \pm 0,003$	0,93	93,15
Nível Médio	10,00	$9,86 \pm 0,005$	0,79	98,61
Nível Alto	15,00	$14,71 \pm 0,004$	0,44	98,09

**Tabela 2.** Valores correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) e Exatidão (n=3) do método cromatográfico validado.

Parâmetro	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
<b>Precisão</b>				
Repetibilidade	1,00	$1,05 \pm 0,005$	0,49	105,00
Precisão intermediária				
Analista 1	1,00	$1,04 \pm 0,005$	0,56	103,40
Analista 2	1,00	$1,07 \pm 0,011$	1,06	107,08
<b>Exatidão</b>				
Nível Baixo	0,50	$0,50 \pm 0,002$	0,44	100,74
Nível Médio	1,00	$1,02 \pm 0,006$	0,58	102,09
Nível Alto	1,50	$1,51 \pm 0,003$	0,21	100,67

Para ambos os métodos, os valores de CV(%) obtidos durante a avaliação da precisão foram inferiores a 5,0%. Na determinação da exatidão, demonstrou-se proximidade entre os valores de concentração obtidos pelos métodos e os seus valores teóricos.

A Tabela 3 mostra os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método espectrofotométrico. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções de leitura

utilizando acetonitrila proveniente de diferentes fornecedores (F1: Vetec, lote 110738; F2 : J.T. Baker, lote K04C55); leitura das soluções em diferentes espectrofotômetros (E1: modelo UV Mini 1240, Shimadzu; E2: modelo SP-2000UV, Hangzhou Chincan). Foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em triplicata, em meio às variações realizadas.

**Tabela 3.** Valores correspondentes a determinação da robustez do método espectrofotométrico validado (n=3).

Modificação	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	10,00	$9,86 \pm 0,107$	1,08	98,56
B	10,00	$10,21 \pm 0,092$	0,90	102,13
C	10,00	$10,50 \pm 0,192$	1,82	104,98

Legenda: A = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1); B = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 2); C = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1, equipamento 2).

Constatou-se para o método cromatográfico que o mesmo também apresentara robustez intrínseca, uma vez que ao analisar amostras na concentração de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em triplicata e em diferentes condições (tipo de solvente, temperatura do forno, fabricante do solvente), as respostas mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela legislação. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores correspondentes a determinação da robustez do método cromatográfico validado (n=3).

Modificação	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	1,00	1,009	0,19	100,88
B	1,00	1,012	0,65	101,22
C	1,00	1,011	0,40	101,10
D	1,00	1,028	0,94	102,80

Legenda: A = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1), temperatura do forno  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; B = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1), temperatura do forno  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; C = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 2), temperatura do forno  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; D = Solução 5CN05 em metanol.

## DISCUSSÃO

A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico. Este parâmetro deve ser avaliado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (Silva et al., 2010). A legislação preconiza que o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz sem o fármaco apresentar absorvância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (ICH, 2005; Brasil, 2003). A determinação deste parâmetro teve por objetivo avaliar o grau de interferência dos componentes da formulação estudada e impurezas, bem como outros compostos de propriedades similares que poderiam estar presentes, uma vez que alguns excipientes podem sofrer degradação e gerar compostos que não são observados inicialmente, podendo confundir com o analito de interesse (Ribani et al., 2004). As metodologias propostas para quantificação do 5CN05 demonstraram ser seletivas, uma vez que não houve interferência dos componentes nos pontos específicos de detecção do fármaco (comprimento de onda de 387 nm para o método espectrofotométrico e tempo de retenção de 2,9 minutos para o método cromatográfico).

O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade e linearidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Nunes et al., 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90. Sendo assim, o valor de  $r$  obtido para a análise do 5CN05 em ambos os métodos encontra-se dentro das conformidades recomendadas. Nas condições estudadas demonstrou-se que os resultados de exatidão e precisão para ambos os métodos desenvolvidos e validados também estão de acordo com o preconizado.

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em detrimento a pequenas variações. Considera-se um método como sendo robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros. As modificações propostas na determinação da robustez refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (Ribani et al., 2004). No presente estudo, tanto o método espectrofotométrico quanto o cromatográfico demonstraram possuir robustez intrínseca uma vez que a resposta analítica para ambos métodos mostrou-se dentro das especificações exigidas mesmo com as modificações propostas.

Os métodos analíticos propostos neste trabalho foram desenvolvidos a fim de disponibilizar procedimentos analíticos para quantificação do 5CN05 em formas farmacêuticas/sistemas de liberação como as microemulsões devido à inexistência de métodos oficiais para a referida molécula. Os métodos propostos podem ser considerados intercambiáveis, uma vez que as amostras aplicadas na validação de ambos foi a mesma. Entretanto, as metodologias apresentam faixas de linearidade distintas e complementares. O método cromatográfico, devido a sua maior sensibilidade e seletividade, pode servir de base para quantificação do 5CN05 em testes de permeação cutânea e cinéticas de liberação, desde que estudado nas condições adequadas e específicas dos referidos testes. Para testes mais simples, como o doseamento, a metodologia por espectrofotometria pode ser aplicada devido a sua rapidez e baixo custo.

Em conclusão, os mesmos demonstraram estar em conformidade com as especificações recomendadas pela legislação. Os parâmetros estudados garantiram rapidez, seletividade, linearidade, exatidão e precisão, apresentando-se, portanto, validados conforme a RE 899/2003 da ANVISA.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado ao discente Geovani Pereira Guimarães, bem como pelo suporte financeiro proveniente do edital PROPESQ-UEPB nº 02/2010.

## REFERÊNCIAS

Bonini C, Chiummiento L, De Bonis M, Funicello M, Lupattelli P. Synthesis of a first thiophene containing analog of the HIV protease inhibitor nelfinavir. *Tetrahedron Lett* 2004; 45(13): 2787-2799.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, nº 104, 2 de junho de 2003. Seção 1. p. 56-9.

Ccahuana-Vasquez RA, Santos SSF, Koga-Ito CY, Jorge AC. Atividade antimicrobiana da *Uncaria tomentosa* sobre patógenos da cavidade bucal humana. *Braz Oral Res* 2007; 21(1): 46-50.

Damasceno BPGL, Silva JA, Oliveira EE, Silveira WLL, Araújo IB, Oliveira AG, Egito EST. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2011; 32(1): 9-18.

Fanun M. Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil. *J Colloid Interface Sci* 2010; 343: 496–503.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008. Brasil: *INMETRO*; 2003.

International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Geneva: *ICH*; 2005.



Mohammad AIC, Satyendra D, Apurba T, Patel M, Monika K, Girish K, Mohan S, Saravanan J. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. *Hygeia J D Med* 2012; 4(1): 112-8.

Nunes RS, Senna BAA, Silva JA, Santana DP. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. *Rev Bras Farm* 2005; 86(3): 87-91.

Pinto E, Queiroz MJ, Vale-Silva LA, Oliveira JF, Begouin A, Begouin JM, Girsch G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(17): 8172-8177.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004; 27(5): 771-780.

Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito, EST. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova* 2009; 32(6): 1389-1393.

Silva JA, Bedor DCG, Sousa CEM, Santana DP, Egito EST Oliveira. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2010;31(1):41-46 .



ANEXO A – CARTA DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO  
“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO EM SISTEMAS  
MICROEMULSIONADOS” NA REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E  
APLICADA.



Revista de Ciências  
Farmacêuticas  
Básica e Aplicada

*Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*

Araraquara, 03 de julho de 2013.

Ref. RCFBA-2881-062/2013

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE UM DERIVADO TIOFÊNICO EM SISTEMAS  
MICROEMULSIONADOS,**

De autoria de **JOSÉ ALEXSANDRO SILVA, GEOVANI PEREIRA GUIMARÃES, YURI  
BASÍLIO GOMES PATRIOTA, NATAN EMANUELL DE SOBRAL SILVA, CARLOS  
EDUARDO MIRANDA SOUSA, FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIOR,  
DAVI PEREIRA SANTANA e BOLÍVAR PONCIANO GOULART DE LIMA  
DAMASCENO**, foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e  
Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

**Eliana Aparecida Varanda**  
Editora Chefe

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. José Alexsandro da Silva**

ANEXO B – CARTA DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO “ANTIFUNGAL  
ACTIVITY OF TOPICAL MICROEMULSION CONTAINING A THIOPHENE-  
DERIVATIVE” NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY.

De: "pessoajr@usp.br" <pessoajr@usp.br>  
Para: alexuepb@yahoo.com.br; alexuepb@yahoo.com.br  
Enviadas: Quinta-feira, 25 de Abril de 2013 17:11  
Assunto: Brazilian Journal of Microbiology - Decision on Manuscript ID BJM-2013-0381

25-Apr-2013

Dear Dr. Silva:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative" in its current form for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Microbiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Adalberto Junior  
Editor-in-Chief, Brazilian Journal of Microbiology  
pessoajr@usp.br

ANEXO C – ANTIFUNGAL ACTIVITY OF TOPICAL MICROEMULSION  
CONTAINING A THIOPHENE-DERIVATIVE  
**(Artigo aceito para publicação pela revista Brazilian Journal of Microbiology)**



**Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Microbiology</i>
Manuscript ID:	BJM-2013-0381
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	11-Apr-2013
Complete List of Authors:	Guimarães, Geovani; State University of Paraíba, Department of Pharmacy Reis, Mysrayn; State University of Paraíba, Department of Pharmacy Silva, Dayanne; State University of Paraíba, Department of Pharmacy Mendonça Junior, Francisco; State University of Paraíba, Biological Science Department Converti, Attilio; Genova University, Damasceno, Bolivar; State University of Paraíba, Department of Pharmacy Silva, José; State University of Paraíba, Department of Pharmacy
Keyword:	Antifungal susceptibility, Microemulsion, Thiophene derivatives, Cryptococcus neoformans
Section:	Medical Microbiology: Fungal Pathogenesis

SCHOLARONE™  
Manuscripts



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1           **Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative**

2           Geovani Pereira Guimarães<sup>1</sup>, Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis<sup>2</sup>, Dayanne Tomaz  
3           Casimiro da Silva<sup>2</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior<sup>1,3</sup>, Atílio Converti<sup>4</sup>,  
4           Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno<sup>1,2</sup>, José Alessandro da Silva<sup>\*1,2</sup>.

5           <sup>1</sup>Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Rua  
6           Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, 58429-600, Campina Grande, Paraíba,  
7           Brazil.

8           <sup>2</sup>Department of Pharmacy, State University of Paraíba, 58429-600, Campina Grande,  
9           Paraíba, Brazil.

10           <sup>3</sup>Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, Biological Science Department, State  
11           University of Paraíba, 58020-540, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

12           <sup>4</sup>Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Chemical Engineering  
13           Pole, Genoa University, Via Opera Pia 15, 16145, Genova, Italy.

14  
15  
16  
17  
18           **\*Corresponding author:** José Alessandro da Silva

19           **Mailing Address:** Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, State University of  
20           Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, S/N - Bairro Universitário, CEP 58429-600, Campina  
21           Grande, Paraíba, Brazil. Telephone: (+55 83) 9131-8427 / 3315-3300 (Branch line:  
22           3516), E-mail: alexuepb@pq.cnpq.br

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

25 **ABSTRACT**

26 Fungal infections have become a major problem of worldwide concern. Yeasts  
27 belonging to the *Candida* genus and the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*  
28 are responsible for different clinical manifestations, especially in immunocompromised  
29 patients. Antifungal therapies are currently based on a few chemotherapeutic agents that  
30 have problems related to effectiveness and resistance profiles. Microemulsions are  
31 isotropic, thermodynamically stable transparent systems of oil, water and surfactant that  
32 can improve the solubilization of lipophilic drugs. Taking into account the need for  
33 more effective and less toxic drugs along with the potential of thiophene derivatives as  
34 inhibitors of pathogenic fungi growth, this study aimed to evaluate the antifungal  
35 activity of a thiophene derivative (5CN05) embedded in a microemulsion (ME). The  
36 minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution  
37 method using amphotericin B as a control. The formulations tested (ME- blank and ME-  
38 5CN05) showed physico-chemical properties that would allow their use by the topical  
39 route. 5CN05 as such exhibited moderate or weak antifungal activity against *Candida*  
40 species (MIC = 270-540  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and good activity against *C. neoformans* (MIC = 17  
41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). *Candida* species were susceptible to ME-5CN05 (70-140  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), but *C.*  
42 *neoformans* was much more, presenting a MIC value of 2.2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The results of this  
43 work proved promising for the pharmaceutical industry, because they suggest an  
44 alternative therapy against *C. neoformans*.

45 **Key words:** antifungal susceptibility; *Cryptococcus neoformans*; microemulsion;  
46 thiophene derivatives.

47  
48

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### 49 Introduction

50 Fungal infections have become an issue of great concern around the world; it  
51 was estimated that over 40 million people do in fact suffer fungal infections both in  
52 developed and in developing countries (14). The incidence and prevalence of invasive  
53 fungal infections have increased since the 1980s, especially in immunocompromised  
54 patients and those hospitalized with serious underlying diseases (9).

55 *Candida* yeasts are microorganisms belonging to the normal microbiota of healthy  
56 individuals, mainly in the oral mucosa, the gastrointestinal tract and the female  
57 genitourinary tract (25). However, these fungi are responsible for different clinical  
58 manifestations, especially in immunocompromised patients, ranging from skin and  
59 mucous infections to systemic infections (23). Their importance comes from the high  
60 frequency with which they colonize and infect the human host (6), being the fourth most  
61 common pathogens associated with cases of nosocomial infection (30).

62 *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated fungus capable of causing infections  
63 in immunocompromised patients (2, 12). Inhalation of its basidiospores or cells present  
64 in the environment can result in lung infection and its subsequent spread to the central  
65 nervous system, causing meningoencephalitis, recognized as one of the most important  
66 opportunistic infections in patients with HIV with a worldwide incidence of  
67 approximately 957,000 cases per year (18).

68 Conventional treatments of fungal diseases are currently based on a few  
69 chemotherapeutic agents such as azoles and polyenes, which have serious problems  
70 related to effectiveness, activity spectrum, toxicity, low power and inadequate  
71 pharmacokinetics (24). Moreover, the occurrence of microbial resistance to  
72 antimicrobial agents is shown to be a growing public health problem worldwide and the