



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

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICROEMULSÃO CONTENDO DERIVADO
TIOFÊNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL**

CAMPINA GRANDE – PB

2015

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICROEMULSÃO CONTENDO DERIVADO
TIOFÊNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL**

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. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE – PB

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na 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.

P314d Patriota, Yuri Basilio Gomes.

Desenvolvimento, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana in vitro de microemulsão contendo derivado tiofênico para administração oral [manuscrito] / Yuri Basilio Gomes Patriota. - 2015.
57 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".

1. Microemulsões. 2. Derivado tiofênico. 3. Caracterização físico-química. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.45

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *in vitro* DE MICROEMULSÃO CONTENDO DERIVADO
TIOFÊNICO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL**

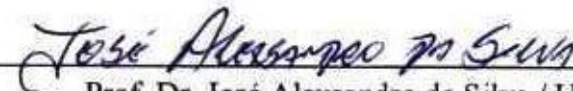
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

APROVADO EM 31 / 08 / 2015

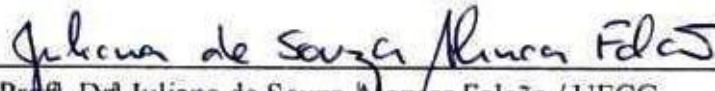
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno / UEPB
Orientador



Prof. Dr. José Alexsandro da Silva / UEPB
Examinador Interno



Prof. Drª Juliana de Souza Menezer Falcão / UFCG
Examinadora Externa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a razão do meu viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver, pela saúde e pela paz.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha mulher, Isabele Fabíola Brito de Sousa pelo companheirismo, paciência e carinho nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, pela orientação para este trabalho, pelo espaço no LDCPF, por todo o conhecimento passado por meio de debates, conselhos, observações e incentivos, pela paciência, pela amizade, fatores imprescindíveis para o desenvolvimento de minha formação pessoal e científica.

Ao professor Dr. José Alexandro da Silva, pelo conhecimento transmitido, pelo espaço no LDCPF e pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB e em especial aos professores Dr. João Walter de Souza da Silveira e Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, dentre outros que contribuíram à minha formação através das disciplinas e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, em especial a Natan, Geovani, Yargo, Airla, Alana, Malu, Amaro, João Paulo, Pedro e Túlio pelos momentos de amizade, apoio, descontração sem o qual a presente pesquisa não teria se desenvolvido.

A todos os amigos que fiz durante minha estadia em Campina Grande-PB, em especial a Natan, Jôffylli, Geovani, Amaro, Gustavo, Malu, Alisson Ronny, Kyllmann, Pedro, Túlio e Yargo, pelas palavras de incentivo e força, pelos momentos de descontração e alegria.

A minha avó materna Maria do Carmo Patriota, a minha avó paterna Izaura Nunes Patriota, aos meus tios e tias, especialmente a minha tia Ana Adelma Patriota, a minha irmã Yara Mabell Gomes Patriota pelo incentivo e força nas horas mais necessárias.

RESUMO

Microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. Os tiofenos e seus derivados são uma importante classe de compostos heterocíclicos que possui uma grande variedade de propriedades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante. Nesse estudo, foi utilizado o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, denominado de 5CN06. O objetivo desse trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de microemulsões para uso oral contendo um fármaco derivado do tiofeno (5CN06). Diagramas de fases pseudoternário (DFPT) foram construídos usando labrasol® (LAS) como tensoativo, etanol (EtOH) como co-tensoativo, miristato de isopropila (MIP) como a fase oleosa e água como a fase aquosa. Proporções definidas de LAS, EtOH e MIP foram tituladas com água e o aspecto observado em cada ponto do DFPT e as regiões de ME foram destacadas. A ME branca (ME B) foi obtida a partir de um ponto selecionado no DFPT, e a esse ponto avaliou-se a incorporação do 5CN06 por três métodos distintos (M1, M2 e M3). Todas as formulações foram caracterizadas e avaliadas quanto aos aspectos macroscópicos, eficiência de encapsulação, tamanho de gotícula, índice de polidispersão (IPD), microscopia de luz polarizada, calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios – X (DRX) e atividade antimicrobiana *in vitro*. Um método analítico espectrofotométrico foi desenvolvido e validado para quantificação do 5CN06 nas MEs. A técnica empregada para a construção do DFPT se mostrou bastante simples e reprodutível. As MEs mantiveram limpidez, transparência e isotropia após a incorporação do 5CN06. A ME B e as formulações ME M1, M2 e M3 apresentaram tamanhos de gotículas com diâmetro de $24,8 \pm 0,5$ nm, $25,5 \pm 0,42$ nm, $24,3 \pm 0,43$ nm e $29,7 \pm 2,5$ nm com IPD de $0,371 \pm 0,013$, $0,377 \pm 0,009$, $0,362 \pm 0,020$ e $0,354 \pm 0,013$ e eficiência de encapsulação de 84%, 86% e 88%, respectivamente. As formulações foram fisicamente estáveis por 30 dias sob armazenamento em condições de estresse. O método analítico desenvolvido e validado se mostrou simples e rápido, sendo considerado linear, específico, exato e

preciso e, portanto, validado de acordo com os critérios da International Conference on Harmonization (ICH) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Previamente ao estudo da atividade antimicrobiana, o 5CN06 foi quantificado em todos os sistemas e os resultados mostraram 57, 117,1 e 133,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para a ME M1, M2 e M3. As MEs M2 e M3 mostraram as maiores concentrações e foram utilizadas para os estudos posteriores. A atividade antimicrobiana das MEs M2 e M3 foi avaliada e valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 29.4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus* e 3.7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para ambas as leveduras, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, foram obtidas para ME M2. Para a ME M3, foram obtidos CIM de 66.6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para ambas as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e 4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Estes dados preliminares indicam o potencial das microemulsões na utilização de fármacos com baixa solubilidade aquosa pela via oral.

Palavras-chave: Sistemas microemulsionados, derivado tiofênico, caracterização físico-química, validação, antimicrobianos.

ABSTRACT

Microemulsions (MEs) are isotropic and thermodynamically stable systems translucent two immiscible liquids, usually water and oil, stabilized by an interfacial film of surfactants located at the oil / water interface. The thiophenes and its derivatives are an important class of heterocyclic compounds having a wide variety of biological properties including antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory, antioxidant. In this study 2 - [(2,4-dichloro-benzylidene)-amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [b] thiophene-3-carbonitrile was utilized, called 5CN06. The objective of this research was to develop, characterize and evaluate the in vitro antifungal activity of microemulsion for oral use containing a thiophene derivative. A pseudo-ternary phase diagram (PTPD) was constructed adopting a high energy approach using labrasol (LAS) as surfactant, Ethanol (EtOH) as co-surfactant, isopropyl myristate (IPM) as oil phase and water as aqueous phase. Proportions defined of LAS, IPM and EtOH were titrated with water and the appearance observed at each point of DFPT and the ME regions were highlighted. The blank ME (ME B) was obtained from a selected point in DFPT, at this point it was evaluated the incorporation of 5CN06 by three different methods (M1, M2 and M3). All formulations were characterized and evaluated for macroscopic aspects, entrapment efficiency, droplet size and polydispersity index (PDI), polarized light microscopy, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) and in vitro antimicrobial activity. A spectrophotometric analytical method was developed and validated to quantify the 5CN06 in MEs. The technique employed for the construction of PTPD proved quite simple and reproducible. The MEs maintained clarity, transparency and isotropy after incorporation of 5CN06. Blank ME (ME B) and three incorporated ME (ME M1, ME M2 and ME M3) showed droplets sizes with diameter of 24.8 ± 0.5 nm, 25.5 ± 0.42 nm, 24.3 ± 0.43 nm and 29.7 ± 2.5 nm with PDI of 0.371 ± 0.013 , 0.377 ± 0.009 , 0.362 ± 0.020 and 0.354 ± 0.013 and 5CN06 entrapment of 84%, 86% and 88%, respectively. The MEs formulations were physically stable by storage for 30 days under stress conditions. The analytical method developed and validated showed simple, fast and with minimal cost being considered linear, specific, accurate and precise and therefore validated according the International Conference on

Harmonization (ICH) and National Health Surveillance Agency (ANVISA). Previously the antimicrobial activity assay, the 5CN06 was quantified in MEs systems and the results showed that the concentration of 5CN06 was 57, 117,5 and 133,1 for ME M1, ME M2 and ME M3, respectively. ME M2 and M3 showed higher concentration and it were utilized for further studies. Antimicrobial activity of ME M2 and M3 was evaluated and minimal inhibitory concentration (MIC) of 29.4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to *Staphylococcus aureus* and 3.7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for both yeasts *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* were obtained for ME M2. To ME M3 were obtained MIC of 66.6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for both strains, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* and 4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guillermondii*. This preliminary data indicate the potential of MEs for oral delivery of poor aqueous solubility drugs.

Keywords: Microemulsion systems, thiophene derivative, physicochemical characterization, validation, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura do anel tiofeno.....	18
FIGURA 2 – Estrutura química do 5CN06.....	20
FIGURA 3 – Tipos de microemulsões: fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca)...	22
FIGURA 4 – Tipos de estruturas encontradas com a auto-associação das moléculas dos tensoativos.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5CN06 – 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila;

A/O – Água em óleo

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CED - Calorimetria Exploratória Diferencial

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DFPT – Diagrama de Fases Pseudoternário

DRX – Difração de Raios - X

DSC - Differential Scanning Calorimetry

EE – Entrapment Efficiency

EtOH – Ethanol

FI – Fungal Infections

ICH – International Conference on Harmonization

IF – Infecções Fúngicas

IPD – Índice de polidispersão

IPM – Isopropyl Myristate

kV – Kilovolts

LAS - Labrasol[®]

LBDDS - Lipid-Based Drug Delivery Systems

LOD – Limit of detection

Log P – Coeficiente de Partição

LOQ – Limit of quantification

LSVM - Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas

mA – Milliampere

ME – Microemulsão (s) ou Microemulsion (s)

ME B – Blank ME

ME M1 – Microemulsion method 1/Microemulsão método 1

ME M2 - Microemulsion method 2/Microemulsão método 2

ME M3 - Microemulsion method 3/Microemulsão método 3

MIC – Minimal Inhibitory Concentration

MIP – Miristato de Isopropila

nm - Nanômetro

NSLF – Novos Sistemas de Liberação de Fármacos

O/A – Óleo em água

PDI – Polidispersity index

PTPD - Pseudo-Ternary Phase Diagram

RSD – Relative Standard Deviation

UV-Vis – Ultravioleta-visível

w/v – Weigth / Volume

XRD – X-Ray Diffraction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS: GÊNERO Candida	16
2.2 DERIVADOS TIOFÊNICOS	18
2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA E NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS (NSLF).....	20
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas (IF) tem aumentado significativamente devido ao número crescente de pacientes em risco. Estes pacientes são na sua maioria imunocomprometidos com doenças como AIDS, pacientes que estejam recebendo quimioterapia ou submetidos a transplantes de órgãos (SCHUETZ, 2013).

As espécies de *Candida spp.*, são patógenos eucarióticos oportunistas que normalmente habitam a cavidade oral, respiratória, tratos intestinais e cavidade vaginal. Micoses causadas por esses fungos apresentam diversas manifestações clínicas e podem ser classificadas como superficial (infecções cutâneas e da mucosa) e profundas (generalizada e de alta severidade) como é o caso da candidíase invasiva ou candidemia (SARDI et al., 2013).

As candidemias aumentam o risco de morte, prolongam o tempo de permanência nos hospitais e conseqüentemente aumentam os custos, gerando um problema de saúde pública (CORNISTEIN et al., 2013).

Emergindo como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, *Candida spp.*, principalmente *C. albicans* e em menor extensão outras espécies (*C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) representam o principal grupo de espécies de leveduras que infectam os indivíduos (CORNISTEIN et al., 2013; MORII et al., 2014).

A terapêutica utilizada atualmente consiste basicamente em três classes de antifúngicos: azólicos (fluconazol, itraconazol), equinocandinas (caspofungina, micafungina) e os poliênicos (nistatina, anfotericina B). Além disso, estes fármacos apresentam uma série de problemas como baixa biodisponibilidade, estreito espectro de ação, baixa potência e severos efeitos adversos (KLEPSEK, 2011).

O aumento da importância clínica das IF, o número reduzido de fármacos disponível, geralmente fungistáticos, e o considerável aumento da resistência aos antifúngicos, deixam clara a necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos do que aqueles que já estão em uso (PRASAD; KAPOOR, 2004; PINTO et al., 2008).

Os tiofenos e seus derivados são uma importante classe de compostos heterocíclicos, especificamente o tiofeno 2-amino substituído, que possui uma grande variedade de propriedades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e atividade anestésica local (MOHAMMAD ASIF IQBAL et al., 2012).

Para o presente estudo foi utilizado o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, denominado de 5CN06. Esta molécula faz parte de uma série de compostos sintéticos derivados do tiofeno, atóxica e com comprovada atividade antifúngica (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; OLIVEIRA, 2011).

Nos últimos anos, a procura por novos sistemas de liberação de fármacos (NSLF) tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com maior segurança e com menores efeitos colaterais (SILVA et al., 2009; DAMASCENO et al., 2011).

O interesse na aplicação de NSLF, como as microemulsões (MEs) vem ganhando muita atenção por parte da comunidade científica. Desta maneira, ME é definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. São geralmente formadas pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, co-tensoativo e eletrólito (DAMASCENO et al., 2011).

No campo farmacêutico, diversos estudos têm sido encontrados na literatura descrevendo o uso destes sistemas nas mais variadas vias de administração: parenteral, ocular, transdérmica, intranasal e oral (SHARMA et al., 2010; ONOUE et al., 2012; MA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2014).

A liberação oral é considerada uma via atrativa e preferível para administração de fármacos, uma vez que promove algumas vantagens, tais como controle total e fácil da administração de fármaco pelo paciente concomitante como uma enorme flexibilidade nas doses. Na via oral, o epitélio gastrointestinal impermeável comporta-se como uma barreira física enquanto a degradação enzimática induzida pela peptidase atua como uma barreira bioquímica (LAM; GAMBARI, 2014).

De modo geral, quando o fármaco é absorvido e entra na circulação sistêmica, segue em direção ao metabolismo de primeira passagem, as enzimas hepáticas degradam o fármaco causando uma baixa biodisponibilidade e eficácia limitada de formulações administradas oralmente. Além disso, os fármacos podem apresentar dificuldade em serem absorvidos para a circulação sistêmica devido à alguns problemas, tais como grande tamanho molecular, carga e propriedades hidrofílicas (YANEZ et al., 2011; LAM; GAMBARI, 2014).

Devido a todas essas barreiras que os fármacos devem superar, justifica-se o uso das ME e todas as suas propriedades, como aumento na solubilidade e proteção dos fármacos, tamanho nanométrico das gotículas, baixa tensão interfacial, grande área de interface, melhora do perfil de dissolução, liberação controlada de fármacos e aumento da biodisponibilidade (TENJARLA, 1999; HARRAR et al., 2011) que conferem condições às ME de incorporar moléculas insolúveis pela via oral que dificilmente seriam incorporadas em formulações convencionais, como o 5CN06.

Desse modo, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de microemulsões para uso oral contendo um fármaco derivado do tiofeno (5CN06).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS: GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de organismos e mais de 17 espécies de *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas. No entanto, de 70 a 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (LIM et al., 2012; CORNISTEIN et al., 2013).

A incidência de candidemia e infecções sistêmicas está aumentando de acordo com o número crescente de pacientes susceptíveis e o tratamento é difícil devido a resistência antifúngica. Na última década, o número de casos de

candidemia aumentou 10 vezes tornando a *Candida spp.* a terceira causa mais prevalente de infecções na corrente sanguínea e a quarta causa mais comum de infecções hospitalares. A candidemia e infecções sistêmicas tem uma alta taxa de mortalidade de 46 – 75% (LIM et al., 2012). Uma das causas do aumento da mortalidade tem sido associada a uma terapia inadequada ou atrasos no início da terapia (WEY et al., 1988; MORGAN et al., 2005; HORN et al., 2009).

Por décadas, o tratamento padrão para IF causadas por *Candida* eram os polienos (por exemplo, anfotericina B, na forma micelar, e nistatina) e os azóis (por exemplo, fluconazol). Esta última classe de fármacos forneceu uma alternativa à terapia com anfotericina B para candidíase, geralmente pouco tolerada e associada com reações agudas e nefrotoxicidade. No entanto, interações fármaco-fármaco, hepatotoxicidade e *rashes* cutâneos foram relatados na terapia com os azóis (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; GULLO, 2009; KLEPSEK, 2011).

Assim, surgiu a necessidade de uma alternativa eficiente à terapêutica acima citada devido aos inúmeros efeitos adversos. Desta forma, surgiram os triazóis (voriconazol, posaconazol), fármacos da classe dos azóis, de amplo espectro, com efeitos colaterais mais toleráveis, as formulações lipídicas de anfotericina B (lipossomas e dispersões coloidais), consideradas menos tóxicas do que a sua formulação convencional (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; GULLO, 2009; KLEPSEK, 2011) e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina). Esta classe de fármacos é bem tolerada, de amplo espectro de ação e não há relatos de resistência cruzada com os azóis e sem a toxicidade associada aos poliênicos (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; GULLO, 2009; KLEPSEK, 2011).

A resistência aos fármacos antifúngicos representa um grande desafio para o tratamento das IF. O mecanismo de resistência pode ser classificado como primário ou secundário e está relacionado com as características intrínsecas ou adquiridas do fungo e o tratamento antifúngico pode promover essa resistência adquirida. São conhecidos diferentes tipos de mecanismos de resistência que contribuem para o surgimento de fenótipos resistentes a diversos fármacos como a diminuição da acumulação intracelular de fármacos, mudança na composição da membrana celular através da incorporação de esteróis alternativos, produção de alvos farmacológicos com diminuída afinidade por antifúngicos e ativação das vias

de resposta ao estresse em decorrência à exposição aos fármacos antifúngicos (KLEPSEK, 2011; SARDI et al., 2013).

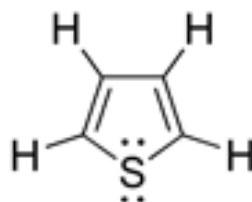
Além disso, para as terapias acima citadas, há algum mecanismo de resistência específico, para o fármaco ou classe do fármaco, descoberto e bem estudado (MOUDGAL et al., 2005; KROGH-MADSEN et al., 2006). De modo que há a necessidade de novos fármacos antifúngicos potentes, eficazes e bem tolerados pelos pacientes.

2.2 DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os tratamentos antifúngicos convencionais são baseados em poucas classes de fármacos e estes não são completamente efetivos e apresentam problemas relacionados a estreito espectro de ação, toxicidade elevada, baixa potência e propriedades farmacocinéticas inadequadas. Neste contexto, o tiofeno e seus derivados vem surgindo e se consolidando como uma alternativa promissora para o controle das infecções fúngicas (SCOTTI et al., 2012).

O anel tiofeno (Figura 1) é um heterocíclico aromático e tem grande importância como fragmento estrutural em diversos compostos farmacêuticos e químicos (OLIVEIRA, 2011).

FIGURA 1: Estrutura do anel tiofeno.



Fonte: OLIVEIRA (2011).

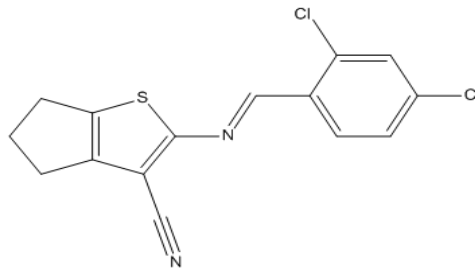
Os derivados tiofênicos têm grande potencial farmacológico e suas aplicações já estão materializadas em diversas moléculas utilizadas na terapia,

como o antiasmático zileutona (BERGER; DE CHANDT; CAIRNS, 2007) e agentes antifúngicos como o sertaconazol, ticonazol (MOHAMMAD ASIF IQBAL et al., 2012).

Com relação ao seu potencial farmacológico, os derivados tiofênicos são muito versáteis. Um estudo sintetizou e avaliou a atividade biológica de derivados benzo[b]tiofênicos sintetizados a partir do 3-clorobenzo[b]tiofeno-2-cloreto de carboxila. Alguns dos compostos mostraram atividade antibacteriana, outros mostraram atividade antifúngica e poucos mostraram atividade anti-inflamatória (ISLOOR; KALLURAYA; SRIDHAR PAI, 2010).

Um outro estudo desenvolveu e avaliou a atividade antifúngica de um derivado tiofênico puro e após incorporação em uma ME frente a leveduras do gênero *Candida* e *Criptococcus*. Os resultados se mostraram bastante promissores para ambos os gêneros de microorganismos com a molécula pura e houve uma melhora bastante significativa da atividade antifúngica do fármaco após a incorporação no sistema microemulsionado (GUIMARÃES et al., 2014).

Para esse trabalho, foi cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) um derivado tiofeno 2-amino substituído com comprovada atividade antifúngica (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011). A molécula em questão é o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta [b] tiofeno-3-carbonitrila, referido como 5CN06 (Figura 2). Este fármaco caracteriza-se físico-quimicamente como um pó amarelo, atóxico, fórmula molecular $C_{15}H_{10}N_2SCl_2$, massa molecular de 320 g.mol^{-1} e faixa de fusão variando de 186,5 a 189 e de 189 a 191 °C (OLIVEIRA, 2011). Sua classificação biofarmacêutica ainda não foi definida, uma vez que as suas características não estão bem esclarecidas, principalmente a permeabilidade. No entanto, o seu valor de coeficiente de partição ($\log P = 5,98$) indica que a molécula apresenta baixa solubilidade aquosa.

FIGURA 2: Estrutura química do 5CN06

FONTE: ChemDraw Ultra 12.0.

A solubilidade aquosa de um fármaco é um fator determinante de sua velocidade de dissolução. Dessa forma, uma limitada velocidade de dissolução devido a uma baixa solubilidade aquosa, geralmente acarreta uma baixa biodisponibilidade do fármaco quando administrado oralmente (KAWABATA et al., 2011).

2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA E NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS (NSLF)

O desenvolvimento de novas terapêuticas pode lançar mão de duas estratégias: (1) o planejamento/síntese de novas moléculas ativas ou modificação química de fármacos já conhecidos e (2) a incorporação de fármacos já em uso a um nanossistema carreador de fármaco (FRÉZARD et al., 2005).

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. O termo nanomedicina é utilizado quando a nanotecnologia é aplicada para o diagnóstico, prevenção, detecção e tratamento de doenças (GAO et al., 2014).

Muitos fármacos não mantêm a mesma eficácia apresentada na fase de planejamento quando são testados na clínica, uma vez que entre o local de administração e o órgão ou tecido alvo existe uma série de barreiras anatômicas,

químicas ou biológicas que contrariam a obtenção do efeito terapêutico desejado (OLIVEIRA et al., 2004).

Desta maneira, há a necessidade de desenvolver NSLF que vetorize a molécula terapeuticamente ativa apenas para o local de ação, sem afetar os órgãos e tecidos saudáveis (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). E a nanotecnologia farmacêutica tem um importante papel nesta tarefa, permitindo assim, a redução da dose necessária para eficácia terapêutica, bem como, a melhora dos índices terapêuticos e perfis de segurança (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005).

Entre as vantagens dos nanossistemas podemos destacar: proteção do fármaco contra possíveis instabilidades no organismo, redução da toxicidade como consequência da vetorização de fármacos à alvos específicos e menor exposição aos tecidos saudáveis, liberação controlada de fármacos, possibilidade de incorporação de moléculas hidrofílicas e lipofílicas, diminuição da dose e número de administrações e por fim, maior adesão do paciente à terapia (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005; PIMENTEL et al., 2007; CHOUDHARY; KUSUM DEVI, 2015).

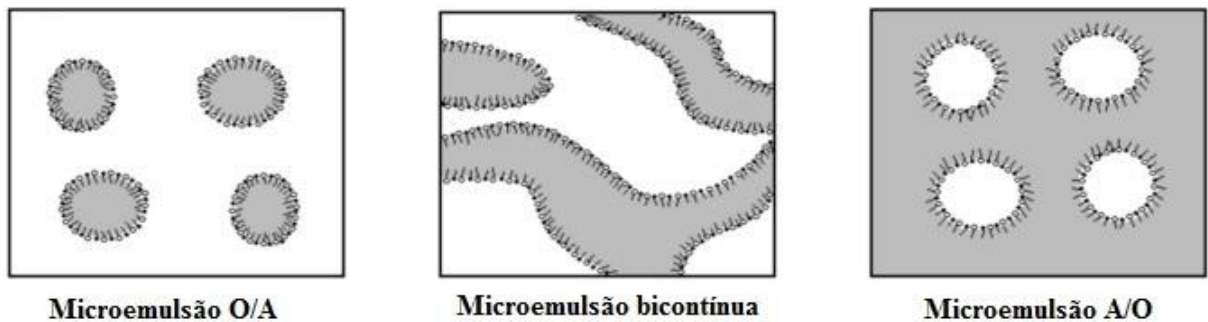
As ME têm se destacado como um sistema carreador de fármacos com grande potencial de aplicabilidade na área farmacêutica. As ME são definidas como uma monodispersão de gotículas esféricas constituída por óleo, tensoativo, co-tensoativo e fase aquosa, que é opticamente isotrópica e termodinamicamente estável com um diâmetro de gotícula variando entre 10 – 100 nm (TENJARLA, 1999; DAMASCENO et al., 2011; HU et al., 2011).

As propriedades únicas das ME que incluem baixa tensão interfacial, baixa viscosidade, formação espontânea, reduzido tamanho de gotículas, grande área interfacial e alta capacidade de solubilização de fármacos hidrofílicos e lipofílicos são os fatores que têm atraído atenção da comunidade científica (SILVA et al., 2009; FANUN, 2010; HARRAR et al., 2011).

A mistura dos vários componentes das ME pode formar uma variedade de sistemas dependendo da sua composição e condição ambiental, principalmente, temperatura. Elas podem formar uma, duas ou mais fases que estão em equilíbrio entre si. Estas fases podem ser água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou bicontínuas dependendo da concentração, natureza e arranjo das moléculas (Figura 3) (MCCLEMENTS, 2012). Na primeira, a fase interna, dispersa ou descontínua é

uma molécula hidrossolúvel enquanto que a fase externa, dispersante ou contínua é o componente oleoso, na segunda, a fase dispersa é o componente oleoso e a fase dispersante é a água. A terceira fase, não tem o formato esférico (gotículas) e pode surgir, principalmente, através de três mecanismos: (1) quando se aumenta o volume da fase interna dos sistemas, (2) durante a migração de fases O/A para A/O ou A/O para O/A ou (3) quando o volume das duas fases está próximo (DAMASCENO et al., 2011).

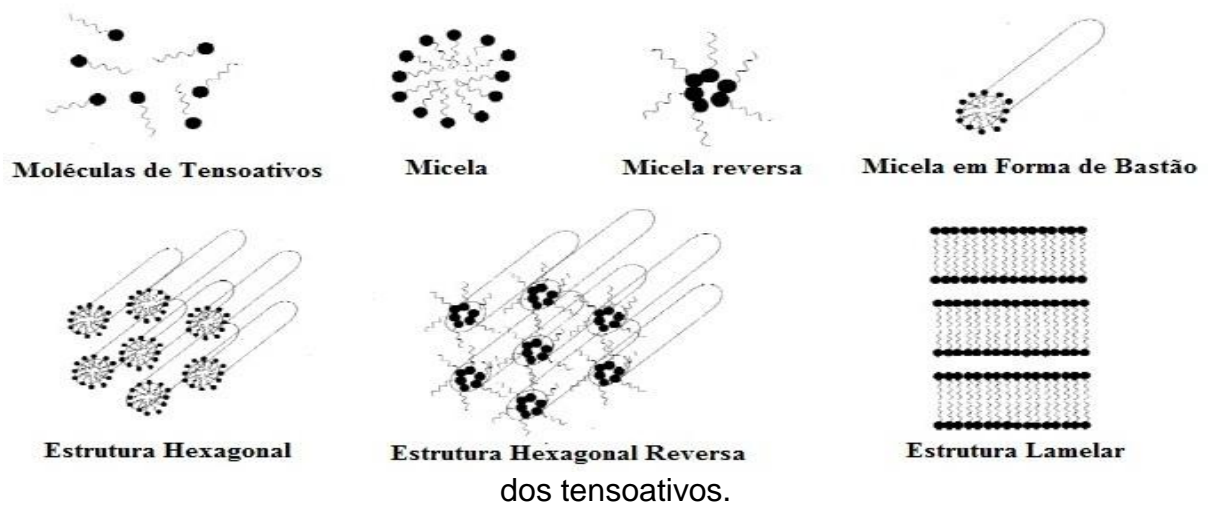
FIGURA 3: Tipos de ME: fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca).



Fonte: DAMASCENO et al. (2011).

As estruturas dentro dessas fases podem ser esferoide (micelas ou micelas reversas), cilíndricas (micelas em forma de bastão ou micelas reversas) ou em forma de plano (estruturas lamelares) (Figura 4) (MCCLEMENTS, 2012).

FIGURA 4: Tipos de estruturas encontradas com a auto-associação das moléculas



Fonte: LAWRENCE; REES (2000).

Desta forma, as ME podem ser destinadas a incorporação de moléculas lipofílicas que dificilmente seriam incorporadas em formulações convencionais, como é o caso do 5CN06.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de microemulsões para uso oral contendo um fármaco derivado do tiofeno (5CN06).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e analisar diagramas de fase pseudoternários para obtenção e identificação das regiões possíveis de sistemas opticamente transparentes;
- Selecionar um sistema opticamente transparente para incorporar o 5CN06;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para doseamento do 5CN06 incorporado nas ME por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-VIS);
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema microemulsionado contendo 5CN06 através de técnicas de microscopia de luz polarizada, difração de raios – X, doseamento, tamanho de gotículas e polidispersidade, estabilidade e calorimetria exploratória diferencial (CED);
- Avaliar a atividade antifúngica e concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* do sistema microemulsionado contendo o 5CN06.

4. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Development and antimicrobial activity of oil-in-water microemulsion for the oral delivery of a tiophene derivative

Yuri Basilio Gomes Patriota^a, Natan Emanuell de Sobral e Silva^a, Geovani Pereira Guimarães^{a,b}, Wilma Raianny Vieira da Rocha^{a,b}, Raissa Mayer Ramalho Catão^b, Francisco Jaime Bezerra de Mendonça Júnior^c, José Alexsandro da Silva^{a,b}, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno^{*a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil.

^bDepartamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil.

^cLaboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

*e-mail: bolivarpqld@pq.cnpq.br

ABSTRACT

5CN06 loaded microemulsion (ME) were developed adopting a high energy approach using labrasol[®] (LAS) as surfactant, isopropyl myristate (IPM) as oil phase and water. A pseudo-ternary phase diagram was constructed based on titration method to highlight the ME regions. A validated analytical methodology was developed for quantification of 5CN06 in ME system. Blank ME (ME B) and three incorporated ME methods (ME M1, ME M2 and ME M3) were prepared and presented droplets size of 24.8 ± 0.5 nm, 25.5 ± 0.42 nm, 24.3 ± 0.43 nm and 29.7 ± 2.5 nm with PDI of 0.371 ± 0.013 , 0.377 ± 0.009 , 0.362 ± 0.020 and 0.354 ± 0.013 , respectively. The entrapment efficiencies of 5CN06 were 84%, 86% and 88%, for ME M1, ME M2 and ME M3, respectively. The ME formulations were physically stable by storage for 30 days under stress conditions. Minimal inhibitory concentration (MIC) of ME M2 and ME M3 was evaluated and MIC smaller than $70 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were obtained against bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and smaller than $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ against yeasts (*Candida albicans*, *C.*

tropicalis, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis*). This preliminary data indicate the potential of ME for oral delivery of poor aqueous solubility drugs.

Keywords: bacteria; drug delivery system; yeast; thiophene.

1. Introduction

In the last decades, the incidence and prevalence of fungal infections (FI) by *C. albicans* have increased dramatically due to the expanding population of immunocompromised patients that use intravenous catheters, total parenteral nutrition, invasive procedures and the increasing use of broad-spectrum antibiotics, cytotoxic chemotherapies and transplantation (SARDI et al., 2013). Although *C. albicans* is the most prevalent species involved in invasive FI, the incidence of infections due to non-albicans species is increasing (LIM et al., 2012).

The treatment applied to candidemia consists of three basic classes of antifungal agents: azoles (fluconazole and itraconazole), echinocandins (caspofungin and, micafungin) and polyenes (nystatin and amphotericin B) (KLEPSER, 2011). However, these drugs exhibit various problems such as low bioavailability, narrow spectrum of activity, low potency and severe adverse effects (BERGOLD; GEORGIADIS, 2005).

Besides, the increase in the clinical importance of FI, the reduced number of available antifungals, and the considerably increased resistance to antifungal agents have been stimulating the search for new drugs, which are more effective and less toxic than those already in use (PRASAD; KAPOOR, 2004; PINTO et al., 2008).

The thiophenes and its derivatives are an important class of heterocyclic compounds, specifically 2-amino substituted thiophene having a wide variety of biological properties including antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and local anesthetic activity (MOHAMMAD ASIF IQBAL et al., 2012). The thiophene derivatives have several applications materialized in molecules used in therapy, such as anti-asthmatic zileuton (BERGER; DE CHANDT;

CAIRNS, 2007), antifungal agents such as ticonazole and sertaconazole (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; MOHAMMAD ASIF IQBAL et al., 2012).

2-[(2,4-dichloro-benzylidene)-amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [b] thiophene-3-carbonitrile (5CN06) is a thiophene derivative (Figure 1), highly lipophilic drug and with poor water solubility (OLIVEIRA, 2011). To solve this problem, various formulation strategies may be applied, such as cyclodextrin inclusion complex, solid dispersion; however, in recent years much attention has been focused on lipid-based drug delivery systems (LBDDS).

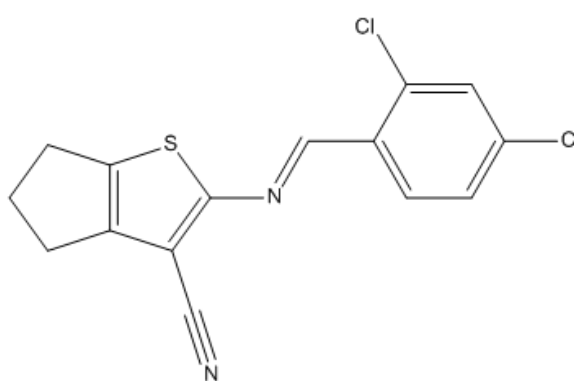


Figure 1: Chemical structure of 5CN06.

The LBDDS are a diverse group of formulations that range from simple oil solutions to complex mixtures of oils, surfactants, co-surfactants and cosolvents (POUTON, 2006; POUTON; PORTER, 2008). Among the LBDDS, ME are an colloidal drug carrier system, thermodynamically stable, containing oil, water, a surfactant. In most of cases, a co-surfactant are used to prepare the ME. It having a droplet diameter within the range of 10-100nm (SCHWARZ et al., 2012).

ME have attracted attention as promising pharmaceutical formulations because of their high capacity to solubilize guest substances. The use of these system improved antifungal activity of a thiophene derivative (5CN05) against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* (GUIMARÃES et al., 2014).

The aim of study was to develop ME containing 0.02% (w/v) of 5CN06 for oral use. Pseudo-ternary diagrams were constructed to obtain the components and

their concentration ranges. MEs formulations were characterized psysicochemically and *in vitro* antimicrobial activity was evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

5CN06 was synthesized by Synthesis and Vectorization Molecules Laboratory, Labrasol[®] (LAS) (PEG – 8 glycol caprylate) was purchased from Brasquim (Brazil), isopropyl myristate (IPM) was obtained from Via Farma (Brazil), Ethanol (EtOH) was obtained from Sigma Aldrich and used as received. The water was purified using a reverse osmosis system (Gahaka[®], Brazil). All other chemicals and solvents were analytical grade and used without further purification.

2.2 Construction of pseudo-ternary phase diagram

The existence of ME regions were identifying from pseudo-ternary phase diagram of systems containing oil, surfactant, co-surfactant by water titration method at ambient temperature. The LAS was used as the main surfactant, EtOH as co-surfactant and IPM as the oil phase. The boundaries of MEs were determined for different mixing weight ratios of surfactant and co-surfactant ($S_m = \text{LAS}/\text{EtOH} = 10:0$ and 9:1). In order to prepare each formulation, a calculated amount of LAS and EtOH was agitated using sonicator (Unique, Brazil) at room temperature and a predetermined amount of IPM was then added in the surfactant mixture to make weight ratios of 1:9 to 9:1. These final mixtures were titrated with distilled water and agitated using sonicator and ultrasound bath (Unique, Brazil) for 1 min. The phase transitions of the systems were analyzed macroscopically and classified after each addition of aqueous phase (HU et al., 2011).

2.3 Preparation of ME

The formulations were prepared according to point chosen in the pseudo-ternary phase diagram. The blank ME (ME-B) was prepared mixing the LAS, IPM and water using a magnetic stirring for 3 min. 5CN06 (0.02% w/v) was incorporated in the MEs by 3 methods following described: (1) the 5CN06 was added in the previously prepared ME (ME M1); (2) the amount of 5CN06 was dissolving in the IPM and vortexed for 1 min. After this, the LAS and water was added and the final mixture was agitated using magnetic stirring for 3 min (ME M2); (3) the 5CN06 was dissolving in the oil phase and vortexed for 1 min. Then, the LAS and water was added and the final mixture was agitated using sonicator and ultrasound bath in one cycles of 1 min (ME M3). Prior to measurements, prepared formulations were left at room temperature for 24 h and assays were conducted in triplicate.

2.4 UV-Vis spectrophotometric method development and validation

An UV-Vis spectrophotometric method for quantification of 5CN06 incorporated at the ME formulations was developed and validated according the guidelines established by the International Conference on Harmonization guidelines (ICH, 2005) and Brazilian Regulatory National Agency of Sanitary Monitoring (BRASIL, 2003). Previously, in order to verify the appropriate wavelength, a solution of 5CN06 was prepared dissolving 0.002 g of 5CN06 in 10 mL of chloroform. Then, dilutions were made with acetonitrile in order to obtain a final concentration of 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and spectrophotometric scan, from 300 to 450 nm was performed. The analytical curve ($n = 3$) was prepared dissolving 0.002 g of 5CN06 in 10 mL of chloroform. Then, dilutions were made with acetonitrile in order to obtain a final concentration of 3 to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of 5CN06. The spectrophotometric analyses (UV mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan spectrophotometer) were carried out at 393 nm. The detection and quantification limits, LOD and LOQ, respectively, were calculated from the analytical curve. Accuracy was determined at three points of the calibration curve (6, 12 and 18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Intra-day and inter-day variability was determined analyzing the average spot of the calibration curve (12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($n = 6$). The

robustness of the method was examined by analyzing the average spot of calibration curve ($n = 3$) by making slight changes to the following parameters: acetonitrile and spectrophotometer different brands. The specificity was determined comparing the spectra at 393 nm of the ME B and the 5CN06 loaded ME 0.02% (w/v).

2.5 Characterization of formulations

2.5.1 Quantification of 5CN06 in ME

For determination of 5CN06 in the systems, 5CN06-ME samples were diluted with acetonitrile to a concentration of $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of 5CN06. The spectrophotometric analyses were carried out at 393 nm according to validated analytical methodology described before.

2.5.2 Droplet size and PDI

The droplet size and polydispersity index (PDI) of formulations were measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS9 (Malvern, Worcestershire, UK). A formulation aliquot of 1 mL was added into a sample cell for measurements. All measurements were performed at a wavelength of 635 nm with a scattering angle of 90° at 25°C (ZHAO et al., 2010).

2.5.3 Polarized light microscope

The isotropy of samples was analyzed using a polarized light microscope. This technique can be used to differentiate isotropic ME from anisotropic lamellar and hexagonal mesophases, since optically isotropic materials do not interfere with the plane of polarization of polarized light (DJORDJEVIC et al., 2004; DJEKIC; PRIMORAC; JOCKOVIC, 2011). 200 μL of samples were placed between a glass slide and coverslip and examined under polarized light microscope.

2.5.4 Differential scanning calorimetry (DSC)

The formulations were tested using a differential scanning calorimeter (Q20 DSC, TA Instruments, US) for exploring the microstructure as well as the physical state of 5CN06 in ME. Thermograms were taken for 5CN06, LAS, IPM, ME-B and 5CN06-ME. The samples (about 3 mg) were placed in standard aluminum pans and dry nitrogen was used as effluent gas. All samples were scanned at the following conditions: equilibrating at 25 °C for 1 min, cooling the sample at the rate of 10 °C.min⁻¹ to - 50 °C, isothermal for 3 min, heating the sample at the ramp rate of 10°C.min⁻¹ to 200 °C (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011).

2.5.5 X-Ray diffraction (XRD)

To verify the physical state of 5CN06 in the MEs, X-ray powder scattering measurements of 5CN06 and 5CN06-ME were carried out using an X-ray diffractometer (XRD 6000, Shimadzu, Japan) at room temperature using a monochromatic CuK_α-radiation at 30 mA and at 40 kV over a range of 2θ angles from 10° to 50° at scanning velocity of 1°.min⁻¹ (BALAKRISHNAN et al., 2009).

2.5.6 Entrapment efficiency

The percentage of 5CN06 incorporated in MEs was obtained as follow. Samples of 1 mL were placed in eppendorf tubes and centrifuged at 4382 g for 60 min to remove the untrapped drug. The entrapment efficiency (EE%) was expressed as the percentage of entrapped into MEs referred to the total amount of drug that is present in the non-centrifuged ME (TAVANO et al., 2011). A rate of 150 μL of non-centrifuged and centrifuged ME were diluted in 2350 μL of acetonitrile (SHARMA et al., 2010). This solution was analyzed at the wavelength of 393 nm to quantify 5CN06.

$$EE\% = \frac{Abs_{centrifuged}}{Abs_{non-centrifuged}} \times 100 \quad (1)$$

2.5.7 Stability studies

The stability studies were performed based on the guidelines of the International Conference on Harmonization guidelines (ICH, 2005) and Brazilian Regulatory National Agency of Sanitary Monitoring (BRASIL, 2003). Samples were centrifuged at 2100 g in the Excelsa II centrifuge, model 206-BL (Brazil) for 30 min. The different formulations were placed in test tubes and subjected to a temperature range (40 to 80 °C), raising the temperature by 10 °C every 30 min in a water bath, (SOLAB, model SL 155/10). The samples, hermetically enclosed in glass tubes, were submitted to cycles of 24 h between 4 °C and 40 °C for 12 days. Additionally, the different samples were subjected to cycles of 24 h in 4 °C, 25 °C and 40 °C for 30 days. Clarity and phase separation were evaluated before and after subjecting the MEs to tests.

2.6 Antimicrobial activity

2.6.1 Microorganisms used and growth conditions

The test organisms included the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 and yeasts *Candida albicans* ATCC 76645, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. guilliermondii* ATCC 6260 and *C. parapsilosis* ATCC 22019. The bacteria were grown in nutrient broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) at 37 °C and maintained on nutrient agar slants at 4 °C. The yeasts were cultured from frozen stocks and maintained at 37 °C on sabouraud-dextrose agar (Hi Media, Sasti - Maharashtra, India).

2.6.2 Antimicrobial susceptibility testing

The tests were done in accordance with the guidelines recommended by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010). The minimum inhibitory concentration (MIC) of 5CN06-ME were determined by microdilution technique in Mueller Hinton broth (Merck, SA, São Paulo, Brazil). Each 5CN06-ME (ME M2 and

ME M3) was mixed with media and serial diluted were carried out (1:2) for the broth microdilution procedure. An inoculum density used in the experiment was adjusted to 0.5 McFarland scale. Microdilution plates were incubated at 37 °C and the MIC were analyzed visually after 24 h of incubation. Colorimetric readings of the results was employed resazurin 0.1% (w/v) (Sigma-Adrich, UK) as an indicator of cell growth which the blue color or slightly purple indicate no growth and the pink color indicate presence of viable cells. The inoculum with the media and just the media were used as positive and negative control, respectively.

3. Results and Discussion

3.1 Phase diagram study

The weight ratio of surfactant and co-surfactant (S_m) is an important factor influencing the ME domains. The pseudo-ternary phase diagrams for two different S_m ratios of 10:0 and 9:1 at ambient temperature are presented in Figure 2, the gray region represents the transparent domains. Whatever S_m 10:0 or 9:1, there were transparent region existed. However, this region increased when the concentration of co-surfactant was decreased. Co-surfactants at a proper concentration range are necessary to form ME. However, excessive amount of co-surfactant may decrease the stability of the system due its high aqueous solubility and lead to the droplet size increasing as a result of the expanding interfacial film (LAWRENCE; REES, 2000; ZHANG et al., 2004). Hence, the pseudo-ternary phase diagram selected to further studies was the S_m 10:0. Following the study and analyzed of the constructed pseudo-ternary phase diagrams, the selected point (5% IPM, 35% LAS, 60% water) was chosen for drug incorporation and further studies. All formulations were prepared by the methods described in section 2.3. The systems were clear, single phase and isotropic dispersions, showing that 5CN06 did not influenced the interfacial tension between the oil and aqueous phase, not disturbing the thermodynamic stability of system (SILVA et al., 2009).

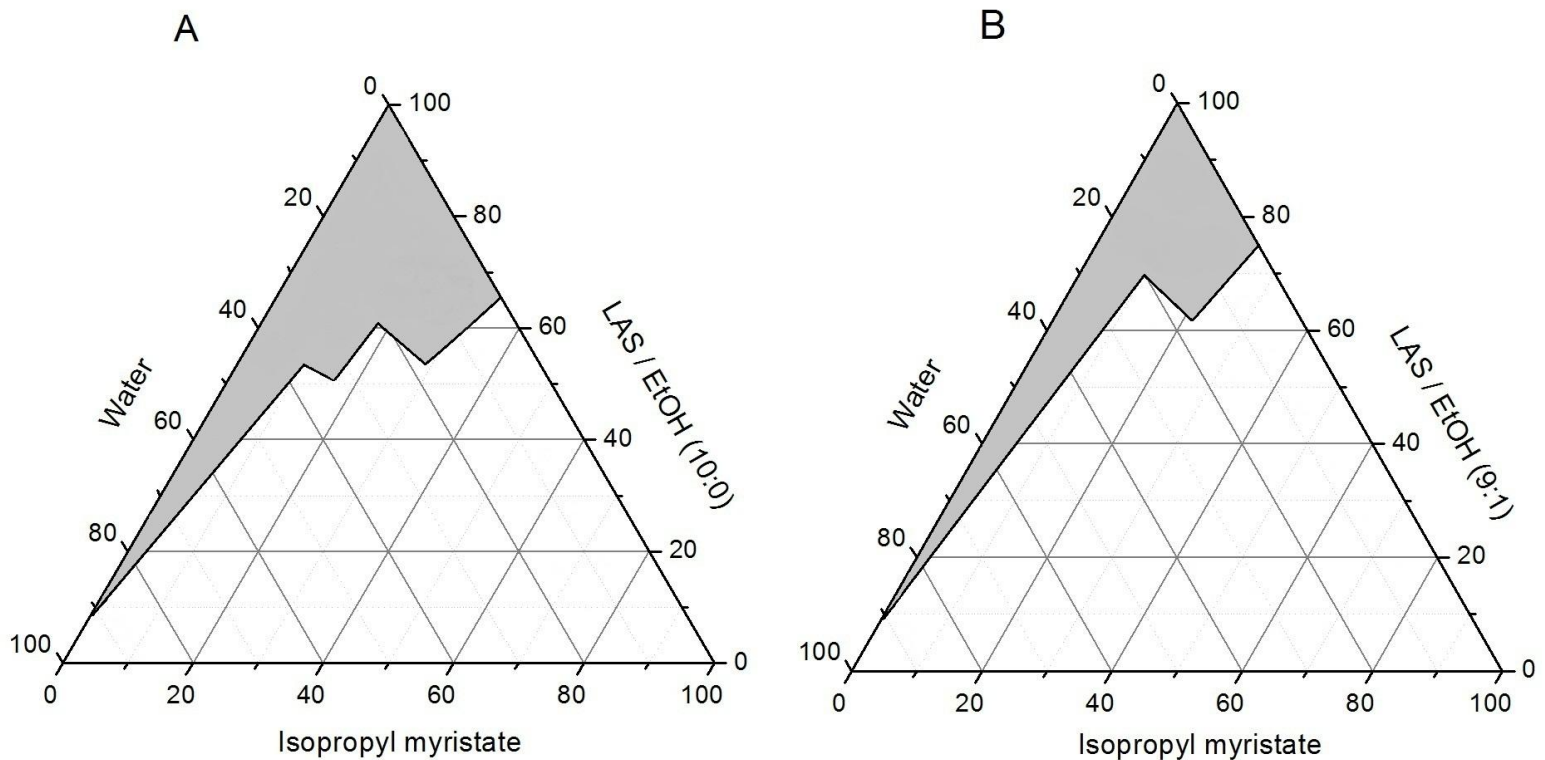


Figure 2: Pseudo-ternary phase diagrams of [LAS+EtOH]/IPM/water system at room temperature with different weight ratios of surfactant and co-surfactant (S_m): (a) 10:0 and (b) 9:1. The gray area represents ME existence range.

3.2 UV-Vis spectrophotometric method validation

The importance to develop of simple, rapid, specific and accurate analytical method consist in reducing unnecessary tedious sample preparations and cost of materials and labor (SILVA et al., 2014).

Development of validated methodology to quantify 5CN06 in ME systems was performed. Analytical characteristics of the proposed spectrophotometric method was demonstrated in Table 1. Spectrophotometric scan of 5CN06 showed that maximum absorbance peak was 393 nm. Spectrophotometric analysis of the ME B and 5CN06-loaded ME showed that ME B was not absorbed at $\lambda = 393$ nm, demonstrating the specificity of the method. The method showed good linearity ($r =$

0.9999) in the concentration range of 3 to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The LOD and LOQ were 0.2816 and 0.8533 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. The precision of the method was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) and was expressed as relative standard deviation (RSD%) and evaluated in the concentration of 12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for representing the average spot of the calibration curve. The results of precision was within the recommended (%RSD < 5%). The accuracy of the method was performed by analyzing nine determinations within the linear interval of calibration curve representing low concentration (6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, RSD = 3.90) (n = 3), medium concentration (12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, RSD = 1.97) (n = 3) and high concentration (18 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, RSD = 1.38) (n = 3) and it was expressed as recovery (%). The results presented acceptable values for the validation of an analytical procedure (recovery = 80-120 %). Furthermore, the robustness of method was evaluated and results showed that the method maintained its response among the variations of the acetonitrile brands ($11.751 \pm 0.290 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and different spectrophotometer ($11.620 \pm 0.268 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The results show that the UV-Vis method presented can be considered suitable for the analytical determination of 5CN06 in ME.

Table 1: Validation parameters of the UV-Vis spectrophotometric method of 5CN06.

Validation parameters	5CN06				
Range ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3 – 20				
Regression equation ^a	$y = 63,896x - 0.0145$				
Correlation coefficient (r)	0.9999				
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.2816 ± 0.0044				
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.8533 ± 0.0133				
Accuracy	Drug conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
Mean \pm SD ^b %R.S.D ^c Percent recovery (%)	6	12	18		
	6.054 \pm 0.236	12.325 \pm 0.243	17.797 \pm 0.245		
	3.90	1.97	1.38		
	100.89	102.64	98.86		
Precision	Analyst	Day	Mean drug conc. \pm SD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (n = 6)	%RSD	Percent recovery (%)
	Analyst 1	1	12.312 \pm 0.243	1.97	102.53
		2	11.649 \pm 0.260	2.23	96.98
	Analyst 2	1	12.246 \pm 0.266	2.17	102.01
		2	11.678 \pm 0.333	2.85	97.24

^a Based on three calibration curves.

^b Standard deviation (n =3).

^c Relative standard deviation.

3.3 Characterization of prepared formulations

3.3.1 Droplet size analyses

The droplet size of the ME is a critical parameter in colloidal systems because it determines the rate and extent of drug release as well as absorption. Hence, smaller the droplet size, the larger the interfacial surface area will be available for drug absorption (WEI et al., 2012). The z-average diameter and polydispersity index of the systems are presented in Table 2. As shown in the table, the z-average size of the ME was found to be smaller than 30 nm, which was highly desirable. Thereafter, it is worth to note, the z-average size of the ME, ME B and

5CN06-ME was very close suggesting that incorporation did not interfere with the ME microstructures.

Table 2: Mean MEs droplet size and polydispersity index.

Formulation	z-Average diameter (nm)	Polydispersity index (PDI)
ME B	24,8367±0,5005	0,371±0,0125
ME M1	25,4767±0,4179	0,377±0,0090
ME M2	24,2733±0,4285	0,362±0,0203
ME M3	29,7267±2,5366	0,354± 0,0127

3.3.2 DSC

The physical state of 5CN06 in the ME was investigated since it important influence on the *in vitro* and *in vivo* release (GUPTA; CHAVHAN; SAWANT, 2011). DSC thermograms of pure 5CN06, LAS, ME B, ME M1, M2 and M3 are shown in Figure 3. Pure 5CN06 showed two sharp endothermic peaks at temperatures between 180 to 190 °C (curve A) similar to Oliveira, 2011. No obvious peaks for 5CN06 was found in the drug loaded into ME thermograms (curve E, F and G). It might be explained that the drug is incorporated and protected in the ME droplets. The unloaded and 5CN06 loaded ME thermograms (curve D to E) showed two peaks representing the melting and freezing of water (curve C) near 0 and -25 °C, respectively. ME systems that only exhibit freezing peak of water presented oil-in-water (O/W) microstructure (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011). Thus, we suggest that our systems present this microstructure.

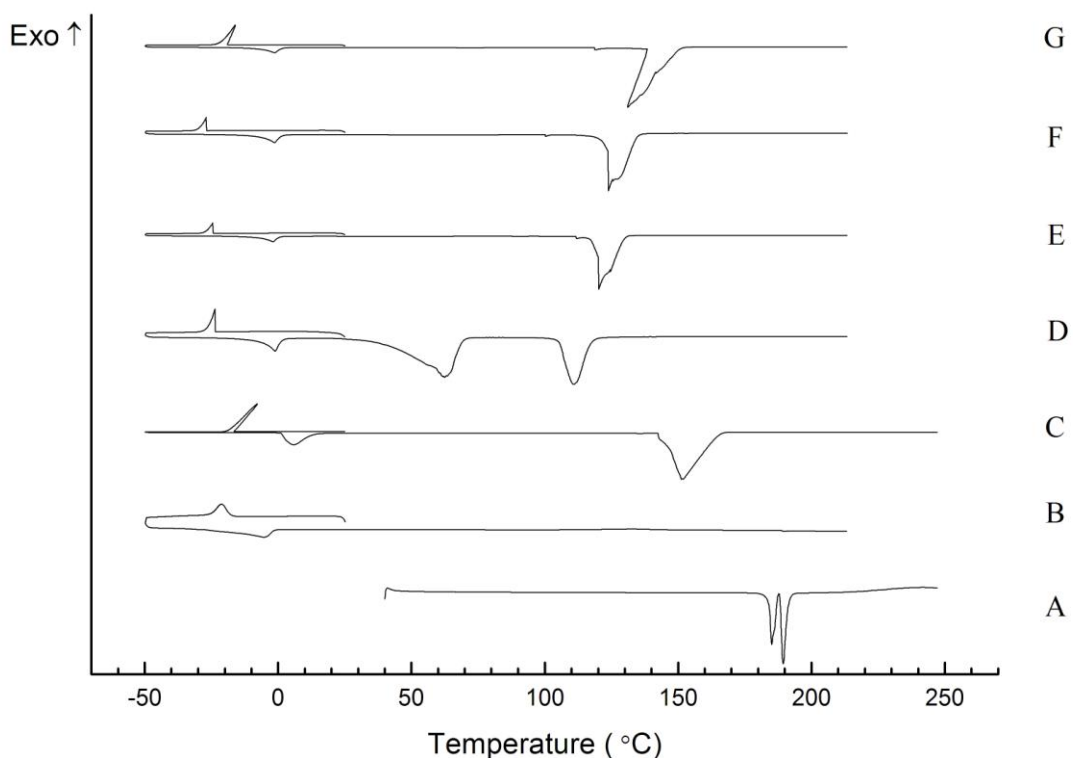


Figure 3: DSC thermograms of (A) 5CN06 powder, (B) LAS, (C) Water, (D) ME B, (E) ME M1, (F) ME M2 and (G) ME M3.

3.3.3 X-ray diffractometry

The physical state of 5CN06 in ME was also investigated by X-ray scattering measurements and the X-ray diffractograms are presented in Figure 4. It can be observed that the pure drug exhibited peaks indicating a crystalline nature. In the XRD of formulations no obvious peaks representing crystals of 5CN06 were seen for the ME, suggesting amorphization and incorporation of 5CN06 in ME droplets during preparation of systems (GUPTA; CHAVHAN; SAWANT, 2011; ONOUE et al., 2012). Drugs in amorphous form have greater solubility than that of the corresponding crystalline drug as well as may lead to a improvement of oral bioavailability (KAWABATA et al., 2011).

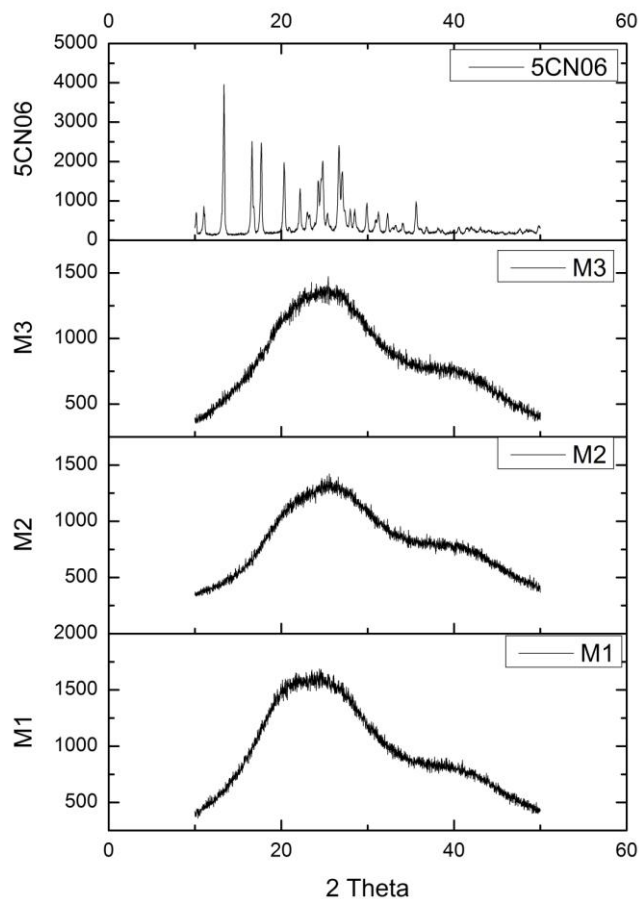


Figure 4: X-ray powder diffraction of 5CN06 powder, ME M1, ME M2 and ME M3.

3.3.4 Entrapment efficiency (EE)

5CN06 entrapment in ME was evaluated after sedimenting the undissolved drug using centrifuge force. The supernatant was diluted with acetonitrile and analysed and EE% are shown in table 3. The results showed that 84%, 86% and 88% of 5CN06 was entrapped in the ME M1, ME M2 and ME M3, respectively. Higher amount was obtained in the ME M3 while the minimum was obtained in the ME M1. The amount of dissolved drug depends the amount of oil phase and drugs may be solubilized in the oil core and/or on the interface of these systems (NARANG; DELMARRE; GAO, 2007). Although the concentration of IPM was 5%, different amount of 5CN06 was quantified in ME systems indicating that the method of incorporation influenced in entrapment efficiency. Hence, higher energy methods promoted higher entrapment efficiency.

Table 3: Entrapment efficiency of 5CN06-loaded ME.

Microemulsions	Before centrifugation		After centrifugation		EE (%)
	Abs ^a (nm) ± SD ^b	5CN06 load (µg.mL ⁻¹)	Abs (nm) ± SD	5CN06 load (µg.mL ⁻¹)	
M1	0.2040 ± 0.0046		0,1730 ± 0,0010		84.8
M2	0.4360 ± 0.0159		0,3783 ± 0,0091		86.8
M3	0.4957 ± 0.0142		0,4400 ± 0,0087		88.8

^a Absorbance.

^b Standard deviation (n = 3).

3.3.5 Stability study

The ME were submitted to different stability studies to investigate the occurrence of the any sign of instability. All formulations did not show alteration with the centrifugation. In the studied temperature range, the systems maintained the stability until 50 °C. Thereafter, the systems remained in cycles of 24 h in 4 °C and 40 °C for 12 days and cycles of 24 h in 4 °C, 25 °C and 40 °C for 30 days. In both assays, the systems retained the stability in 4 °C and room temperature; however, they showed a reversible phase separation with samples stored at 40 °C. The effect of the temperature is crucial in systems stabilizing for non-ionics surfactant, especially those based on polyoxyethylene, because an increasing in the temperature leads a decrease in surfactant solubility due to dehydration in polyoxyethylene group (LAWRENCE; REES, 2000).

3.3.6 Antimicrobial activity

The 5CN06 quantification into ME showed that the concentration of 5CN06 was 57, 117,5 and 133,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for ME M1, ME M2 and ME M3, respectively. According to this results, we decide to test only the ME M2 and M3 due to higher concentration of 5CN06 loaded in these systems.

The antimicrobial effects of the ME formulation at different concentrations against both gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts by using the microdilution technique are shown in Table 4. The strains and yeasts growth only in positive control, inoculum with the culture media, indicating the suitability of microorganisms. All microorganisms studied did not show any sensibility to ME B.

Table 4: Minimal inhibitory concentration (MIC) values of ME B and 5CN06-ME.

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)							
Antibacterial activity				Antifungal activity			
Samples	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>
ME B	R	R	R	R	R	R	R
ME M2	29.4	58.8	R	7.3	3.7	7.3	3.7
ME M3	66.6	66.6	R	4.2	4.2	4.2	8.3

S. aureus, *E. coli* and *P. aeruginosa* were screened for sensitivity to the 5CN06-ME. Except *P. aeruginosa*, all the strains showed to be sensitive, $\text{MIC}_{\text{ME M2}} = 29.4$ and $58.8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for *S. aureus* and *E. coli*, respectively and $\text{MIC}_{\text{ME M3}} = 66.6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for both strains. It is noteworthy that 5CN06-ME have more potent inhibitory effects on gram-positive bacteria in comparison to gram-negative bacteria. This is to be expected because the outer membrane of gram-negative bacteria is known to present barrier to penetration of numerous antibiotic molecules, and the periplasmic space contains enzymes, which are able of breaking down foreign molecules introduced from outside (HOLETZ et al., 2002).

C. albicans, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis* were also screened for sensitivity to the 5CN06-ME. All *Candida* species presented sensitivity to 5CN06-ME tested with $MIC_{ME\ M2} = 3.7 - 7.3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and $MIC_{ME\ M3} = 4.2 - 8.3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mainly *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*.

We obtained greater activity of 5CN06 than ARAÚJO (2010) who determined the MIC of 5CN06 ($MIC_{5CN06} = 8 - 256 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) against *Candida* species. Our results are in accordance with GUIMARÃES et al. (2014) who obtained a better activity of a thiophene derivate when incorporated in a ME systems.

Higher activity of 5CN06-ME can be explained to formation of droplets in nanometric range that increase the surface tension and thus force themselves to adsorb in the lipids present in cell membrane, disrupting it and killing the microorganisms (GUPTA et al., 2014).

4. Conclusion

In the current investigation, ME systems of 5CN06 were prepared and *in vitro* evaluated against bacteria and yeasts. DSC and XRD studies confirmed incorporation of drug in ME systems and suggested that 5CN06 may be in the molecular dispersion state. An UV-Vis spectrophotometric methodology was developed and validated for quantification of 5CN06 in ME systems. No significant difference in the globule size was observed with 5CN06 incorporation. The ME formulations were physically stable by storage for 30 days under stress conditions. This preliminary data clearly indicates the ability of ME to improve the antibacterial and antifungal activity of 5CN06 with MIC smaller than $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian Federal Agency (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ – Brazil), the Center for Strategic Technology in the Northeast (CETENE).

5. References

- BALAKRISHNAN, P. et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 539-45, 2009.
- BERGER, W.; DE CHANDT, M. T.; CAIRNS, C. B. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 4, p. 663-76, 2007.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 2005.
- BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília - DF, 2003.
- CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.
- DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; JOCKOVIC, J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic MEs. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, n. 2, p. 81-87, 2011.
- DJORDJEVIC, L. et al. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based ME drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1-2, p. 11-19, 2004.
- GERSHANIK, T.; BENITA, S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 179-188, 2000.
- GUIMARÃES, G. P. et al. Antifungal activity of topical ME containing a thiophene derivative. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 545-550, 2014.

GUPTA, S. et al. Development and characterization of polyphenon 60 and caffeine ME for enhanced antibacterial activity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 932017, 2014.

GUPTA, S.; CHAVHAN, S.; SAWANT, K. K. Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovir dipivoxil: Design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 145-155, 2011.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HU, L. et al. Design of fenofibrate ME for improved bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 2, p. 251-5, 2011.

ICH. **International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Geneva, 2005.

KANG, B. K. et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 65-73, 2004.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1-10, 2011.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, 2011.

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

LIM, C. S. Y. et al. Candida and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012/01/01 2012.

MISHRA, N. N. et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 201-35, 2007.

MOHAMMAD ASIF IQBAL et al. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. **Journal for drugs and medicines**, v. 4, p. 112 - 118, 2012.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and MEs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 9-25, Dec 10 2007.

OLIVEIRA, J. G. B. **Síntese, purificação, caracterização estrutural e avaliação da citotoxicidade de novos derivados de 2-[(benzilideno)amino]-5, 6- diidro-4H ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila em bioensaios de *Artemia salina***. 2011. 65f (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa.

ONOUÉ, S. et al. Inhalable dry-emulsion formulation of cyclosporine A with improved anti-inflammatory effects in experimental asthma/COPD-model rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 54-60, Jan 2012

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 3-14, 2006

PINTO, E. et al. 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.

POUTON, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 278-287, 2006.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 625-37, 2008.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug Resistance in Yeast Candida. In: (Ed.). **International Review of Cytology**: Academic Press, v.242, 2004.

SARDI, J. C. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SARKAR, M.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 830, n. 2, p. 349-54, 2006.

SCHWARZ, J. C. et al. Natural MEs: formulation design and skin interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 557-62, 2012

SHARMA, G. et al. MEs for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 159-69, 2010

SILVA, J. A. et al. Physicochemical Characterization and Development of a ME System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2009

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quimica Nova**, v. 32, p. 1389-1393, 2009.

TAVANO, L. et al. Niosomes vs MEs: new carriers for topical delivery of Capsaicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 333-339, 2011.

WEI, Y. et al. Enhanced oral bioavailability of silybin by a supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 22-28, 2012.

ZAOUTIS, T. E. et al. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1232-1239, 2005.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of ME 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.

ZHANG, Q. et al. Preparation of nimodipine-loaded ME for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1–2, p. 85-96, 2004

ZHAO, Y. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 170-7, 2010.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados da pesquisa obtivemos ME O/A utilizando o Labrasol[®] como tensoativo e o miristato de isopropila como fase oleosa, componentes esses aceitáveis para a utilização pela via oral. A metodologia utilizada para obtenção dos diagramas de fases mostrou-se bastante simples e reprodutível de modo que foi possível a identificação das regiões opticamente transparentes (ME). As ME apresentaram um tamanho de gotícula adequado para sistemas coloides destinados a essa via. Além disso, através da técnica de DSC, determinamos a microestrutura O/A dos sistemas e as ME mostraram ser capazes de proteger o fármaco dentro do núcleo oleoso da gotícula. A técnica de DRX indicou que o fármaco está interiorizado na gotícula oleosa da fase dispersa possivelmente está na fase molecular. As ME apresentaram uma alta taxa de encapsulação através dos métodos estudados e após a incorporação do 5CN06, as ME mantiveram a limpidez, transparência e isotropia indicando que o fármaco não alterou a tensão interfacial óleo/água do sistema, mantendo a estabilidade termodinâmica. A metodologia por espectrofotometria UV-Vis apresentou-se linear, específica, exata, precisa e robusta, portanto, válida de acordo com a ANVISA e ICH. A metodologia analítica validada se mostrou uma técnica analítica simples, reprodutível, de baixo custo e sensível para a quantificação do 5CN06 nas ME. Por fim, a atividade antimicrobiana do 5CN06 foi melhorada frente a bactérias e leveduras após incorporação nas MEs demonstrando o potencial desses sistemas na utilização de fármacos com baixa solubilidade aquosa pela via oral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R. S. A. **OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS SINTÉTICOS DO TIOFENO**. 2010. 73f (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa.

BALAKRISHNAN, P. et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 539-45, 2009.

BERGER, W.; DE CHANDT, M. T.; CAIRNS, C. B. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 4, p. 663-76, 2007.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 2005.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília - DF, 2003.

CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CHOUDHARY, S.; KUSUM DEVI, V. Potential of nanotechnology as a delivery platform against tuberculosis: Current research review. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 65-75, 3/28/ 2015.

CORNISTEIN, W. et al. Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380-384, 6// 2013.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, p. 9-18, 2011.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; JOCKOVIC, J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, n. 2, p. 81-87, 2011.

DJORDJEVIC, L. et al. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1-2, p. 11-19, 2004.

FANUN, M. Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 2, p. 496-503, 2010.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quimica Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.

GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 761-777, 7// 2014.

GUIMARÃES, G. P. et al. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 545-550, 2014.

GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. **Drugs**, p. 65-73, 2009.

GUPTA, S. et al. Development and characterization of polyphenon 60 and caffeine microemulsion for enhanced antibacterial activity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 932017, 2014.

GUPTA, S.; CHAVHAN, S.; SAWANT, K. K. Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovir dipivoxil: Design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 145-155, 2011.

HARRAR, A. et al. Influence of surfactant amphiphilicity on the phase behavior of IL-based microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 423-9, 2011.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695-703, 2009.

HU, L. et al. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 2, p. 251-5, 2011.

ICH. **International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Geneva, 2005.

ISLOOR, A. M.; KALLURAYA, B.; SRIDHAR PAI, K. Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, n. 2, p. 825-30, 2010.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1-10, 2011.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, 2011.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 193-212, 2005.

KROGH-MADSEN, M. et al. Amphotericin B and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Isolates Recovered from a Critically Ill Patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 7, p. 938-944, 2006.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v. 178, p. 25-45, Mar 28 2014.

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

LIM, C. S. Y. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012/01/01 2012.

MA, W. C. et al. Development of intravenous lipid emulsion of alpha-asarone with significantly improved safety and enhanced efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 21-30, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719, 2012.

MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. et al. 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, p. 1492 - 1499, 2011.

MOHAMMAD ASIF IQBAL et al. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. **Journal for drugs and medicines**, v. 4, p. 112 - 118, 2012.

MORGAN, J. et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 540-7, 2005.

MORII, D. et al. Distribution of Candida species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 9, p. 558-562, 9// 2014.

MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant Candida parapsilosis Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 9-25, Dec 10 2007.

OLIVEIRA, A. G. et al. MICROEMULSÕES: ESTRUTURA E APLICAÇÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS. **Química Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, J. G. B. **Síntese, purificação, caracterização estrutural e avaliação da citotoxicidade de novos derivados de 2-[(benzilideno)amino]-5, 6- diidro-4H ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila em bioensaios de Artemia salina.** 2011. 65f

(Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa.

ONOUE, S. et al. Inhalable dry-emulsion formulation of cyclosporine A with improved anti-inflammatory effects in experimental asthma/COPD-model rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 54-60, Jan 2012.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 503-514, 2007.

PINTO, E. et al. 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.

POUTON, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 278-287, 2006.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 625-37, 2008.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug Resistance in Yeast Candida. In: (Ed.). **International Review of Cytology**: Academic Press, v.242, 2004.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 4// 2014.

SARDI, J. C. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SCHUETZ, A. N. Invasive Fungal Infections: Biomarkers and Molecular Approaches to Diagnosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, n. 3, p. 505-525, 9// 2013.

SCHWARZ, J. C. et al. Natural microemulsions: formulation design and skin interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 557-62, 2012.

SCOTTI, L. et al. 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.

SHARMA, G. et al. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 159-69, 2010.

SILVA, J. A. et al. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2009.

SILVA, J. A. et al. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 643-649, 2014.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quimica Nova**, v. 32, p. 1389-1393, 2009.

TAVANO, L. et al. Niosomes vs microemulsions: new carriers for topical delivery of Capsaicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 333-339, 2011.

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

WEI, Y. et al. Enhanced oral bioavailability of silybin by a supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 22-28, 2012.

WEY, S. B. et al. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, n. 12, p. 2642-5, 1988.

YANEZ, J. A. et al. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 10-11, p. 923-942, 2011.

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.

ZHANG, Q. et al. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1–2, p. 85-96, 2004.

ZHAO, Y. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 170-7, 2010.