



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**MICROEMULSÃO COMO CARREADOR LIPÍDICO DO CIPROFLOXACINO:
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

**CAMPINA GRANDE
2019**

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**MICROEMULSÃO COMO CARREADOR LIPÍDICO DO CIPROFLOXACINO:
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Farmácia

Orientador: Prof. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno.

Coorientador: Joandra Maísa da Silva Leite

**CAMPINA GRANDE
2019**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

A659m Araújo, Camila Beatriz Barros.

Microemulsão como carreador lipídico do ciprofloxacino [manuscrito] : desenvolvimento e caracterização físico-química / Camila Beatriz Barros Araujo. - 2019.

44 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2019.

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

"Coorientação: Profa. Ma. Joandra Máisa da Silva Leite , Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Atividade antimicrobiana. 2. Ciprofloxacino. 3. Antibióticos. 4. Microemulsões. I. Título

21. ed. CDD 615.1

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**MICROEMULSÃO COMO CARREADOR LIPÍDICO DO CIPROFLOXACINO:
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

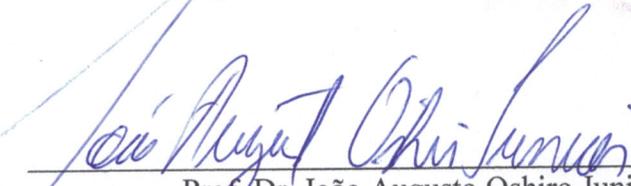
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 19/11/2019.

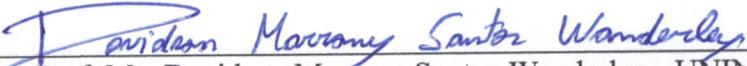
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno - UEPB
(Orientador)



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior - UEPB
(Examinador Interno)



Prof. Me. Davidson Marrony Santos Wanderley - UNINASSAU
(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que em sua infinita sabedoria colocou força em meu coração para vencer essa etapa de minha vida. Por ter me concedido saúde e disposição. Sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço a minha família por todo o carinho, amor e força. Sou grata, especialmente, aos meus pais, Rivalda da Silva Barros e José Edgley Araújo da Silva, que tanto lutaram pela minha educação e nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos. Obrigada, Danilo, meu irmão querido, por ser inspiração diária.

A todos os amigos, especialmente, Beatriz, Milena, Juliana e Vinicius, meu muito obrigada. Vocês foram fundamentais para minha formação, por isso merecem o meu eterno agradecimento. As risadas, que vocês compartilharam comigo nessa etapa tão desafiadora da vida acadêmica, fez toda a diferença e tornou essa caminhada mais leve.

Sou grata a todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, especialmente a Bolívar P. G. de L. Damasceno, responsável pela orientação do meu projeto. Manifesto aqui minha gratidão eterna por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência.

A Joandra Maísa por todo o auxílio, paciência e ensinamentos ao longo deste trabalho, e todos do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) que direta ou indiretamente transmitiram conhecimentos, agregando ciência na minha vida acadêmica.

Deixo meus agradecimentos também a Davidson Marrony Santos Wanderley e João Augusto Oshiro Junior que aceitaram o convite de participação da minha banca examinadora, obrigada pela disponibilidade e por ser inspiração como profissionais.

À instituição UEPB, que ao longo da minha formação ofereceu um ambiente de estudo agradável, motivador e repleto de oportunidades.

RESUMO

MICROEMULSÃO COMO CARREADOR LIPÍDICO DO CIPROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

¹Camila Beatriz Barros Araújo; ²Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

^{1,2}Universidade Estadual da Paraíba- UEPB

¹camilabsbeatriz@hotmail.com

O ciprofloxacino (CIPRO) é um potente antibiótico utilizado para tratamento de uma ampla variedade de infecções bacterianas. A fim de diminuir a ação dos efeitos indesejáveis do CIPRO é preciso controlar sua permeação. Neste contexto, inovadores sistemas carreadores de fármacos surgem com os avanços no ramo da tecnologia farmacêutica, objetivando o incremento na solubilização, no perfil de liberação e distribuição de princípios ativos, visando aumentar a eficácia terapêutica. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, caracterização físico-química, a avaliação da estabilidade preliminar e a atividade antimicrobiana de uma ME contendo CIPRO (ME-CIPRO) para administração parenteral. A construção do diagrama de fases pseudoternário (DFPT) foi à primeira etapa desse trabalho. Ele foi construído utilizando a mistura de 4 componentes: triglicérides do ácido cáprico-caprílico [TACC (como fase oleosa)], Kolliphor[®] HS 15 e Span[®]60 como uma mistura de tensoativos na proporção de 9:1 e água destilada (como fase aquosa). Após a identificação das regiões do DFPT, foi selecionado um ponto classificado como ME. Com o intuito de preparar a ME-CIPRO, foi necessário retirar o sal do CIPRO, tornando a molécula mais lipofílica, o que facilitou a sua incorporação na gotícula de óleo da ME na concentração de 2,0 mg/mL. Após essa incorporação, efetuou-se a caracterização físico-química da ME-CIPRO quanto ao seu aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas. Realizou-se o estudo de estabilidade preliminar através dos ensaios de centrifugação, ciclo de resfriamento/aquecimento e estresse térmico. E, por fim, realizou-se também a avaliação da atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Macroscopicamente o sistema apresentou-se como líquido, transparente, límpido e homogêneo. A formulação apresentou um pH de 6,0 (adequado para uso parenteral), elevada condutividade devido ao processo de incorporação do CIPRO na ME (1754 μ S/cm), confirmando a formação de ME do tipo O/A. A ME-CIPRO apresentou um tamanho médio das suas gotículas de $17,8 \pm 0,35$ nm. A formulação de ME-CIPRO 2,0 mg/mL apresentou-se estável após todo o teste de estabilidade preliminar. Com relação à atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima para as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi de 0,48 μ g/mL (diluição até 0,048%) e para a cepa da *E. coli* foi de 31,25 μ g/mL (diluição até 0,78%). Portanto, foi possível desenvolver uma ME contendo o CIPRO de maneira que o fármaco foi eficaz contra as cepas de bactérias utilizadas, tornando-se uma alternativa promissora de para o tratamento infecções sistêmicas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Diagrama de fases pseudoternário; Estabilidade preliminar; Parenteral; Novos sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

MICROEMULSION AS A CIPROFLOXACINE LIPID CARRIER: DEVELOPMENT AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

¹Camila Beatriz Barros Araújo; ²Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

^{1,2}State University of Paraíba- UEPB

¹camilabsbeatriz@hotmail.com

Ciprofloxacin (CIPRO) is a potent antibiotic used to treat a wide variety of bacterial infections. In order to reduce the action of CIPRO's undesirable effects its permeation must be controlled. In this context, innovative drug carrier systems appear with advances in the field of pharmaceutical technology, aiming at increasing solubilization, release profile and distribution of active ingredients, aiming to increase therapeutic efficacy. Thus, this work aimed at the development, physicochemical characterization, evaluation of preliminary stability and antimicrobial activity of a CIPRO-containing ME (ME-CIPRO) for parenteral administration. The construction of the pseudoternary phase diagram (DFPT) was the first stage of this work. It was constructed using the 4-component mixture: capric-caprylic acid triglycerides [TACC (as an oil phase)], Kolliphor® HS 15 and Span®60 as a 9: 1 mixture of surfactants and distilled water (as phase water). After identifying the DFPT regions, a point classified as ME was selected. In order to prepare ME-CIPRO, it was necessary to remove CIPRO's salt, making the molecule more lipophilic, which facilitated its incorporation into the ME oil droplet at a concentration of 2.0 mg/mL. After this incorporation, the physicochemical characterization of ME-CIPRO was performed regarding its macroscopic appearance, pH, electrical conductivity, refractive index and average droplet size. Preliminary stability study was performed by centrifugation, cooling / heating cycle and thermal stress tests. Finally, the antimicrobial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) strains was also evaluated. Macroscopically the system was presented as liquid, transparent, clear and homogeneous. The formulation had a pH of 6.0 (suitable for parenteral use), high conductivity due to the process of incorporation of CIPRO in the ME (1754 $\mu\text{S} / \text{cm}$), confirming the formation of O/W type ME. ME-CIPRO had an average droplet size of 17.8 ± 0.35 nm. The ME-CIPRO 2.0 mg/mL formulation was stable after the whole preliminary stability test. Regarding antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration for *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains was 0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dilution up to 0.048%) and for *E. coli* strain was 31.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (dilution up to 0.78%). Therefore, it was possible to develop an ME containing CIPRO so that the drug was effective against the strains of bacteria used, making it a promising alternative for treating systemic infections.

Keywords: Antimicrobial Activity; Pseudoternary phase diagram; Preliminary stability; Parenteral; New drug delivery systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do ciprofloxacino	15
Figura 2 – Tipos de microemulsões esquematizadas quanto à fase dispersa e dispersante	17
Figura 3 – Representação do sistema de Winsor	18
Figura 4 – Estudo do EHL do Kolliphor® HS 15	26
Figura 5 – Diagrama de fases pseudoternário	27
Figura 6 – Comparação do cloridrato de ciprofloxacino e CIPRO básico em água.....	28
Figura 7 – Teste de solubilidade em diferentes solventes.....	29
Figura 8 – Aspecto macroscópico das formulações.....	29
Figura 9 – Formulações após estresse térmico	32
Figura 10 – Formulações após ciclo resfriamento/aquecimento	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual (m/m) das formulações selecionadas	28
Tabela 2 – pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas.....	30
Tabela 3 – pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas após estudo de estabilidade preliminar	34
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima em relação às diluições (%) da microemulsão testada frente às cepas bacterianas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIPRO	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DFPT	Diagrama de fases pseudoternário
DMSO	Dimetilsulfóxido
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
ELL	Emulsão líquido leitosa
ELO	Emulsão líquido opaca
IR	Índice de refração
NSLF	Novos Sistemas de Liberação de Fármacos
ME	Microemulsões
ME-BR	Microemulsão sem ciprofloxacino
ME-CIPRO	Microemulsão com ciprofloxacino
TACC	Triglicérides de ácido cápricocaprílico
THF	Tetraidrofurano
O/A	Óleo em água
ST	Sistema transparente
STB	Sistema transparente bicontínuo
TMG	Tamanho médio de gotículas
ΔG	Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	13
	Objetivo Geral	13
	Objetivos Específicos	13
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
	Histórico dos antibióticos	14
	Ciprofloxacino	14
	Microemulsões	16
	Sistema de Winsor.....	17
	Constituição das microemulsões	18
	Formação das microemulsões	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
	Material	20
	Métodos	20
	Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo do Kolliphor® HS 15	20
	Construção do diagrama de fases pseudoternário	20
	Seleção das formulações	21
	Modificação do cloridrato de ciprofloxacino para forma básica.....	21
	Caracterização físico-química e morfológica das formulações	22
	<i>Análise macroscópica</i>	22
	<i>Determinação do pH</i>	22
	<i>Determinação da condutividade elétrica</i>	22
	<i>Tamanho médio das gotículas</i>	22
	<i>Índice de refração</i>	22
	Avaliação da estabilidade preliminar das formulações	23
	Teste de centrifugação	23
	Estresse térmico.....	23
	Ciclo resfriamento/aquecimento	23
	Análise microbiológica	23
4.4.2	Teste de microdiluição	24
4.4.3	Incubação.....	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25

	Estudo de pré-formulação	25
	Construção de diagramas de fases pseudoternário	26
	Seleção das formulações	28
	Modificação do cloridrato de ciprofloxacino para forma básica	28
	Caracterização físico-química e morfológica das formulações	29
	Avaliação da estabilidade preliminar das formulações.....	31
	Teste de centrifugação	31
	Estresse térmico.....	32
	Ciclo resfriamento/aquecimento.....	33
	Avaliação da atividade antimicrobiana	34
6.	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os antibióticos têm sido vastamente utilizados como produtos farmacêuticos potentes em humanos e animais para controlar terapêuticamente doenças infecciosas que causam incapacitação prolongada e, assim, proteger a saúde. Eles podem ser descritos como compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos, distribuídos em aproximadamente onze diferentes classes, diferenciando-se por sua estrutura química ou mecanismos de ação. As quinolonas, antimicrobianos sintéticos, são eficientes no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LIN;LEE, 2020; DE LIMA; TOLEDO, 2016).

Incluso na classe das fluorquinolonas, o ciprofloxacino (CIPRO) é um potente antibiótico utilizado para tratamento de uma ampla variedade de infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos Gram-negativos (CAO et al., 2019). Pode ser usada no tratamento de infecções respiratórias, como faringite, sinusite, bronquite, pneumonia e tuberculose, bem como para infecções do trato urinário, pele, ossos e tecidos (ALMEIDA et al., 2019). Sem uma cuidadosa avaliação das suas indicações pode levar ao crescimento de cepas resistentes e induzir, em aproximadamente 1 a 2% dos pacientes, a ocorrência de reações adversas. Essa resistência parece ocorrer tanto por mutação no alvo, quanto por alteração da permeação do fármaco através da membrana externa da célula (LIU et al., 2019; ARCA-SUÁREZ et al., 2018).

A fim de diminuir a ação dos efeitos indesejáveis do CIPRO é preciso controlar sua permeação. Neste contexto, inovadores sistemas carreadores de fármacos surgem com os avanços no ramo da tecnologia farmacêutica, objetivando o incremento na solubilização, no perfil de liberação e distribuição de princípios ativos, visando aumentar a eficácia terapêutica (POH, 2019; AZEVEDO, 2018).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tornou-se uma via importante na promoção das ações terapêuticas, tendo em vista a redução das limitações nas terapias existentes (SOUSA et al., 2018). Os nanocarreadores mostram-se promissores na entrega de medicamentos, estabilização e distribuição do composto para atingir o alvo, além de reduzir a toxicidade. Empregados potencialmente para melhorar as características de distribuição de substâncias bioativas pouco solúveis em água (KAPSE et al., 2020).

As microemulsões (ME) estão inseridas nesses novos sistemas de liberação de fármacos (NSLF) e podem ser conceituadas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente transparente de dois líquidos imiscíveis geralmente óleo e água, envoltas e estabilizadas por tensoativos na interface óleo/água (O/A) (DAMASCENO et al., 2011; SUBONGKOT et al., 2017).

Dessa maneira, a formação de um sistema microemulsionado para incorporação do CIPRO tem como finalidade aumentar a sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade, tornando um meio promissor para tratamento de infecções sistêmicas, como também o maior direcionamento do fármaco reduzindo possíveis reações adversas e resistência bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado contendo ciprofloxacino para administração parenteral.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- a) desenvolver e utilizar um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) para obtenção de possíveis regiões de formação de sistemas opticamente transparentes;
- b) realizar a conversão do sal do CIPRO em base a fim de incorporar na ME óleo em água (O/A);
- c) selecionar pontos do DFPT da região opticamente transparente para incorporar o CIPRO;
- d) caracterizar físico-quimicamente e morfológicamente os sistemas obtidos, contemplando as análises de: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração, tamanho médio das gotículas;
- e) avaliar a estabilidade preliminar dos sistemas obtidos, através dos ensaios de centrifugação, ciclo de resfriamento/aquecimento e estresse térmico;
- f) avaliar a atividade antibacteriana e determinar a concentração inibitória mínima do sistema microemulsionado.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Histórico dos antibióticos

A introdução de antibióticos na prática clínica representou uma das intervenções mais importantes para o controle de doenças infecciosas, como também foi um marco na medicina. Com a grande ascensão dessa classe de fármacos, as manifestações de infecções bacterianas juntamente com a resistência adquirida de micróbios patogênicos representaram desafios expressivos para muitos agentes antimicrobianos (ALÓS, 2015).

A descoberta e o desenvolvimento da primeira quinolona com propriedades terapêuticas foi o ácido nalidíxico, sintetizado e patenteado por Lescher em 1962, a partir dele desencadeou o interesse de diversos investigadores em sintetizar e testar compostos desta família, sendo alvo de inúmeras modificações com o intuito de melhorar as suas propriedades farmacológicas, levando a um aumento de atividade, ao mesmo tempo em que as suas propriedades farmacocinéticas foram otimizadas e a sua toxicidade reduzida (MARTINS, 2014; SILVA et al., 2012).

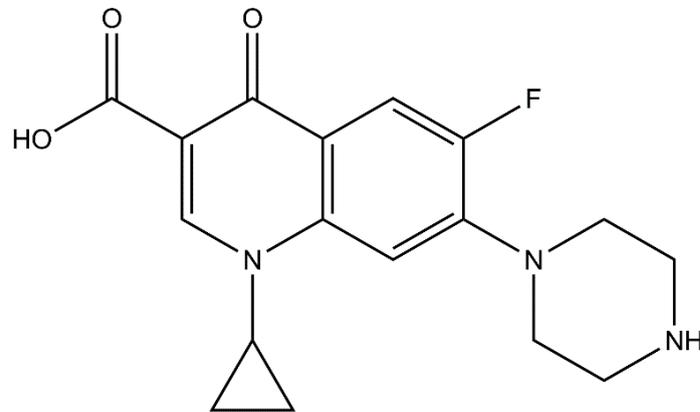
A adição do átomo de flúor na estrutura das quinolonas aumentou sua potência contra uma ampla gama de infecções bacterianas, como também aumentou a capacidade de penetração celular, englobando o sistema nervoso central. As moléculas de quinolona de segunda geração com inclusão de átomo de flúor (norfloxacin, CIPRO, levofloxacin) são agentes bactericidas clinicamente potentes com um espectro de atividade para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os alvos dessa classe de antibióticos são as topoisomerases do tipo II. As bactérias têm dois conjuntos relacionados de enzimas do tipo II, DNA girase e topoisomerase IV. A girase de DNA é a principal enzima que regula o estado de superenrolamento do DNA nos cromossomos bacterianos circulares. As fluoroquinolonas estabilizam os complexos clivados de fita dupla nos locais ativos da topoisomerase, de modo que não sejam selados com eficiência. A falha na vedação leva a quebras de fita dupla, causando morte celular bacteriana (BHATTACHARYA, 2019).

3.2 Ciprofloxacino

Incluso na classe das fluorquinolonas, o CIPRO (ácido 3-quinolino-1-ciclopropil-6-flúor-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil) carboxílico) conforme a Figura 1, é um pó cristalino quase branco a amarelo claro, ligeiramente higroscópico. Praticamente insolúvel em água. Solúvel em ácido acético diluído, muito pouco solúvel em etanol e em cloreto de metileno (FARMACOPEIA

BRASILEIRA ..., 2019). Foi aprovada em 1987 como antibiótico oral e posteriormente como intravenosa, pela *Food and Drug Administration* (FDA-EUA) (SOUZA et al.,2004).

Figura 1– Estrutura química do ciprofloxacino



Fonte: autoria própria (2019)

Baseado no sistema de classificação biofarmacêutica, o CIPRO possui baixa solubilidade e sua permeabilidade pode ser baixa ou alta, classificando-a como uma substância das classes II e IV. É muito solúvel em pH abaixo de 6 e pouco solúvel quando em pH acima de 8 (LINDENBERG et al., 2004).

O CIPRO possui duas constantes de dissociação (pK_a), por apresentar em sua estrutura dois sítios de ionização. O primeiro sítio é representado pelo grupo do ácido carboxílico com pK_a de 6,09, e o segundo sítio corresponde ao grupo básico oriundo da amina terciária com pK_a de 8,80. A desprotonação do grupo carboxila e do nitrogênio do anel piperazilina resulta na propriedade anfotérica do CIPRO. Assim como todos os compostos anfotéricos, o CIPRO pode originar quatro espécies químicas, de acordo com o pH da solução aquosa: a espécie monoprotonada, a espécie não ionizada, a espécie zwitteriônica e a espécie aniônica. Em meios neutros, como por exemplo o pH sanguíneo, a forma zwitteriônica predomina à forma não ionizada. O aumento da solubilidade do CIPRO em sua forma neutra pode aumentar seu potencial para o tratamento humano (JALIL et al., 2015; MARTINS, 2014; SILVA et al, 2012).

O desenvolvimento de formulações para administração parentérica de quinolonas deve ter em conta que à pH fisiológico a espécie que domina é a zwitteriônica, onde a solubilidade é minimizada. Essa estrutura é fundamental na ligação à DNA girase, e conseqüentemente sua atividade antimicrobiana (MARTINS, 2014).

Os antibióticos devem atender a uma série de critérios para que seja possível a obtenção de um tratamento eficiente, como por exemplo a capacidade de penetrar e ser retida

pela célula, atingir o alvo intracelular, e a exibição de atividade contra bactérias residentes no ambiente intracelular. Com o objetivo de aperfeiçoar o efeito terapêutico o uso de sistemas de administração seguros e eficientes, são capazes de administrar agentes terapêuticos em uma concentração adequada dentro do compartimento intracelular, como também é uma estratégia promissora para superar a resistência microbiana. Neste contexto está inserido o conceito dos sistemas transportadores de fármacos, os quais são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverá exercer o efeito farmacológico (ISA et al., 2016).

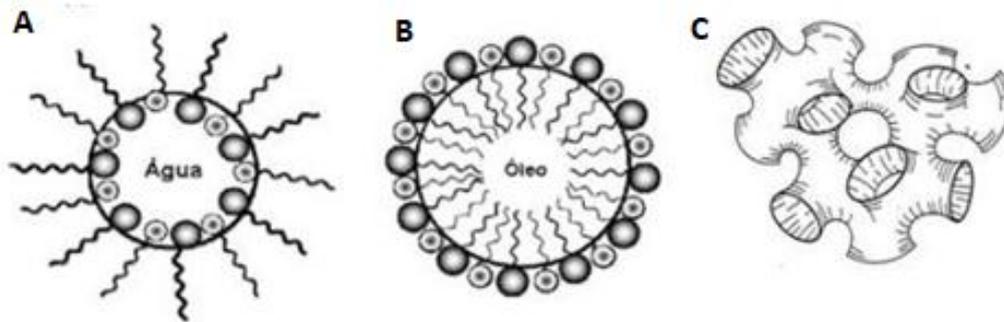
3.3 Microemulsões

As microemulsões (ME) são conceituadas como dispersões transparentes, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis, com baixa tensão superficial e gotículas nanométricas (5-200 nm). Esse tipo de sistema pode ser considerado um bom veículo para o transporte de substâncias hidrofílicas através do meio aquoso e para transportar as substâncias hidrofóbicas através do meio lipídico (RASHID et al., 2019).

A ME pode ser considerada um dos mais importantes sistemas de administração de medicamentos para via parenteral, devido à sua estabilidade e alta capacidade de solubilização para substâncias polares e não polares. Além disso, o tamanho nanométrico das ME diminui a possibilidade de formação de êmbolos após administração intravenosa, como também fornece liberação sustentada de medicamentos (ABOUMANEI et al., 2018).

As ME podem ser classificadas em: água em óleo (A/O), óleo em água(O/A) e bicontínua. Quando as moléculas hidrossolúveis estiverem situadas internamente nas gotículas de água, envoltas por tensoativos, em um meio contínuo de óleo, o sistema é conhecido como sendo do tipo A/O. Em contrapartida, no caso do sistema O/A, as moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior das gotículas esféricas de óleo, envolvidas por tensoativos em um meio contínuo de água, conforme a Figura 2 (XIAO et al., 2019; DAMASCENO et al., 2011).

Figura 2 –Tipos de microemulsões esquematizadas quanto à fase dispersa e dispersante



Fonte: adaptado de Conceição, 2016.

Legenda: Imagem A representa a gotícula A/O, imagem B ilustra a gotícula O/A e C representa a estrutura bicontínua.

As vantagens das ME incluem sua propriedade anti-agregação, excelente estabilidade, liberação controlada, proteção contra a degradação e aprimoramento da sua biodisponibilidade, além da diminuição de toxicidade (RAHDAR et al., 2019).

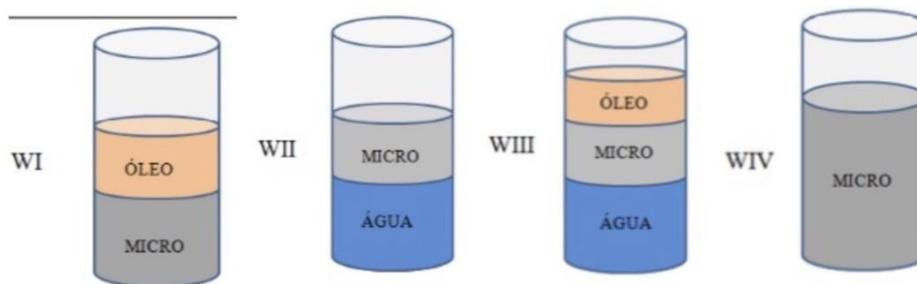
Uma ferramenta essencial para caracterizar o domínio das regiões de ME, é o diagrama de fases, geralmente são do tipo pseudoternários. Através dele, é possível identificar os componentes mais adequados e suas proporções relativas para a obtenção de sistemas fisicamente estáveis (SILVA et al., 2015; DAMASCENO et al., 2011).

Sistema de Winsor

Winsor propôs um sistema de classificação definindo os equilíbrios presentes entre a ME e as fases aquosa e oleosa. Quando a água e um líquido orgânico são misturados em quantidade adequada de um componente anfifílico, pode proporcionar 4 tipos de equilíbrio desse sistema (CRUZ, 2013; KUMAR, 2020):

- a) Winsor I – transcorre quando apenas uma pequena porção da fase oleosa está em equilíbrio com o sistema microemulsionado, apresentando um excesso do óleo na parte superior do sistema.
- b) Winsor II – Ocorre quando a água ou uma solução aquosa salina está em excesso, contendo apenas pequenas proporções de outros componentes no sistema.
- c) Winsor III – Tanto a fase aquosa como a oleosa estão em equilíbrio com uma terceira fase solubilizada. Formando um sistema trifásico, podendo ser do tipo bicontínua.
- d) Winsor IV – Estão mutuamente solubilizados, ocorre quando não há excesso de fase aquosa ou oleosa, formando um sistema homogêneo e monofásico. Trata-se apenas de uma ME, que pode ser de qualquer tipo.

Figura 3 – Representação do sistema de Winsor



Fonte: adaptado de Menezes, 2017.

Legenda: WI- representação do sistema winsor com excesso de óleo; WII- sistema de winsor com excesso de água; WIII- sistema de winsor com excesso de óleo e água; WIV- sistema homogêneo.

3.3.1 Constituição das microemulsões

Comumente, as ME são constituídas de água, óleo, tensoativo e, frequentemente, de um cotensoativo. A água é um solvente anfiprótico neutro estruturado, apresenta auto associação entre as moléculas via ligação hidrogênio, mantendo a estrutura cristalina do estado sólido a distâncias da ordem de grandeza molecular. O tamanho da cadeia alquílica do óleo influencia vigorosamente a distribuição do co-tensoativo nas fases óleo e água, como também nas propriedades físico-químicas das ME. Os triacilgliceróis de cadeia média ou longa são preferidos ao invés de óleos com certa polaridade, devido à melhor solubilização dos princípios ativos (SILVA et al., 2015).

Os tensoativos são considerados compostos anfifílicos, como grupos Tween[®] e Span[®], que podem simular uma conexão estável entre as moléculas lipofílicas e a fase aquosa. Para aumentar a solubilidade dos medicamentos lipofílicos, são adicionados ao sistema compostos chamados cotensoativos. A combinação de tensoativos não iônicos lipofílicos e hidrofílicos pode ajudar a ajustar o valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) (DEHGHANI et al., 2017).

3.3.2 Formação das microemulsões

A técnica da emulsificação consiste no modo de preparo de uma ME. Envolve a mistura de dois líquidos imiscíveis, juntamente com tensoativo e um cotensoativo na qual são usados para minimizar a tensão interfacial entre esses dois líquidos e através de rápida agitação formar uma emulsão estável (KUMAR et al., 2020).

Existem três teorias que explicam a formação de uma ME são elas: a teoria da solubilização explica que a ME é formada por meio do intumescimento das micelas, na qual a água é solubilizada nas micelas inversas (O/A) ou o óleo é solubilizado em micelas diretas (A/O).

A segunda é a teoria da tensão interfacial, uma tensão muito baixa é pré-requisito na formação de ME e os tensoativos de muita hidrofiliicidade ou lipofiliicidade são inapropriados para formulação desses sistemas (SANTIAGO, 2018). Por fim, a teoria da termodinâmica diz que a formação e estabilidade desses sistemas conseguem ser explicada pela variação da energia livre de Gibbs (ΔG). O processo espontâneo ocorre na direção da diminuição da energia livre do sistema, ou seja, o processo será espontâneo quando $\Delta G < 0$. A energia livre de formação de uma ME pode ser representada pela Equação 1:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (1)$$

Onde:

ΔG : energia livre de Gibbs

γ : tensão superficial O/A

ΔA : área superficial da gotícula

T: temperatura

ΔS : variação de entropia

De acordo com essa equação, ΔG depende da capacidade do tensoativo de reduzir a tensão superficial na interface água-óleo ou O/A, da variação da entropia do sistema e da variação da área superficial da gotícula, à temperatura constante. A formação de uma ME é acompanhada por um grande aumento da entropia do sistema e da área superficial da gotícula.

O principal parâmetro que define a formação da ME é a tensão superficial. Com o intuito de minimizar a tensão superficial da gotícula faz-se necessário o uso de tensoativos e cotensoativos. Com isso, o processo será termodinamicamente espontâneo e estável. Contudo, esse processo é lento devido à ocorrência de barreiras cinéticas, e a fim de suprir essas barreiras, aplica-se energia ao sistema, como por exemplo, energia mecânica ou térmica (SILVA et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O material utilizado no estudo foi:

- a) ciprofloxacino (HCL monohidratada), Fragon, Brasil;
- b) triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, All Chemistry, Brasil;
- c) Kolliphor[®] HS 15, Sigma Aldrich, USA;
- d) Span[®] 60, Sigma Aldrich, USA;
- e) água destilada
- f) ácido acético glacial P.A, Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil;
- g) hidróxido de sódio em micropérola P.A, Neon, Brasil;
- h) ágar Muller Hinton, Himedia, Brasil;
- i) microplaca 96 cavidades, Global Plast, China.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação do equilíbrio hidrófilo lipófilo do Kolliphor[®] HS 15

O EHL do Kolliphor[®] HS 15 foi determinado, pois de acordo com sua ficha técnica, ocorre uma variação entre 14 e 16. Com isso, foram preparadas emulsões utilizando Kolliphor[®] HS 15, Span[®] 60, TACC e água destilada, variando os componentes para obter emulsões em que o EHL do Kolliphor[®] HS 15 possuísse valores de 14; 14,5; 15; 15,5 e 16. Em um bécker adicionou os tensoativos e a fase oleosa submetendo ao aquecimento em banho maria (SOLAB SL155/10, Brasil) até a temperatura de 60 °C. Posteriormente, em outro bécker adicionou a fase aquosa e aqueceu até mesma temperatura. Adicionou-se a fase aquosa sobre a fase oleosa e deixou sob agitação durante 5 min. Depois de um período de 24 h foram analisadas macroscopicamente quanto a presença de separação de fases.

4.2.2 Construção do diagrama de fases pseudoternário

A construção do DFPT ocorreu com a mistura de 4 componentes: água destilada (fase aquosa), triglicérides do ácido cáprico-caprílico (TACC - fase oleosa), Kolliphor[®] HS 15/Span[®] 60 (tensoativos). Foi determinada a proporção dos tensoativos após a determinação do EHL do Kolliphor[®] HS 15, com a finalidade de se obter o EHL da mistura de tensoativos o mais próximo possível do EHL do TACC de acordo com a Equação 2:

$$EHL_{mistura\ tensoativos} = \frac{\%P_{Kolliphor^{\circledR}HS15} \times EHL_{Span^{\circledR}60} + \%P_{Span^{\circledR}60} \times EHL_{Span^{\circledR}60}}{100} (2)$$

A mistura de tensoativos Kolliphor[®] HS 15:Span[®] 60 (X:Y) foi adicionada a quantidade de TACC com o intuito de resultar nas seguintes proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. A mistura foi levada ao banho maria (SOLAB SL155/10, Brasil) e logo após a água destilada em volumes pré-definidos foi adicionada pelo o método de titulação. Submeteu-se a 2 ciclos de agitação em sonificador (DesruptorUltrasônico – Unique[®] DES 500, Brasil), por 3 min em potência de 250 W e banho de ultrassom (Lavadora Ultrassônica – Unique[®] USC 2800A, Brasil) pelo mesmo período de 3 minutos. Após este processo foi realizada a classificação visual dos sistemas obtidos em: separação de fases (SF), sistema líquido opaco (ELO), sistema líquido leitoso (ELL), sistema transparente bicontínuo (STB) e sistema transparente (ST). Os resultados da classificação dos sistemas serão transferidos para o programa Origin[®] Pro 8.0 para obtenção do modelo gráfico do diagrama.

4.2.3 Seleção das formulações e incorporação do ciprofloxacino

Posteriormente a construção do DFPT, foi selecionado um ponto da região ST, que é característico da região de formação de ME e assim foi definida as proporções de cada componente a ser utilizado na formulação. O CIPRO foi incorporado na concentração de 2,0 mg/mL.

O fármaco foi adicionado a mistura de tensoativos e óleo e seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para a produção do diagrama de fases pseudoternário. A mistura foi levada ao banho maria e, posteriormente, foi realizado dois ciclos de 3 minutos no sonificador e banho de ultrassom para remoção do excesso de bolhas.

4.2.4 Modificação do cloridrato de ciprofloxacino para sua forma básica

Foi realizada a solubilização de 1,0 g do cloridrato de CIPRO em 50 mL de água destilada, seguida da titulação com solução de hidróxido de sódio 1,0 N até o pH 7,4 [pHmetro digital (MS TECNOPON Instrumentação mPA210, Brasil)] ocorrendo a precipitação do fármaco. Posteriormente, o precipitado foi filtrado e mantido em bancada por 48 horas. Para comprovar a eficácia da obtenção do CIPRO, testou-se a sua solubilidade nos seguintes solventes: água destilada, acetato de etila, acetona, álcool etílico, clorofórmio, ácido acético, dimetilsulfóxido (DMSO) e tetraidrofurano (THF).

4.2.5 Caracterização físico-química e morfológica do sistema microemulsionado

4.2.5.1 *Análise macroscópica*

As formulações foram preparadas e após 48 horas em temperatura ambiente (25°C), avaliou-se as características organolépticas, homogeneidade da formulação, separação de fases ou presença de precipitado (CAVALCANTI et al., 2016).

4.2.5.2 *Determinação do pH*

O pH das formulações foi aferido por meio de pHmetro digital (MS TECNOPON Instrumentação mPA210, Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C (SAVIĆ et al., 2017). A análise foi realizada em triplicata no Laboratório de Físico-química da Farmácia Escola na Universidade Estadual da Paraíba – UEPB.

4.2.5.3 *Determinação da condutividade elétrica*

A condutividade das formulações foi aferida por meio de um condutivímetro digital (MS TECNOPON Instrumentação, mCA 150, Brasil), calibrado com solução de calibração apresentando condutância específica de $146,9 \mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C (NEVES et al., 2018). A análise foi realizada em triplicata no Laboratório de Físico-Química da Farmácia Escola da UEPB.

4.2.5.4 *Determinação do tamanho médio das gotículas*

A determinação do tamanho médio das gotículas foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) através do equipamento Nanotrak Wave (Model MN401,EUA). As medições foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90° com temperatura constante (25°C), as amostras foram colocadas diretamente nos sensores do equipamento (sem diluição) (POOMANEE et al., 2017; NEVES et al., 2018). A análise foi realizada em triplicata no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da UEPB.

4.2.5.5 *Índice de refração*

O índice de refração foi medido utilizando refratômetro de bancada tipo Abbé. O equipamento foi aferido com água deionizada ($n_D = 1,3333$) à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C (DAMASCENO et al., 2012).

A análise foi realizada em triplicata no Laboratório de Química da UEPB.

4.3 Avaliações de estabilidade preliminar

4.3.1 Teste de centrifugação

Amostras de cada formulação (1,0 mL) foi submetida à centrifugação em micro tubo de Eppendorf (Centrífuga Hettich – MIKRO 220 R, Alemanha), com ciclo de 13000 rpm (22760 g) por 30 min e por 1 h. Em seguida, foi observada a presença de separação de fases ou qualquer outra evidência de instabilidade nas amostras analisadas (XU et al., 2019). Esse experimento foi realizado no LDCPF da UEPB.

4.3.2 Estresse Térmico

As amostras do estresse térmico foram submetidas a temperaturas na faixa de 40 a 80 °C, com progressão da elevação da temperatura de 5 °C a cada 30 min em banho-maria (SOLAB SL155/10, Brasil). A presença de separação de fases ou qualquer outra evidência de instabilidade nas amostras analisadas foi avaliada ao final do experimento e após retornar à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (PATRIOTA, 2015). Essa análise foi realizada no LDCPF da UEPB.

4.3.3 Ciclo resfriamento/aquecimento

Para o ciclo resfriamento/aquecimento, as amostras foram submetidas a 5 ± 2 °C, em refrigerador (Consul Biplax, Brasil), por 24 h e 40 ± 2 °C por 24 h em estufa (TECNAL TE-394/2, Brasil). Ao final de 12 dias (6 ciclos) as formulações foram analisadas quanto ao pH, condutividade elétrica e índice de refração após o retorno à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (POOMANEE et al., 2017).

4.4 Análise microbiológica

4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima

Foram selecionadas cepas bacterianas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) para analisar a atividade antibacteriana. Posteriormente, foram preparados inóculos em solução

salina estéril (0,85%) tendo como parâmetro a escala de McFarlad 0,5 no comprimento de onda de 530 nm, fornecendo uma suspensão-padrão de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL.

4.4.2 Teste de microdiluição

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com os documentos M272A2 e M27S3 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com adaptações. Primeiramente foi efetuada a reativação das cepas, utilizando as placas de microdiluição com 96 poços dispostos em 12 colunas e 8 linhas, no qual foram inseridos 100µL de caldo Muller Hinton. A distribuição da análise consistiu em um microrganismo para cada placa, em que as 3 primeiras linhas foram atribuídas à análise da formulação e na quarta a microemulsão branca (ME-BR) para considerar possível atividade antimicrobiana dos tensoativos presentes na formulação. Dessa maneira, foram adicionados 100µL das formulações e, logo após, foi realizada a diluição seriada partindo da primeira linha (concentração inicial / 100%) sendo retirado 100µL do poço anterior para o posterior, até completar a última linha (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%, 0,048%, 0,024%), descartando os 100µL da última linha (NEVES et al., 2018).

4.4.3 Incubação

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Ao final das 24 h, a resazurina foi adicionada e as microplacas incubadas por mais de 4 horas para visualização dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo de pré-formulação

O EHL de um tensoativo é uma propriedade importante no processo de emulsificação, pois é um excelente indicativo do tipo de emulsão que será formada (OLIVEIRA, 2017). Ele reflete a afinidade do emulsificante com o óleo ou a água. Quanto mais altos os valores de EHL, maior a afinidade com a água. Geralmente, emulsificantes com EHL mais alto são mais adequados para emulsões do tipo O/A (LIAN et al., 2019).

O estudo de pré-formulação iniciou a partir da escolha dos componentes, baseando-se em obter formulações com EHL ideal, visando à formação ME O/A, além da adequação para via de administração parenteral. A princípio escolheu-se como tensoativos Kolliphor[®] HS 15 e Span[®] 60, como fase oleosa o TACC e como fase aquosa a água destilada.

O Kolliphor[®]HS 15 é um tensoativo não iônico de baixo peso molecular (~963,25 g/mol) composto por mono e diésteres de poliglicol do ácido 12-hidroxiestárico juntamente com cerca de 30% do polietilenoglicol (PEG) livre e apresenta EHL variando de 14 a 16 (GROTZ et al., 2017). É indicado para a fabricação de formulações parenterais aquosas, estando presente na Farmacopeia Alemã, Americana e Europeia com essa propriedade, além de ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* como excipiente para injeção. Sua alta capacidade de solubilização, termoestabilidade e boa biocompatibilidade o tornam um produto muito promissor para injeções (LU et al, 2015).

O monoestearato de sorbitano (Span[®]60) é um éster de sorbitano, derivado de sorbitol e ácido esteárico, utilizado principalmente como tensoativo não iônico, possui natureza lipofílica com um EHL de 5. Considerado seguro para uso humano, não mostrou evidência de atividade carcinogênica em humanos em diferentes níveis de dose, está disponível em alta pureza e amplamente utilizado com a aprovação do FDA para a indústria de alimentos e medicamentos (LOY, 2017). Nos estudos de Hsu et al. (2018) utilizaram o Span[®] 60 como um dos excipientes para o desenvolvimento de nanovesícula (fosfatiossomas) para administração intravenosa de CIPRO tendo em vista o tratamento da pneumonia.

O TACC uma mistura de triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média obtido por meio da esterificação dos ácidos graxos C₈ e C₁₀ com glicerina. Engloba quatro triglicerídeos de ácidos graxos, isto é, triglicerídeos de conteúdo C₈, dois triglicerídeos de ácidos graxos mistos e triglicerídeo com baixo teor de C₁₀ (ZHANG; WANG; LIU, 2016).

Tendo em vista a variação do EHL do Kolliphor[®] HS 15, fez necessária a realização do experimento para determinar o seu EHL real e, conseqüentemente, obter-se a proporção de tensoativo ideal, quando calculados pela a Equação 1 para a construção do DFPT. Preparou-se as emulsões a partir dos componentes com EHL conhecidos e após 24 h foram avaliadas macroscopicamente (Figura 4).

Figura 4 – Estudo do EHL do Kolliphor[®] HS 15



Fonte: dados da pesquisa.

Notou-se como resultado que a emulsão em que o Kolliphor[®] HS 15 adotou EHL de 16 não ocorreu separação de fases e a emulsão permaneceu estável, diferindo das outras emulsões com EHL mais baixo, na qual apresentaram processo de instabilidade e separação de fases. Confirmando dessa maneira, o EHL de 16 para o Kolliphor[®] HS 15.

Os tensoativos escolhidos para as formulações são não iônicos, considerados seguros, atóxicos, livres de irritações e biocompatíveis para via de administração parenteral, como também não são afetados pelas mudanças de pH nos meios (MADHI et al., 2011; RASHID et al., 2019). De acordo com o estudo de Pensado et al. (2016), esses componentes podem modular o sistema em termos de características físico-químicas, favorecer a interações com polímeros, estruturas biológicas ou alvos específicos e também facilitar a associação de insumos ativos lipofílicos e hidrofílicos.

5.2 Construção do diagrama de fases pseudoternário

A construção do DFPT é uma das formas mais eficazes de obter estudos sobre todos os tipos de formulações que podem ser formadas a partir da mistura de tensoativos, óleo e água

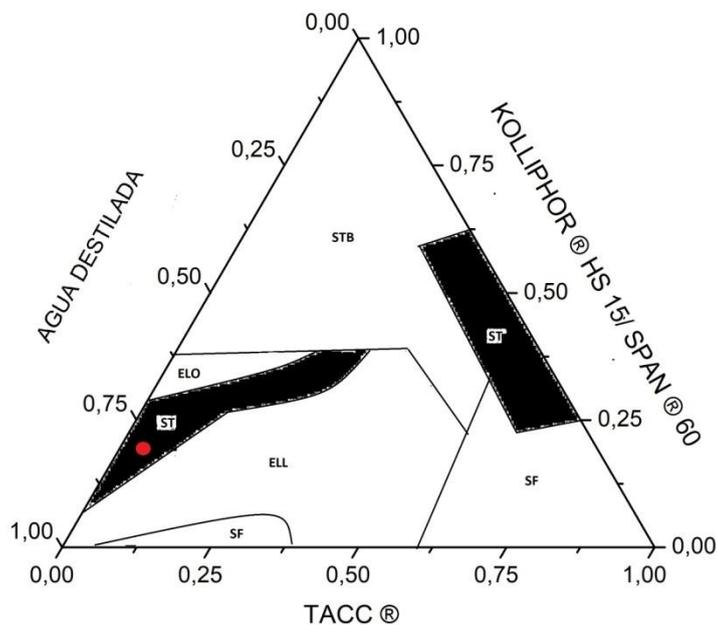
e, ao mesmo tempo, cobrir todas as probabilidades de proporções de mistura em uma maneira mais sistemática (PINERO et al., 2017).

O TACC, que consiste em uma mistura de triglicerídeos saturados de cadeia média, apresenta ótima estabilidade e resistência à oxidação justamente por sua alta concentração de ácidos graxos saturados, os quais são quimicamente conhecidos por sua dificuldade de degradação. Ele é indicado em produtos farmacêuticos de uso oral, tópico e injetável (ZHANG; WANG; LIU, 2016).

A proporção dos tensoativos utilizados para a obtenção de sistemas microemulsionados ocorreu com base no EHL da fase oleosa para se obter uma mistura ideal do sistema de tensoativos para estabilizar formulações (ARAÚJO, 2013; GUIMARÃES, 2013).

Iniciando-se a partir do valor requerido do EHL para o TACC (EHL: 15,36), construiu-se um diagrama de fases no qual a proporção de tensoativos é capaz de fornecer um valor próximo a este, favorecendo a formação de ME estáveis. Diante disso, utilizou-se a proporção de 9:1 para a mistura de Kolliphor® HS 15 (EHL: 16) e Span® 60 (EHL: 5). Nesta proporção foi possível obter formulações com EHL de 14,9 desejável por estar bem próximo ao valor de EHL da fase oleosa.

Figura 5– Diagrama de fases pseudoternário



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: ELL- Emulsão líquido leitosa, ELO- Emulsão líquido opaca, SF- Separação de fases, ST- Sistema transparente, ● Formação de microemulsão

5.3 Seleção das formulações

Realizada a construção do DFPT um ponto da região ST foi selecionado e os percentuais da sua composição está presente na Tabela 1. A região ST foi classificada como ME e escolhido pontos do DFPT que possuíam alto teor de fase aquosa, sendo assim, um indicativo de formulações de ME do tipo O/A eficaz para a incorporação do CIPRO, tendo em vista suas características lipofílicas.

Tabela 1 – Composição percentual (m/m) das formulações selecionadas

Componentes	Composição centesimal (%)
Água deionizada	75
TACC	5
Kolliphor [®] HS 15/Span [®] 60 (9:1)	20

Fonte: dados da pesquisa.

5.4 Modificação do cloridrato de ciprofloxacino em sua forma básica

Com o objetivo de comprovar a eficácia da metodologia empregada para retirada do sal do CIPRO, o teste de solubilização demonstrou a insolubilidade do CIPRO em água, comprovando que o fármaco não está na forma de sal (Figura 6). Ele mostrou-se solúvel apenas em ácido acético (FARMACOPEIA...,2019) e pouco solúvel em clorofórmio, acetato de etila, THF e DMSO (Figura 7).

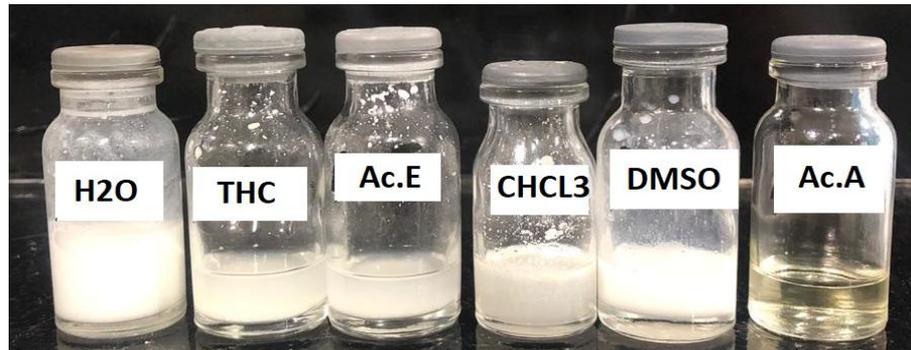
Figura 6 – Comparação do cloridrato de ciprofloxacino e CIPRO básico em água



Fonte: dados da Pesquisa

Legenda: tubo A, representa a solubilização do cloridrato de ciprofloxacino em água. Tubo B representa o ciprofloxacino na sua forma básica insolúvel em água.

Figura 7 – Teste de solubilidade em diferentes solventes



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: demonstração de insolubilidade do CIPRO em água (H₂O), pouco solúvel em tetraidrofurano (THF) acetato de etila (Ac.E) clorofórmio (CHCL₃) dimetilsulfóxido (DMSO) e solúvel em ácido acético (Ac.A).

5.5 Caracterização físico-química e morfológica das formulações

Para a incorporação do CIPRO na ME é necessário modificar o pH da formação devido ao seu ponto isoelétrico. Inicialmente, foi necessário acidificar o meio com ácido acético a 1,0 N para que o CIPRO pudesse migrar para a fase oleosa da ME, com um posterior ajuste do seu pH para próximo da neutralidade com hidróxido de sódio 1,0 N. Após um período de repouso de 48 h de formação da ME-CIPRO, foi observando que não ocorreu nenhuma precipitação separação de fases no sistemas e a formulação permaneceu límpida e homogênea como demonstrando na Figura 8.

Figura 8 – Aspecto macroscópico das formulações



Fonte: dados da pesquisa

Legenda: aspecto límpido e homogêneo das formulações ME-BR e ME-CIPRO

A determinação do pH em ME é um indicativo de sua estabilidade e aplicabilidade para via parenteral. A faixa de pH proposta pela Farmacopéia Brasileira para essa via encontra-se entre 6 e 9. A redução do pH pode indicar presença de ácidos graxos livres na formulação, proveniente da hidrólise de tensoativos. O ajuste do pH para preparações parenterais geralmente é realizada com solução de hidróxido de sódio. (BRUXEL et al., 2012). Segundo Ciríaco et al. (2019) ME com maior concentração de água pode apresentar pH mais ácido, porque esse maior teor de água resulta na ionização dos ácidos orgânicos presentes na formação e na liberação de mais prótons (H^+) no meio. Os valores de pH das formulações variaram entre 6,0 e 6,12 (Tabela 2) demonstrando que estão dentro do limite aceitável para essa via de administração.

Tabela 2 – pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas

Parâmetro	ME-BRANCA	ME-CIPRO
pH	6,12 ± 0,41	6,00 ± 0,00
Condutividade ($\mu S/cm$)	215,30 ± 4,99	1754,00 ± 141,00
Índice de Refração	1,363 ± 0,000	1,366 ± 0,000
Tamanho médio de gotículas (nm)	17,40 ± 0,90	17,80 ± 0,35

Fonte: dados da pesquisa.

A técnica da condutividade elétrica é utilizada para identificar mudanças estruturais nas ME, importante meio para determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos em um sistema microemulsionado (POH et al., 2019). Quando as ME apresentam suas microestruturas (A/O) a condutividade é baixa, isso deve-se ao fato das gotículas de água estarem isoladas pelo filme de tensoativos. Em contrapartida, valores acima de 70% de fase aquosa, a condutividade aumenta linearmente, indicando formação do sistema O/A. (NASCIMENTO, 2017; ASSIS, 2015). Os valores de 215,3 e 1754 $\mu S/cm$ obtidos da condutividade das formulações em estudo (Tabela 2) sugerem que se trata de sistemas do tipo O/A por sua predominância de fase aquosa. O alto valor de condutividade da ME-CIPRO pode ser justificado pelo método de incorporação do fármaco na ME, em que é utilizado ácido acético e isso gera a ionização da fase aquosa, elevando assim a condutividade da preparação (CALLENDER et al., 2017).

A determinação do tamanho médio de gotícula (TMG) é indispensável para a caracterização efetiva das ME. Isso ocorre porque um tamanho pequeno de gotículas na faixa de 5 a 200 nm é um dos critérios para evidenciar e diferenciar ME de nanoemulsões e emulsões comuns. (POH et al., 2019). Para obter gotículas com dimensões inferiores a 1,0 µm torna-se necessário submeter a emulsão a uma tensão de cisalhamento elevada. Segundo Souto et al. (2012) através de ultrassons ou a homogeneização de alta pressão, é possível reduzir o tamanho das gotículas da fase interna e, conseqüentemente, aumentar a superfície de contato entre ambas as fases.

Outros fatores limitantes para o TMG são a velocidade de agitação, tempo de síntese, cadeia alquílica do tensoativo e do óleo e a temperatura. Nas mesmas condições de preparação, quanto maior a velocidade, menor o TMG (MOURA et al., 2014). Além disso, baixos valores de TMG são capazes de resistir à separação gravitacional e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade do sistema de microemulsionado (CALLENDER et al., 2017).

O TMG das ME obtidas apresentou pequenos diâmetros, entre 16 e 18 nm, sendo viável sua aplicação para via parenteral. De acordo com o estudo de Lamaisakul et al. (2019), as ME tem se tornado um novo veículo para administração parenteral de fármacos, tendo em vista, a melhor especificidade com alvo e a atividade terapêutica. Nesse estudo, eles demonstraram que o tamanho de gotícula de 20-50 nm resultou em captação celular máxima e mais prontamente absorvida pelo sistema linfático e induziu com mais eficiência as células dendríticas.

Por fim, o índice de refração é um critério de relevância na avaliação da estabilidade da ME, no qual, permite a detecção de processos de inversão de fase, monitorando mudanças no desvio do plano de luz incidente das ME (CIRÍACO et al., 2019). Elas apresentaram um índice de refração próximo à água purificada (1,333), em torno de 1,366, portanto foram caracterizados como formulações claras e transparentes, corroborando com o estudo de Dehghani et al (2017) que obteve um resultado de 1,39, indicando a estrutura de gotículas de O/A.

5.6 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações

5.6.1 Teste de centrifugação

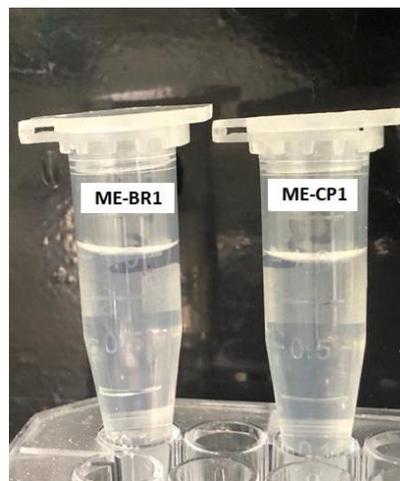
O estudo de estabilidade é de suma importância na formulação, sendo responsável por avaliar o período de tempo que o produto mantém suas características físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas. A estabilidade pode ser afetada por alterações extrínsecas:

tempo, temperatura, luz e oxigênio, como também alterações intrínsecas: pH, reações de oxido-redução, reações de hidrólise (MIRCO; ROCHA, 2015).

No teste de centrifugação, a força da gravidade atua sobre os produtos fazendo com que as gotículas se movam no seu interior. Promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto, coalescência, entre outras (FIGUEIREDO, 2014; ISAAC, 2009; SILVA, 2009).

As formulações foram submetidas ao teste de centrifugação por 30 min e 1 h. Como resultado, as amostras de ME-CIPRO e ME-BRANCA não mostraram alteração, não houve separação de fases, turbidez ou qualquer precipitação de fármaco.

Figura 9 – Formulações após centrifugação

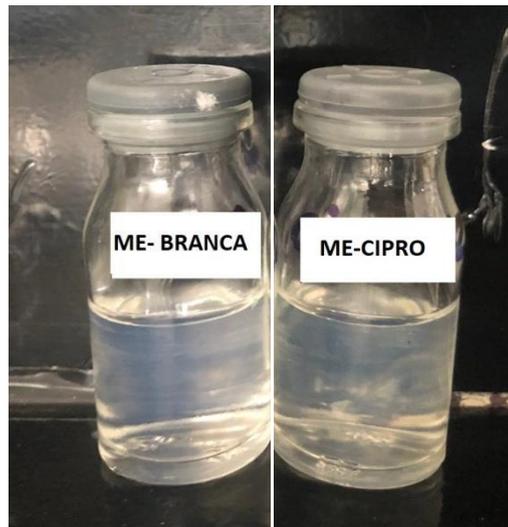


Fonte: dados da pesquisa.

5.6.2 Estresse térmico

No teste de estresse térmico são aplicadas condições extremas de temperatura em períodos pré-determinados de tempo. As amostras foram expostas a uma faixa de temperatura de 40 a 80°C, com aumento gradual da temperatura de 5 em 5 °C, por 30 min em cada temperatura. Tanto as ME-BRANCA quanto as ME-CIPRO mantiveram a estabilidade até 80°C. Ao fim do teste, as formulações permaneceram transparentes, límpidas e homogêneas (Figura 9). Além disso, não apresentaram separação de fases ou presença de precipitado.

Figura 10 – Formulações após estresse térmico

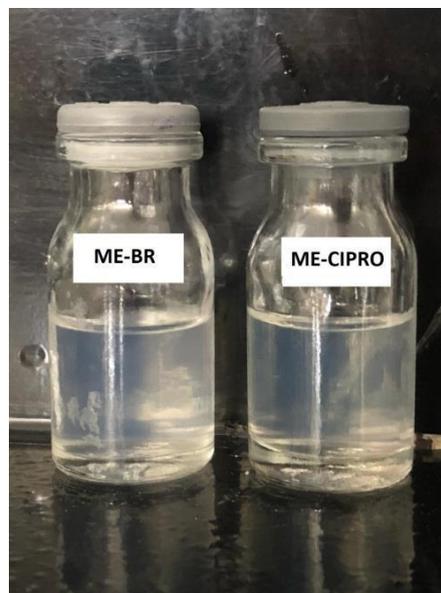


Fonte: dados da pesquisa.

5.6.3 Ciclo resfriamento/aquecimento

O estudo de estabilidade dos fármacos é um fator minucioso para possibilitar uma terapia medicamentosa apropriada, contudo, podem ser afetada pela ocorrência de instabilidades químicas, físicas e microbiológicas, incluindo as reações típicas de degradação como, hidrólise, oxidação (ZILKER;SÖRGEL;HOLZGRABE, 2019). As amostras (Figura 10) submetidas aos 6 ciclos de resfriamento e aquecimento permaneceram estáveis. Isso comprovou a elevada estabilidade do sistema desenvolvido.

Figura 11 – Formulações após ciclo resfriamento/aquecimento



Fonte: dados da pesquisa.

Foi determinado o pH, condutividade elétrica, índice de refração (Tabela 3) após estudo de estabilidade preliminar para avaliar possíveis alterações nas formulações, e obteve-se como resultado similaridade média do índice de refração e condutividade, porém uma diminuição no pH das formulações para em torno de 5,5. Segundo Crepaldi et al (2010) a faixa de pH de risco para as complicações da terapia intravenosa corresponde aos valores inferiores a 5,5 e superiores a 8,0, em seu estudo foi determinado o pH dos antibióticos de administração parenteral após diluição, obtendo como resultado para o cloridrato de vancomicina o valor de pH 2,7 e para o sulfato de amicacina valores de pH inferiores a 5,5. Diferente deles, o pH das ME permaneceram adequados para o uso intravenoso.

Tabela 3 – pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas após estudo de estabilidade preliminar

Parâmetro	ME-BRANCA	ME-CIPRO
pH	5,48±0,39	5,52±0,11
Condutividade (µS/cm)	228,7±12,75	1.914± 67,27
Índice de Refração	1,362±0,00	1,361±0,00

Fonte: dados da pesquisa.

5.7 Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima

O teste de suscetibilidade antimicrobiana torna-se viável para descoberta e previsão de resultado terapêutico. A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo em tubos ou poços de microdiluição (BALOUIR, 2016).

É desejável para a qualidade dos antimicrobianos, que este apresente eficácia na menor concentração possível de princípio ativo. Quanto menor a concentração do fármaco, menor será a incidência de efeitos indesejáveis (MORAES et al., 2018).

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, as condições utilizadas propiciaram o crescimento bacteriano, tendo em vista que o controle composto apenas com o meio de cultura e o inóculo apresentaram crescimento. O TACC, Kolliphor[®] H15 e Span[®] 60 presentes na formulação não possuem efeito antimicrobiano. Demonstrou-se (Tabela 4) CIM de 0,48 µg/mL (diluição até 0,048%) para as cepas *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). E de 31,25 µg/mL (diluição até 0,78%) para *E. coli* (ATCC 25922). A formulação ME-BR mostrou crescimento bacteriano, evidenciando que a mesma não possui atividade antimicrobiana.

Tabela 4– Concentração inibitória mínima em relação às diluições (%) da microemulsão testada frente às cepas bacterianas

Cepas bacterianas	ME- CIPRO (CIM)	ME- BRANCA
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,48 µg/MI (0,048%)	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,48 µg/mL (0,048%)	R
<i>Escherichia coli</i>	31,25 µg/mL (0,78%)	R

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: R é a ausência de efeito.

Segundo o estudo de Dong et al. (2019) foi possível observar que o CIPRO pode ser uma boa opção de tratamento para infecções bacterianas associadas a biofilme. Obteve como resultados sub concentração inibitória mínima (sub-MIC) do CIPRO reduzindo a virulência de isolados de *E.coli* e redução da patogenicidade de *P. aeruginosa*, corroborando dessa maneira com o presente estudo.

5 CONCLUSÃO

A obtenção do DFPT mostrou-se como uma ferramenta útil e prática para identificar a região de formação de ME e para selecionar a formulação ideal, com proporções adequadas dos componentes, para incorporar o CIPRO. A caracterização físico-química demonstrou que a formulação apresenta pH em torno da neutralidade, que a ME é do tipo O/A e que o tamanho médio das gotículas estão bem abaixo de 100 nm. Diante da exposição ao estudo de estabilidade preliminar, as formulações mantiveram-se límpidas, homogêneas, sem qualquer indício de instabilidade e apresentaram atividade bem evidente contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Portanto, todos esses resultados sugerem que a ME-CIPRO é uma alternativa muito promissora para uso pela via parenteral (intravenosa), tendo em vista as vantagens desse sistema de liberação quando comparado à forma convencional, reduzindo possíveis reações adversas e resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUMANEI, M.H.; ABDELBARY, A.A.; IBRAHIM, I.T; TADROS, M.I.; KOLALY, M.T. Design and development of microemulsion systems of a new antineoplaston A10 analog for enhanced intravenous antitumor activity: *In vitro* characterization, molecular docking, 125I-radiolabeling and *in vivo* biodistribution studies. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 545, n. 1-2, p. 240-253, 2018.

ALMEIDA, A. C.; TORQUETTI, C.; FERREIRA, P.O.; FERNANDES, R. P.; SANTOS, E.C.; KOGAWA, A.C.; CAIRES, F. J. Cocrystals of ciprofloxacin with nicotinic and isonicotinic acids: mechano chemical synthesis, characterization, thermal and solubility study. **Thermochimica Acta**, New York, p. 178346, 2019.

ALÓS, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Spain, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2, 6ª Ed. Brasília, 2019.

ARAÚJO, G. M. F. **Nanoemulsões de Anfotericina B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

ASSIS, G. B. D. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo óleo essencial de alecrim- *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

AZEVEDO, M.G. B.; FALCÃO, J. S.A. Microemulsão de Cetoconazol para Incorporação em xampu. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, Sergipe, v. 8, n. 1, p. 4271-4282, 2018.

BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, S.; MANDAL, S.M. Fluoroquinolone antibiotics show genotoxic effect through DNA-binding and oxidative damage. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, New York, p. 117634, 2019.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S.L.] v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

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**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

CAO, X.L.; ZHANG, Q.H.; PAN, X.H.; CHEN, Z.; LU, J. Mechanochemical synthesis of nano-ciprofloxacin with enhanced antibacterial activity. **Inorganic Chemistry Communications**, Amsterdam, v. 102, p. 66-69, 2019.

- CALLENDER, S. P.; MATHEWS, J. A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S. D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.
- CAVALCANTI, A. L. M.; REIS, M. Y. F. A.; SILVA, G. C. L.; RAMALHO, Í. M. M.; GUIMARÃES, G. P.; SILVA, J. A.; SARAIVA, K. L. A.; DAMASCENO, B. P. G. L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: *In vitro* release and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 506, n. 1-2, p. 351-360 2016.
- CIRÍACO, S. L.; CARVALHO, I. P. S.; NETO, J. A. T.; NETO, J. D. S. L.; DE OLIVEIRA, D. H. B.; CUNHA, A. P. G. P.; MORENO, M. Z. D. L. C. Development of microemulsion of tamsulosin and dutasteride for benign prostatic hyperplasia therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 110573, 2019.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-- Ninth Edition. CLSI document M07-A9. wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012.
- CONCEIÇÃO, C. A.F. **Formulação e caracterização de microemulsões para pré-tratamento de biodiesel em medidas eletroanalíticas**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química Industrial) Universidade Federal do Maranhão, 2016.
- CREPALDI, R.M.C.; MONTEIRO, C.; PETERLINI, M.A.S.; PEDREIRA, M.L.G.; Potencial hidrogeniônico de antimicrobianos, segundo os fatores ambientais temperatura e luminosidade. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 146-154, 2010.
- CRUZ, K. G. **Sistemas microemulsionados á base de tensoativos hidrocarbônicos para a aplicação como suportes para dispersão de compostos antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; DOMINICI, V. A.; URBANO, I. A.; SILVA, J. A.; ARAÚJO, I. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; SILVA, A. K. A.; MEDEIROS, A. C.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, S. T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 8, n. 2, p. 290-300, 2012.
- 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 de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.
- DEGHANI, F.; FARHADIAN, N.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; BIRIAEE, A.; EBRAHIMI, M.; KARIMI, M. Preparation, characterization and *in-vivo* evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 96, p. 479-489, 2017.

- DONG, G.; LI, J.; CHEN, L.; BI, W.; ZHANG, X.; LIU, H.; ZHI, X.; ZHOU, T.; CAO, J. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 23, n. 1, p. 15-21, 2019.
- FIGUEIREDO, B. K.; MARTINI, P. C.; MICHELIN, D. C. Desenvolvimento e estabilidade preliminar de um fitocosmético contendo extrato de chá verde (*Camelliasinensis*)(L.) Kuntze (Theaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 770-788, 2014.
- FILLOUX, C.; GÉNIAUX, H.; BUXERAUD, J. Risques associés aux fluoroquinolones. **Actualités Pharmaceutiques**, [S.L.], v. 58, n. 588, p. 53-55, 2019.
- GROTZ, E.; BERNABEU, E.; PAPPALARDO, M.; CHIAPPETTA, D.A.; MORETTON, M.A. Nanoscale Kolliphor® HS 15 micelles to minimize rifampicin self-aggregation in aqueous media. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 41, p. 1-6, 2017.
- GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- HSU, C.; SUNG, C.T.; ALJUFFALI, I.A.; CHEN, C.H.; HU, K.; FRANG, J. Intravenous anti-MRSA phosphatidylcholine liposomes mediate enhanced affinity to pulmonary surfactants for effective treatment of infectious pneumonia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, New York, v. 14, n. 2, p. 215-225, 2018.
- HUANG, A.; DAI, H.; WU, X.; ZHAO, Z.; WU, Y. Synthesis and characterization of mesoporous hydroxyapatite powder by microemulsion technique. **Journal of Materials Research and Technology**, [S.L.] v. 8, n. 3, p. 3158-3166, 2019.
- ISA, T.; ZAKARIA, Z.A.B.; RUKAYADI, Y.; HEZMEE, M.N.M.; JALI, A.Z.; IMAM, M.U.; HAMMADI, N.I.; MAHMOOD, S.K. Antibacterial activity of ciprofloxacin-encapsulated cockle shells calcium carbonate (Aragonite) nanoparticles and its biocompatibility in macrophage. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 713, 2016.
- ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORREA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2009.
- JALIL, M. E. R.; BASCHINI, M.; SAPAG, K. Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. **Applied Clay Science**, New York, v. 114, p. 69-76, 2015.
- KUMAR, H.; SARMA, A. K.; KUMAR, P. A comprehensive review on preparation, characterization, and combustion characteristics of microemulsion based hybrid biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, New York, v. 117, p. 109498, 2020.

- LAMAIKUL, S.; TANTITUVANONT, A.; LIPIUN, V.; RITTHIDEJ, G. Development of novel cationic microemulsion as parenteral adjuvant for influenza vaccine. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], 2019.
- LIAN, H.; PENG, Y.; WANG, Q. Effect of emulsifier hydrophilic-lipophilic balance (HLB) on the release of thyme essential oil from chitosan films. **Food Hydrocolloids**, [S.L.] v. 97, p. 105213, 2019.
- LIMA, C. A.; TOLEDO, R. V. Análise do ciprofloxacino em amostras de medicamentos de referência, similar e genérico por espectroscopia no infravermelho. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do vale do Paraíba, São Paulo, CEP, v. 12244, p. 000, 2016.
- LIN, C.; LEE, C. Adsorption of ciprofloxacin in water using Fe₃O₄ nanoparticles formed at low temperature and high reactant concentrations in a rotating packed bed with co-precipitation. **Materials Chemistry and Physics**, New York, v. 240, p. 122049, 2020.
- LIU, R.; HU, S.; ZHANG, Y.; CHE, D.; CAO, J.; WANG, J.; ZHAO, T.; JIA, Q.; WANG, N.; ZHANG, T. Mast cell-mediated hypersensitivity to fluoroquinolone is MRGPRX2 dependent. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 70, p. 417-427, 2019.
- LOY, O. Span 60 como uma matriz de microesferas: preparação e caracterização *in vitro* de novas microesferas de ibuprofeno-Span 60. **Journal of Surfactants and Detergents**. Berlim, v. 20, n. 1, p. 219-232, 2017.
- LU, H.; LI, J.; LI, M.; GONG, T. Systemic delivery of alpha-asarone with Kolliphor HS 15 improves its safety and therapeutic effect on asthma. **Drug delivery**, London, v. 22, n. 3, p. 266-275, 2015.
- LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York, v. 58, n. 2, p. 265-278, 2004.
- MARTINS, S. **Quinolonas em química medicinal**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Algarve, 2014.
- MENEZES, Y.M. S. Remoção de HPA em água produzida utilizando sistema microemulsionado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2017.
- MIRCO, J.; ROCHA, M. S. D. Estudo de estabilidade de medicamentos. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 2, n. 7, 2015.
- MOURA, M. R.; AOUADA, F.A.; SOUZA, J. R.; MATTOSO, L.H.C. Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 24, n. 4, p. 486-490, 2014.
- MORAES, A. C.; KOTZENT, S.; FERNANDES, D.C.; ETO, S.F.; PRADO, E.J.R.; BELO, M.A.A. Determinação da concentração inibitória mínima e bactericida da amoxicilina para bactéria *S. agalactiae* isolada de tilápia do nilo. **Ars Veterinaria**, [S.L.], p. 193-195, 2018.

NASCIMENTO, V. D. S. A. **Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *Lippiagracilis*: obtenção, caracterização e potencial ação amebicida.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Sergipe, 2017.

NEVES, J. K. O.; APOLINÁRIO, A. C.; SARAIVA, K. L. A.; SILVA, D. T. C.; REIS, M. Y. F. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; PESSOA-JÚNIOR, A.; GALVÃO, M. A. M.; SOARES, L. A. L.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; SILVA, J. A.; CONVERTI, A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* hayne oil-resin: challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 111, p. 185-192, 2018.

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**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 689-696, 2008.

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

OLIVEIRA, F. S. **Revisão da importância do estudo do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e determinação do EHL do óleo de pracaxi (*Pentaclethra macroleoba*)** Trabalho de Conclusão de curso em Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.

PATRIOTA, Y. B. G. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de microemulsão contendo derivado tiofênico para administração oral.** 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

PENSADO, A.; PASTOR, M.M.; ZORZI, G.Z.; CARVALHO, E.D.; SANCHEZ, A. Structural analysis of nanosystems: Solid Sorbitan esters Nanoparticles (SSN) as a case study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York v. 104, p. 189-199, 2016.

PINEROS, I.; SLOWING, K.; SERRANO, D. R.; PABLO, E.; BALLESTEROS, M. P. Analgesic and anti-inflammatory controlled-released injectable microemulsion: pseudo-ternary phase diagrams, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 220-227, 2017.

POH, Y.; N, G. S.; H, O. K.; Formulation and characterisation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate-in-oil microemulsions as the potential vehicle for drug delivery across the skin barrier. **Journal of Molecular Liquids**, v. 273, p. 339-345, 2019.

POOMANEE, W.; CHAIYANA, W.; WICKETT, R. R.; LEELAPORNPID, P. Stability and solubility improvement of Sompoi (*Acacia concinna* Linn.) pod extract by topical microemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 4, p. 386-393, 2017.

RAHDAR, A.; TABOADA, P.; HAJINEZHAD, M.R.; BARANI, M.; BEYZAEI, H. Effect of tocopherol on the properties of Pluronic F127 microemulsions: physico-chemical

characterization and in vivo toxicity. **Journal of Molecular Liquids**, New York, v. 277, p. 624-630, 2019.

RASHID, M. A.; NAZ, T.; ABBAS, M.; NAZIR, S.; YOUNAS, N.; MAJEED, S.; QURESHI, N.; AKHTAR, M. N. Microemulsões carregadas com cloranfenicol: desenvolvimento, caracterização e estabilidade. **Comunicações de ciência de colóides e interfaces**, v. 28, p. 41-48, 2019.

SANTIAGO, P. V. T. **Estudo das propriedades das fibras de coco modificadas com sistemas microemulsionados**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.

SAVIĆ, V.; TODOSIJEVIĆ, M.; ILIĆ, T.; LUKIĆ, M.; MITSOU, E.; PAPADIMITRIOU, V.; SAVIĆ, S. Tacrolimus-loaded lecithin-loaded microemulsions with better skin penetration: structure characterization and in vitro / in vivo performance. **International Journal of Pharmaceutics**, New York, v. 529, n. 1-2, p. 491-505, 2017.

SILVA, J. R. **Desenvolvimento de metodologia para eletrodegradação de ciprofloxacina por agentes oxidantes gerados *in situ***. Dissertação (Mestre em Química) Universidade Federal de Sergipe, 2012.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y.P.; PIATNICKI, C.M.S.; BOCKEL, W.J.; MENDONÇA, C.R.B. B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, p. 1196-1206, 2015.

SUBONGKOT, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. **International Journal of Nanomedicine**, [S.L.], v. 12, p. 5585, 2017.

SUÁREZ, J.A.; SÁNCHEZ, F.G.; CANO, F.; SANTOS, G.G.; INGLESÍAS, M.A.R. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of toxigenic clinical isolates of *Clostridium difficile* causing infections in the south of Spain. **Anaerobe**, Spain, v. 54, p. 146-150, 2018.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

XIAO, X.; WANG, F.; ZHOU, J.; LUO, J.; LI, J.; YI, X. Entrega oral de óleo de semente de coix em microemulsão o / a: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo*. **Journal of Drug Delivery Ciência e Tecnologia**, [S.L.], v. 54, p. 101325, 2019.

XU, W.; JIAO, W.; LI, S.; TAO, X.; MU, G. Bimatoprost loaded microemulsion laden contact lens to treat glaucoma: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, p. 101330, 2019.

ZHANG, H.; WANG, Z.; LIU, O. Simultaneous determination of Kolliphor HS15 and Miglyol 812 in microemulsion formulation by ultra-high performance liquid chromatography coupled with nano quality analyte detector. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.6, n.1, p. 11-17, 2016.

ZILKER, M.; SÖRGEL, F.; HOLZGRABE, U.; Uma revisão sistemática da estabilidade de produtos farmacêuticos acabados e substâncias medicamentosas além das datas de validade rotuladas. **Jornal de análises farmacêuticas e biomédicas**, [S.L.], 2019.