



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**AMARO CÉSAR LIMA DE ASSIS**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
MICROEMULSÕES CONTENDO AZITROMICINA**

**CAMPINA GRANDE**

**2017**

AMARO CÉSAR LIMA DE ASSIS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
MICROEMULSÕES CONTENDO AZITROMICINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em farmácia da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. BOLÍVAR PONCIANO GOULART DE LIMA DAMASCENO

**Co-orientador:** Me. MYSRAYN YARGO DE FREITAS ARAÚJO REIS

CAMPINA GRANDE

2017

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 de Conclusão de Curso.

A848d Assis, Amaro Cesar Lima de.  
Desenvolvimento, caracterização e atividade antibacteriana de microemulsões contendo Azitromicina [manuscrito] / Amaro Cesar Lima de Assis. - 2017  
52 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

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

"Coorientação: Prof. Me. Me. Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Microemulsões. 2. Azitromicina. 3. Infecções cutâneas oportunistas. 4. Atividade antibacteriana.

21. ed. CDD 615.329

**AMARO CÉSAR LIMA DE ASSIS**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE MICROEMULSÕES CONTENDO AZITROMICINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em farmácia da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

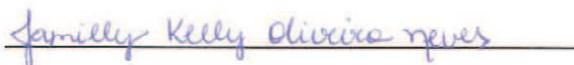
Aprovado em 13/11/2017.



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



Profª. Drª. Rosemary Sousa Cunha Lima / UEPB  
Examinadora interna



Profª. Me. Jamilly Kelly Oliveira Neves / Faculdade Maurício de Nassau  
Examinadora externa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **CÉSAR ROBERTO COSTA DE ASSIS E MARIA LIMA DE ASSIS**, por todo o amor, toda a fé e esperança depositadas em mim, todas as palavras de incentivo, toda a dedicação e esforço para me tornarem o que sou hoje. É com muito orgulho que posso olhar para trás e ver como os melhores valores e princípios do caráter humano me foram repassados de forma exemplar, tudo que sou devo a vocês. A satisfação é indescritível de chegar até aqui depois de tantos momentos difíceis, de tanta saudade de casa e da convivência, então como não lembrar de todas as ligações, de todos os abraços na chegada e na partida e até mesmo das tímidas lágrimas que por vezes escorreram nestes momentos. O melhor de tudo é saber que o sorriso e a felicidade prevaleceram durante esse tempo, e que agora se tornarão mais frequentes em nossas vidas. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu irmão, **JUVÊNCIO CÉSAR LIMA DE ASSIS**, que como irmão mais velho sempre foi uma referência pra mim, obrigado por tudo, pelo amor, pelos melhores conselhos nas horas difíceis, pelos ensinamentos e como já disse em outras oportunidades, tive sorte de ter você como irmão e o privilegio de poder contar com você sempre. Te amo muito!

Agradeço a toda minha família, por toda a força e pela torcida por mim, só muito grato por ter uma família tão grande, unida e íntegra. Não posso esquecer de citar e agradecer especialmente aos meus tios César, Damião e Tilo, e ao meu primo Dyllan, obrigado a todos pelo carinho e por todos os momentos felizes que passamos juntos ao longo desses anos, vocês são uma motivação pra mim e me tornam uma pessoa melhor.

Agradeço a Naiane Carlos, minha namorada, por todo amor, pelo respeito, por sua importância para mim, afinal, mesmo com a distância foi a pessoa mais presente em minha vida durante esses últimos cinco anos. Sabemos de todas as dificuldades que passamos, algumas vezes chegamos a pensar que não íamos conseguir ficar juntos, mas nosso amor foi mais forte que tudo. Te amo!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Bolivar P. G de L. Damasceno, por todos os ensinamentos, oportunidades concedidas e pela amizade. Muito obrigado por tudo, professor!

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos farmacêuticos, em especial meu co-orientador Yargo Araújo, obrigado por todos os ensinamentos, paciência, atenção e amizade. Agradeço também a Natan, Yuri, Pedro, Vandiará e Fellipe, obrigado pela amizade, pelo aprendizado, pela força e todos os momentos de descontração.

Agradeço aos meus amigos do Ceará que vieram juntos e dividiram esses cinco anos de moradia e convivência comigo. Obrigado William, Gleuber e Paulo, pela compreensão, paciência e amizade.

Agradeço aos meus amigos da graduação, em especial Carlos Augusto, obrigado pela amizade e por sempre ter dado força nos momentos que precisei, é um irmão pra mim. Agradeço também a todos os amigos do grupo de whatsapp "Amigos de CG" (Allison Sousa, Alisson Roney, Natan, Yuri, Gustavo, Pedro, Kyllman, Edimar e Rafael).

Agradeço a todos os meus amigos de Icó-CE, obrigado pela força, amizade e por todos os momentos de descontração.

Por último, agradeço a todos os professores e funcionários da UEPB, aqueles que participaram direta e indiretamente desta jornada. Obrigado pela atenção, dedicação, pelo conhecimento compartilhado e pela nobre tarefa de formar profissionais.

## RESUMO

A pele é um órgão complexo que apresenta funções fundamentais para os seres humanos, dentre estas a peculiaridade de atuar como barreira biológica contra patógenos. Embora diversos patógenos façam parte de sua microbiota natural, algumas espécies oportunistas como, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* podem desencadear processos infecciosos causando doenças no tecido. Atualmente, a azitromicina tem-se destacado como antibiótico macrolídeo semisintético da classe dos azalídeos que apresenta amplo espectro de ação, além de boa capacidade de penetração nos tecidos. A busca do uso de fármacos em novos sistemas de liberação tem crescido nos últimos anos, nesse contexto, a nanotecnologia aparece com maior destaque. As inovações na área buscam a vetorização do fármaco para o seu alvo terapêutico. Desta forma, é possível diminuir a toxicidade, diminuir o número de doses, controlar a liberação e evitar a degradação ou inativação do mesmo. Dentre os novos sistemas de liberação de fármaco, as microemulsões (MEs) apresentam-se como boa alternativa para administração de fármacos para uso tópico. Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade de MEs contendo azitromicina (AZ) para uso tópico contra cepas oportunistas que causam infecções bacterianas. As formulações desenvolvidas a partir do diagrama de fases pseudoternário (DFPT) foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada, microscopia eletrônica de transmissão, condutividade e medição de pH. A atividade antibacteriana foi avaliada por microdiluição em caldo utilizando placas estéreis de 96 poços. Por meio do desenvolvimento de um DFPT foi possível selecionar e reproduzir MEs do tipo óleo em água (O/A) compostas por água deionizada (fase aquosa), miristato de isopropila (fase oleosa), LAS<sup>®</sup> e Brij<sup>®</sup> 52 (tensoativos na proporção 9:1) para a incorporação de AZ. As formulações sem e com a presença do fármaco (MEB e MEAZ, respectivamente) se apresentaram como sistemas límpidos e sem formação de precipitados. Para a MEAZ, o valor de pH (6,75) indicou uma ótima compatibilidade para administração cutânea. Além disso, a sua elevada condutividade ( $630,1 \mu\text{Scm}^{-1}$ ) sugeriu um sistema do tipo O/A. O caráter isotrópico foi confirmado pela técnica de microscopia de luz polarizada. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicou o tamanho de gotículas nanométrico dos sistemas e a técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) foi capaz de medir um diâmetro de  $18,72 \pm 0,63$  e  $20,89 \pm 0,24$  nm, para a MEB e MEAZ, respectivamente, com índice de polidispersidade (IPD) de  $0,172 \pm 0,005$  e  $0,166 \pm 0,008$ , respectivamente. Por último, foi atestada a atividade antimicrobiana da MEAZ contra as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Estudos necessários para traçar o perfil de liberação serão conduzidos para que a ME desenvolvida possa representar uma nova alternativa segura e eficaz no tratamento complementar das infecções bacterianas na pele.

**Palavras-chave:** Microemulsões. Azitromicina. Infecções cutâneas oportunistas. Diagrama de fases pseudoternário.

## ABSTRACT

The skin is a complex organ that presents fundamental functions for humans, among them the peculiarity of acting as a biological barrier against pathogens. Although several pathogens are part of their natural microbiota, some opportunistic species such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* can trigger infectious processes causing disease in the tissue. Currently, azithromycin has been highlighted as a semisynthetic macrolide antibiotic of the azalide class, which has a broad action spectrum, as well as good tissue penetration capacity. The search for the use of drugs in new release systems has grown in recent years, in this context, nanotechnology appears more prominently. Innovations in the area seek to vectorize the drug to its therapeutic target. In this way, it is possible to decrease the toxicity, decrease the number of doses, control the release and prevent degradation or inactivation of the same. Among the new drug delivery systems, microemulsions (MEs) are a good alternative for administration of drugs for topical use. The objective of this study was to develop, characterize and evaluate the activity of ME containing azithromycin (AZ) for topical use against opportunistic strains that cause bacterial infections. The formulations developed from the pseudoternary phase diagram (DFPT) were characterized by polarized light microscopy, transmission electron microscopy, conductivity and pH measurement. The antibacterial activity was evaluated by broth microdilution using sterile 96-well plates. Through the development of a DFPT it was possible to select and reproduce oil-in-water (O / W) MEs composed of deionized water (aqueous phase), isopropyl myristate (oily phase), LAS<sup>®</sup> and Brij<sup>®</sup>52 (surfactants in the proportion 9: 1) for the incorporation of AZ. The formulations without and with the presence of the drug (MEB and MEAZ, respectively) presented as clear and non-precipitated systems. For MEAZ, the pH value (6.75) indicated an excellent compatibility for dermal administration. In addition, its high conductivity ( $630.1\mu\text{Scm}^{-1}$ ) suggested an O / W type system. The isotropic character was confirmed by the technique of polarized light microscopy. Transmission electron microscopy (MET) indicated the nanometric droplet size of the systems and the dynamic light scattering (DLS) technique was able to measure a diameter of  $18.72 \pm 0.63$  and  $20.89 \pm 0.24$  nm, for MEB and MEAZ, respectively, with polydispersity index (PDI) of  $0.172 \pm 0.005$  and  $0.166 \pm 0.008$ , respectively. Finally, the antimicrobial activity of MEAZ against the strains of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. coli* was attested. Studies necessary to trace the release profile will be conducted so that the developed ME may represent a new safe and effective alternative in the complementary treatment of bacterial infections in the skin.

**Keywords:** Microemulsions. Azithromycin. Opportunistic skin infections. Pseudoternario phase diagram.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da azitromicina diidratada.....	17
Figura 2 - Classificação dos tipos de microemulsões de acordo com a fase dispersa e dispersante. ....	20
Figura 3 - Representação esquemática da construção do diagrama de fases pseudoternário. ....	27
Figura 4 - Diagrama de fases pseudoternário para o sistema LAS <sup>®</sup> /BRIJ <sup>®</sup> 52 (9:1), miristato de isopropila e água deionizada. ....	33
Figura 5 - Aparência macroscópica das MEs antes e após a incorporação do fármaco.....	35
Figura 6 - Estrutura do processo semi-sintético de produção de azitromicina a partir da eritromicina. ....	36
Figura 7 - Fotomicrografias das MEs selecionadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição em porcentagem das MEs óleo-em-água na presença e ausência de AZ.....	34
Tabela 2 - Caracterização físico-química das MEs na presença e ausência de AZ..	35
Tabela 3 - Parâmetros de tamanho de gotículas, IPD e potencial zeta com e sem azitromicina incorporada.....	38
Tabela 4 - Determinação da Concentração Mínima (CIM) das formulações produzidas. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A/O</b>	Água-em-óleo
<b>AZ</b>	Azitromicina
<b>DFPT</b>	Diagrama de fases pseudoternário
<b>EHL</b>	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
<b>IBP</b>	Infecção bacteriana da pele
<b>IPD</b>	Índice de polidispersão
<b>ME</b>	Microemulsão
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>O/A</b>	Óleo-em-água
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>R</b>	Raio
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SF</b>	Separação de fases
<b>SLL</b>	Sistema líquido leitoso
<b>SLO</b>	Sistema líquido opaco
<b>ST</b>	Sistema transparente

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>16</b>
2.1	INFEÇÕES BACTERIANAS DA PELE	16
2.2	AZITROMICINA	17
2.3	MICROEMULSÕES	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>25</b>
4.1.1	Matérias-primas, reagentes, soluções e solventes	25
4.1.2	Equipamentos e vidrarias	25
<b>4.2</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.2.1	Seleção dos componentes da microemulsão	26
4.2.2	Construção do diagrama de fases pseudoternário	26
4.2.3	Seleção das microemulsões e incorporação da azitromicina	27
4.2.4	Caracterização físico-química das microemulsões	28
4.2.4.1	Determinação do pH	28
4.2.4.2	Condutividade elétrica	28
4.2.4.3	Índice de refração	28
4.2.4.4	Centrifugação	28
4.2.5	Caracterização morfológica das microemulsões	29
4.2.5.1	Microscopia de luz polarizada	29
4.2.5.2	Tamanho de gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta	29
4.2.5.3	Microscopia eletrônica de transmissão	29
4.2.6	Determinação da atividade antibacteriana	30
4.2.6.1	Preparo do inóculo	30

4.2.6.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
5.1 SELEÇÃO DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO .....	32
5.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO .....	33
5.3 SELEÇÃO DAS MICROEMULSÕES E INCORPORAÇÃO DA AZITROMICINA.....	34
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES .....	35
5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROEMULSÕES .....	38
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	41
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

*Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, sendo bastante complexo, com no mínimo cinco tipos diferentes de células que contribuem para a sua estrutura, além, de outros tipos de células temporariamente presentes a partir dos sistemas circulatório e imunológico (FORTES & SUFFREDIN, 2014). Possui diversas funções consideradas vitais como regulação térmica e metabólica, sensação de tato e de dor, atua como barreira biológica contra patógenos e agressões ambientais, desta forma, é o órgão mais acessível do corpo humano e, por estar exposto, é o mais frequentemente traumatizável, portanto é um dos órgãos mais sujeitos a infecções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As infecções cutâneas envolvem uma grande diversidade de agentes etiológicos e mecanismos patogénicos múltiplos, podendo ser classificadas em primárias ou secundárias (dependendo da existência ou não de uma porta de entrada anterior a infecção), aguda ou crônica (de acordo com a duração da infecção), podendo ainda ser mono ou polimicrobianas (BRASIL, 2013). Essas infecções ocorrem mais frequentemente, quando a pele ou barreiras de proteção são rompidas depois da inserção de um corpo estranho, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Apesar de muitas vezes serem indicadas como condições clínicas comuns, as infecções podem evoluir para estados mais graves aumentando o risco de morte (RAY, SUAYA & BAXTER, 2013). Ao ocorrer alguma agressão que gere perda do tecido cutâneo é necessária uma rápida intervenção, afim de que se regenere a viabilidade celular e as propriedades inerentes ao tecido (SILVA et al., 2013).

Dentre os fármacos usados na clínica para o tratamento de infecções, a azitromicina passou a destacar-se pela redução dos efeitos adversos, com melhoria no espectro de ação, quando comparada a outros fármacos, como a eritromicina, sendo aplicado no tratamento de infecções por doenças sexualmente transmissíveis, doenças do trato respiratório e infecções da pele e dos tecidos moles (GANDHI, 2004). O entendimento de que este fármaco apresenta uma alta capacidade de penetração nos tecidos, bem como possui um vasto espectro de ação contra diversas espécies bacterianas torna essa molécula viável ao tratamento de

infecções tópicas, mediante a sua encapsulação em uma forma farmacêutica adequada (ZUCKERMAN, 2004).

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármacos tem aumentado nos últimos anos. Neste contexto se inserem os recentes avanços da nanotecnologia farmacêutica e o conceito dos novos sistemas transportadores de fármacos, sendo estes capazes de compartimentalizar uma substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverão exercer seu efeito farmacológico. Estes produtos apresentam finalidade de melhorar o tratamento das doenças, aumentando a eficácia da terapia, reduzindo a toxicidade dos fármacos e facilitando a adesão do paciente ao tratamento (DAMASCENO, 2010).

Dentre os novos sistemas de liberação, destacamos as microemulsões pela capacidade de permitir altas taxas de penetração do fármaco em camadas profundas do estrato córneo quando comparada a formulações ditas convencionais, sendo considerada como sistema terapêutico promissor que facilita a permeação e o direcionamento eficiente do ativo na pele (SILVA et al., 2010). As microemulsões são consideradas dispersões de aspecto isotrópico e transparente formada por dois líquidos imiscíveis, usualmente óleo e água, estabilizadas por um filme de tensoativo e/ou co-tensoativos (GHOSH et al, 2013). Além disso, esses sistemas apresentam como características o tamanho reduzido de gotículas, estabilidade termodinâmica, capacidade de solubilização de fármacos hidrofílicos e lipofílicos e baixa viscosidade (KREILGAARD, 2002).

Assim, o presente projeto objetivou na encapsulação de AZ em sistemas microemulsionados dirigido ao tratamento de infecções cutâneas, com a proposta de uma terapia não invasiva, que seja segura baseada na diminuição de reações adversas e no aumento da eficácia do fármaco veiculado sobre patologias bacterianas.

*Fundamentação Teórica*

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS DA PELE

A pele (também chamada de tegumento ou *cútis*) é um órgão complexo e heterogêneo, responsável pelo revestimento do organismo humano que isola os componentes orgânicos do meio externo (MORAES et al., 2013). É considerada o maior órgão do corpo humano, ocupa em média uma área de 2 m<sup>2</sup>, que corresponde a cerca de 16% do peso corporal total. A pele é formada pela epiderme, a derme e uma camada subcutânea, a hipoderme. A transmissão de estímulos e sensações, a regulação da temperatura corporal e a proteção são as principais funções exercidas por este órgão. (PAILLER-MATTEI et al., 2007; RIBEIRO, 2010).

Dentre as três funções principais, a função barreira se destaca como a mais importante, pois ela atua como uma fronteira ativa que se interpõe entre o organismo e o ambiente. Sendo um importante componente do sistema imune exercendo como principal mecanismo de defesa o desencadeamento da inflamação, uma resposta natural do organismo contra uma infecção ou lesão, com o objetivo de destruir os agentes agressores (ABBAS et al., 2011). Além disso, a pele possui funções como regulação metabólica e a presença de células queratinizadas que são capazes de evitar perda de água transepitelial, retardando assim os processos de desidratação e evitando processos bruscos de atritos (KENDALL & NICOLAOU, 2013).

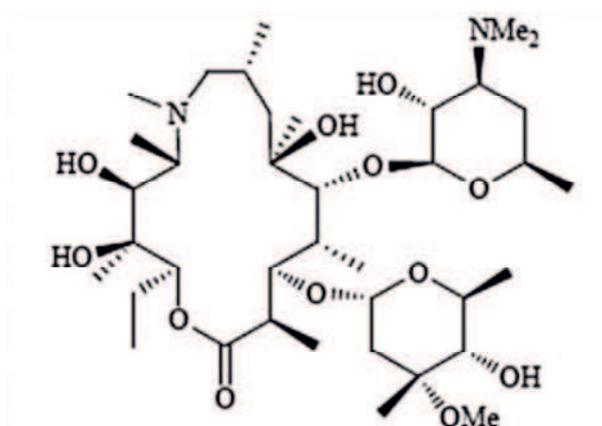
Por ser a primeira barreira de proteção contra patógenos, ficar mais exposta e ser mais frequentemente traumatizável, a pele é o órgão mais susceptível a infecções. Doenças infecciosas ocorrem quando um patógeno, microrganismo capaz de promover doença, invade o hospedeiro susceptível, efetuando pelo menos uma parte do seu ciclo de vida dentro ou sobre o corpo do hospedeiro que, com frequência, resulta em uma doença (TORTORA et al., 2016). Segundo Kish et al. (2010), as infecções bacterianas da pele (IBP) são enfermidades causadas quando bactérias invadem a epiderme e tecidos moles adjacentes e nela produzem manifestações clínicas variadas a depender do tipo de agente bacteriano, sendo as mais comuns a presença de eritema, edema, calor e dor ou sensibilidade.

As IBPs são causadas principalmente por bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (BOUCHER et al, 2014). Além desses, é relatado que algumas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* é capaz de formar biofilme na superfície cutânea (PEREIRA, 2014). Uma vez presentes, essas bactérias podem levar ao surgimento de diversos tipos de IBPs desde as menos complicadas, tais como, impetigo, celulite, erisipelas e furúnculos, até doenças mais graves, como a síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (RAJAN, 2012).

## 2.2 AZITROMICINA

A azitromicina (AZ) é um antibiótico azalídeos obtido de forma semissintética pertencente à classe dos macrolídeo. Derivada da eritromicina diferencia-se pela presença de um nitrogênio incorporado ao seu anel lactona, ou seja, um membro a mais se comparado com a eritromicina. Segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), a AZ pura apresenta-se como um pó cristalino branco e a sua forma diidratada ( $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$ ) possui massa molecular de 785,02 g/mol. Possui pouca solubilidade em água e hidróxidos alcalinos, solúvel em clorofórmio, e facilmente solúvel em etanol e metanol. A fórmula molecular da AZ pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural da azitromicina diidratada.



Fonte: Yan et al, 2015.

A AZ é comumente prescrita para pacientes ambulatoriais para tratamento de infecções respiratórias, infecções do trato urinário, doenças sexualmente transmissíveis e infecções da pele e dos tecidos moles (RAO & GOWTHAM A., et al., 2014). Reconhecida como um dos antibióticos de largo espectro de ação mais utilizado para o tratamento de uma variedade de infecções comunitárias (SAMPSON et al., 2014; SHARMA & JUN, 2014). O seu mecanismo de ação antibacteriano está relacionado com a inibição da síntese proteica bacteriana através da sua ligação com a subunidade ribossomal 50S, impedindo a fixação do RNAt ao ribossomo, bloqueando o aporte de aminoácidos (PARNHAM et al., 2014).

Em relação às suas características farmacocinéticas, absorção de AZ por via oral é relativamente rápida, com largo volume de distribuição pelos fluidos e tecidos infectados e liberação ótima no sítio de ação da infecção. É fracamente metabolizada e não possui metabólitos ativos (KAUSS et al, 2012; PARNHAM et al, 2014).

Uma das principais características que podem fazer da AZ uma molécula promissora no tratamento de IBPs é a sua capacidade de penetração nos tecidos. Essa característica é resultante da substituição de um grupamento carbonila do nono carbono do anel lactônico por um nitrogênio ligado a um grupamento metil, conferindo melhor estabilidade ácida. Logo, a atividade da AZ já foi comprovada no tratamento de infecções da pele e tecidos moles (ZUCKERMAN, 2004). Além disso, os pacientes que se apresentam como alérgicos às penicilinas e pacientes infectados com *S. pyogenes* podem recorrer aos macrolídeos, tais como eritromicina e AZ, como alternativa no tratamento de enfermidades cutâneas (KISH, CHANG & FUNG, 2010).

Os efeitos colaterais mais comuns relacionados ao uso da AZ ocorrem no trato gastrointestinal e incluem principalmente diarreia, náuseas, vômitos, desconforto abdominal, cefaleia branda e tontura. Os testes de função hepática também podem apresentar discretas elevações (CARVALHO; CARVALHO 1998).

Apesar de vários estudos relatarem a utilização tópica da AZ para o tratamento de enfermidades oculares, estudos que relatam a administração tópica desse fármaco para o tratamento de infecções cutâneas ainda é escasso, sendo mais comumente utilizada a via oral (FOULKES et al, 2013).

## 2.3 MICROEMULSÕES

Nos últimos anos, a tecnologia farmacêutica com o uso da nanotecnologia tem despertado o aumento do interesse nas pesquisas em novos sistemas de liberação de fármacos, buscando a vetorização das moléculas, aumento da eficácia, e diminuição dos efeitos indesejáveis para otimizar a terapia (WOLINSKY et al., 2012).

Vários sistemas que visam controlar a velocidade de liberação e direcionar o alvo terapêutico têm sido objetos de investigação na indústria farmacêutica. Os nanocarreadores destacam-se por apresentarem características diferentes dos carreadores convencionais (MONTENEGRO et al, 2016). Sistemas desenvolvidos na ordem dos nanômetros permitem níveis de interação entre os fármacos e os alvos terapêuticos em um grau de especificidade maior quando comparado às formas convencionais, essas interações mais específicas permitem a diminuição da toxicidade (SILVA, 2004). Dentre os nanocarreadores podem-se citar as nanopartículas, lipossomas, dendrímeros, nanoemulsões e microemulsões (McCLEMENTS, 2012; MUKHERJEE et al, 2015).

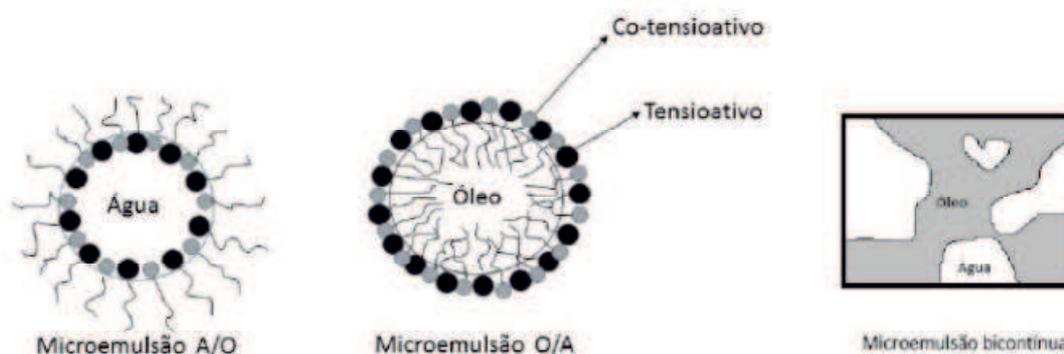
As microemulsões (ME) foram citadas inicialmente em 1943 por Hoar e Schulman, estes a descreveram como sistemas translúcidos, isotrópicos, termodinamicamente estáveis, não irritantes a pele e com baixa tensão interfacial (DAMASCENO et al, 2011; CASTRO, 2014; SANTOS 2015). Atualmente pode-se descrever uma ME como sendo uma dispersão de dois líquidos imiscíveis (polaridades opostas) estabilizados por um filme de tensoativos, sendo estes os responsáveis por se organizarem entre os líquidos de acordo com sua afinidade permitindo assim a diminuição na tensão interfacial, desta forma o sistema apresenta-se como isotropicamente límpido e termodinamicamente estável (OKUR et al, 2011; ALKRAD, MRESTANI & NEUBERT, 2016; HOU, XU, 2016).

Os sistemas microemulsionados são excelentes veículos, pois possibilitam o transporte de compostos lipofílicos e hidrofílicos, desta forma, oferecem diversas vantagens para uso farmacêutico, incluindo a facilidade de preparação, estabilidade termodinâmica e elevada capacidade de transportar fármacos por meio das barreiras biológicas (ACOSTA, 2010).

Do ponto de vista farmacotécnico, as MEs são formadas por uma fase aquosa, uma fase oleosa, tensoativos e eventualmente, um co-tensoativo. Existem três tipos de ME: Óleo-em-água (O/A), água-em-óleo (A/O) e sistemas bicontínuos (DAMASCENO et al., 2011). No primeiro caso, o componente lipofílico se encontra disperso em pequenas gotículas coloidais no componente hidrofílico. Nas MEs A/O, a fase interna é composta pelo componente hidrofílico, onde as gotículas de água ficam dispersas na fase externa (componente lipofílico). As ME do tipo bicontínuas se caracterizam pela formação de canalículos ao invés de gotículas (FORMARIZ et al., 2005; DAMASCENO et al., 2011). Ressaltando que, a fase dispersa apresenta diâmetro na ordem dos nanômetros ( $r < 100 \text{ nm}$ ), o que confere uma maior estabilidade contra a agregação das próprias gotículas. (KIM et al., 2008).

A Figura 2 mostra a representação esquemática dos três tipos de MEs.

Figura 2 - Classificação dos tipos de microemulsões de acordo com a fase dispersa e dispersante.



Fonte: (Adaptado de Lawrence et al., 2000)

Os diagramas de fases são comumente utilizados no desenvolvimento das MEs. Esta ferramenta permite a expressão gráfica das proporções de cada componente, assim como o aspecto e o número de fases de uma ME. Sua interpretação permite uma avaliação e escolha de uma região cujo aspecto e a composição seja mais favoráveis ao tipo de fármaco a ser veiculado e do local de aplicação (GUIMARÃES, 2013). Os diagramas de fases podem ser obtidos por titulação ou por preparo de várias amostras com diferentes percentuais de composição. O método de titulação apresenta-se como mais prático e rápido, possibilitando também a análise de um número maior de preparações (DAMASCENO, 2011).

Os diagramas de fase representam graficamente por meio de vértices de um triângulo a quantidade em percentual (0 a 100%) da fase oleosa, fase aquosa e tensoativo, sendo assim chamado de diagrama de fases ternário. Quando a esta composição adiciona-se um segundo tensoativo, chamado de cotensoativo, denominamos a representação de diagrama de fases pseudoternário (SILVA et al., 2009).

Tendo como base as informações levantadas, passaremos a expor os objetivos desse trabalho.

*Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado contendo AZ visando a sua aplicação como adjuvante no tratamento das IBPs.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) para obtenção regiões opticamente transparentes, presumivelmente, os sistemas microemulsionados.
- Selecionar e reproduzir os pontos de ME mais apropriados para a incorporação da AZ.
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das MEs na presença e ausência do fármaco através de pH, condutividade elétrica, índice de refração e centrifugação.
- Avaliar a estrutura morfológica da fase dispersa a partir das análises de microscopia de luz polarizada, tamanho de gotículas, índice de polidispersão (IPD), potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão.
- Realizar estudo de atividade antimicrobiana *in vitro*.

***Material e Métodos***

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Matérias-primas, reagentes, soluções e solventes

- Água deionizada (proveniente do equipamento de osmose reversa GEHAKA<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil)
- Brij<sup>®</sup> 52- Éter hexadecílico de polietilenoglicol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha)
- LAS<sup>®</sup> - PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Brasquim<sup>®</sup>, Brasil)
- Azitromicina (Pharma Nostra<sup>®</sup>, Brasil)
- Miristato de Isopropila (Via Farma<sup>®</sup>, Brasil)

#### 4.1.2 Equipamentos e vidrarias

- Analisador de partículas (Zetasizer, modelo Nano-ZS90, Malvern<sup>®</sup>, Reino Unido)
- Balança Analítica (Adventurer<sup>®</sup>, Ohaus, México)
- Banho de Ultrassom (Unique<sup>®</sup>, Brasil)
- Condutivímetro mCA 150 (MS Tecnopon<sup>®</sup>, Brasil)
- Desruptor de células ultrassônico - sonicador (Unique<sup>®</sup>, Brasil)
- Medidor de pH (Instrutemp<sup>®</sup>, ITmPA 210, Brasil)
- Microcentrífuga de bancada NI1801 (Nova Instruments<sup>®</sup>, Brasil)
- Microscópio petrográfico de luz polarizada (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha)
- Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo Tecnai Spirit Biotwin G<sup>2</sup> (FEI, Estados Unidos)
- Refratômetro de Abbé (Biobrix<sup>®</sup>, Brasil)
- Sistema purificador de água OS10LX (Gehaka<sup>®</sup>, Brasil)

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Seleção dos componentes da microemulsão

A seleção dos componentes que iriam compor os sistemas microemulsionados foi realizada com base nos seus valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e característica de irritabilidade cutânea. Além disso, propriedades como capacidade de solubilização de fármacos hidrofóbicos e utilização dos componentes em sistemas nanoestruturados também foram analisadas.

### 4.2.2 Construção do diagrama de fases pseudoternário

Os sistemas microemulsionados foram obtidos pela utilização da ferramenta diagrama de fases pseudoternário (DFPT) a partir da mistura de quatro componentes: água deionizada (fase aquosa), miristato de isopropila (fase oleosa), LAS/Brij®52 (tensoativos) em proporções definidas. A proporção de 9:1 para LAS/Brij® 52 foi definida após a realização dos cálculos de EHL para equiparar ao valor de EHL dessa mistura de tensoativos em função do valor de EHL do MIR baseados na equação 1 (WEERAPOL et al, 2014):

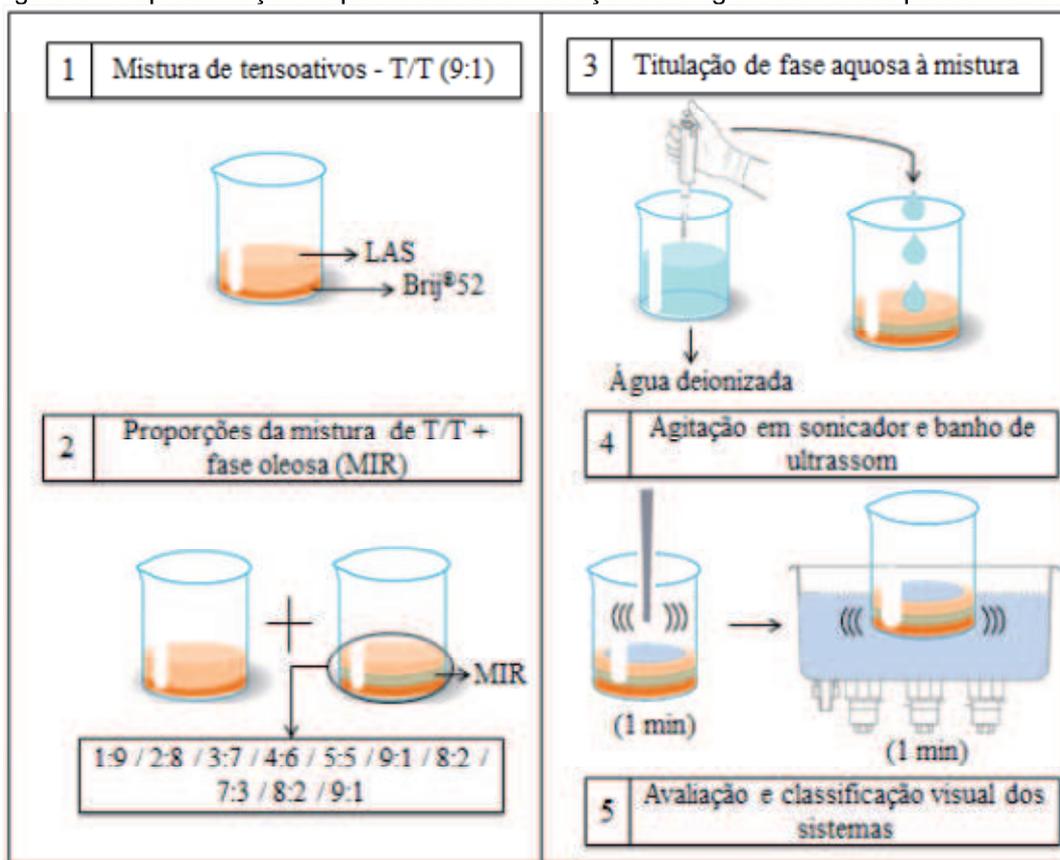
$$EHL_{mistura\ tensoativos} = \frac{\%m_{LAS^{\circledR}} \times EHL_{LAS^{\circledR}} + \%m_{Brij^{\circledR}\ 52} \times EHL_{Brij^{\circledR}\ 52}}{100} \quad (1)$$

Onde, %m é a porcentagem em massa para os tensoativos e EHL é o valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo específico para cada tensoativo.

A essa mistura de tensoativos na referida proporção foram adicionadas quantidades de miristato de isopropila (MIR) a fim de resultar nas seguintes proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, respectivamente. Posteriormente, a água deionizada foi adicionada a cada uma dessas proporções pela titulação de volumes pré-definidos, sendo que a cada titulação a mistura foi submetida à agitação em disruptor de células ultrassônicas (sonda de ultrassom) por 1 minuto em potência de 250 Watts e levada ao banho de ultrassom por um período de 1 minuto (CAVALCANTI et al, 2016). Após todo esse processo, ocorreu a classificação visual dos sistemas obtidos em: separação de fases (SF); sistema

líquido leitoso (SLL); sistema líquido opaco (SLO); sistemas transparentes (ST). Os resultados da classificação dos sistemas foram transferidos para o programa Origin<sup>®</sup> Pro 8.0 onde se obteve o modelo gráfico do diagrama. A representação metodológica da construção do diagrama de fases pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática da construção do diagrama de fases pseudoternário.



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.2.3 Seleção das microemulsões e incorporação da azitromicina

Considerando a identificação de regiões de sistemas transparentes no DFPT, foi selecionada uma formulação para a incorporação da AZ. Essa formulação foi preparada por agitação dos componentes em sonda de ultrassom por três ciclos de 1 minuto sendo que a cada ciclo a formulação foi submetida ao banho de ultrassom por 1 minuto. Para a formulação na presença do fármaco, este foi inicialmente disperso na mistura de óleo e tensoativos antes da adição de água e início dos ciclos.

Uma vez reproduzidas as formulações, decorreu-se o prazo de 48 horas – no intuito de se constatar a sua estabilidade sob repouso e à temperatura ambiente – para iniciar os testes de caracterização do referido sistema.

#### 4.2.4 Caracterização físico-química das microemulsões

##### 4.2.4.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi mensurado utilizando pHmetro digital com eletrodo e sensor de temperatura previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, à temperatura de  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O eletrodo foi introduzido diretamente em um volume de 10 mL de cada formulação. Todas as análises foram feitas em triplicata. As análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) – UEPB.

##### 4.2.4.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das formulações foi avaliada por meio de condutímetro digital, previamente calibrado com solução de calibração apresentando condutividade de  $146,9 \mu\text{S cm}^{-1}$  à temperatura de  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O eletrodo foi introduzido diretamente em um volume de 10 mL da formulação. Todas as análises foram feitas em triplicata. As análises foram realizadas no LDCPF – UEPB.

##### 4.2.4.3 Índice de refração

O índice de refração foi mensurado utilizando refratômetro de bancada do tipo Abbé, previamente calibrado com água destilada (índice de refração=1,3325) à temperatura de  $24\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Todas as análises foram feitas em triplicata. As análises foram realizadas no LDCPF – UEPB.

##### 4.2.4.4 Estudo de estabilidade preliminar (centrifugação)

A presença de modificações na estabilidade das MEs foi estudada quando estas foram submetidas a uma força centrípeta. Para isso, uma alíquota de 1 mL das formulações foram colocadas em tubos do tipo *Eppendorf* e submetidas à rotação de

14000 rpm durante trinta minutos em microcentrifuga. As formulações foram classificadas em límpidas (para a ausência de modificações visuais) e separação de fases. Todas as análises foram feitas em triplicata. As análises foram realizadas no LDCPF – UEPB.

#### 4.2.5 Caracterização morfológica das microemulsões

##### 4.2.5.1 Microscopia de luz polarizada

Para confirmar as características isotrópicas, as formulações foram analisadas pela técnica de microscopia de luz polarizada. Para isso, uma gota das formulações na ausência e presença do fármaco foi colocada sobre uma lâmina de vidro e cobertas com uma lamínula para serem analisadas no microscópio petrográfico de luz polarizada Carl Zeiss®. Essa análise foi realizada no Laboratório de Geologia da UFCG.

##### 4.2.5.2 Tamanho de gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta

A determinação do tamanho de gotículas dos sistemas microemulsionados foi realizada por meio de um analisador de partículas (Zetasizer Nano-ZS9 Malvern, Reino Unido) pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS) no Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID- UFRN). A leitura foi realizada em temperatura ambiente com ângulo fixado em 173°. Simultaneamente à análise descrita, as medidas de IPD e potencial zeta também foram mensuradas. Todas as análises foram feitas em triplicata

##### 4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Os sistemas microemulsionados foram submetidos à análise em microscópio eletrônico de transmissão operando com tensão de aceleração de 80 kV para observação da morfologia das gotículas dos sistemas. Volumes de 5-10 µL das amostras foram adicionados em grades de cobre (Ted Pella Inc, Califónia, USA) revestidas com filme de holey carbon e abertura de 200 mesh. A leitura ocorreu 24 h após a fixação por secagem ao ar das amostras nas grades. As análises foram

realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas, localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Pernambuco.

#### 4.2.6 Determinação da atividade antibacteriana

##### 4.2.6.1 Preparo do inóculo

Culturas de cepas bacterianas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus* (25923), *Staphylococcus epidermidis* (12228) e *Escherichia coli* (25922) foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana das MEs em estudo. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (0,85%) de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland, equivalente a  $5 \times 10^6$  células/mL. Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) – UEPB, sendo a análise realizada no mesmo local.

##### 4.2.6.2 Ensaio *in vitro*

A avaliação antibacteriana da MEB e MEAZ foi testada pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas estéreis de 96 poços de fundo chato como preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (BALOUIRI, SADIKI & IBNSOUDA, 2016). Inicialmente foram dispensados nos poços uma quantidade de 100 µL de caldo Mueller Hinton, seguido de 100 µL da MEAZ em concentração de 1024 µg/mL que foram diluídas sucessivamente até 1 µg/mL. Após as diluições, foram adicionados 10 µL do inóculo de cada cepa de bacteriana utilizada. Foi utilizada uma coluna para o meio contendo cada cepa com o caldo Mueller Hinton e caldo Mueller Hinton sem inóculo. Após as diluições, as placas foram levadas à incubação por 24 h a 37°C e ao final deste tempo o crescimento bacteriano foi visualizado por meio da adição de 20 µL do corante resazurina (0,1%) em cada poço.

## *Resultados e discussão*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SELEÇÃO DOS COMPONENTES DA MICROEMULSÃO

A seleção dos componentes que irão formar o sistema microemulsionado é de grande importância no desenvolvimento de formulações. Para MEs de uso tópico a escolha de componentes que não provoquem irritação da pele e que permitam um aumento na permeação do fármaco é fundamental. Desta forma, estas características foram adotadas como critério de seleção dos componentes.

Com base em levantamento literário, o MIR é largamente citado como componente no desenvolvimento de MEs para veiculação de fármacos, principalmente destinados à via tópica e transdérmica por agir como promotor de permeação, e ainda em aplicações biológicas (BARDHAN et al, 2013; LANE, 2013). Dentre as diferentes classes de tensoativos, os tensoativos não iônicos são conhecidos por exibir uma menor capacidade de promover irritação ou hemólise em superfície celulares, além de não alterar o pH fisiológico, quando utilizado como agente solubilizante (KUMAR & RAJESHWARRAO, 2011; MAHALE et al, 2012). O LAS<sup>®</sup>, tensoativo não iônico, merece destaque pela sua utilização no aumento da solubilidade de fármacos hidrofóbicos por meio de sistemas de liberação nanoestruturados (DJEKIC et al, 2012; LI, YI & LAM, 2013; SILVA et al, 2014; CAVALCANTI et al, 2016; DAS, PARTA & MITRA, 2016). Além do LAS<sup>®</sup>, o Brij<sup>®</sup>52 pode ser citado como tensoativo não-iônico empregado em formulações tópicas (GUPTA et al, 2011; PRAJAPATI et al, 2012; CAVALCANTI et al, 2016).

Outro fator importante para a formação de sistemas microemulsionados é a consideração do valor de EHL. Segundo Damasceno et al (2011) esse dado revela a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula dos tensoativos. O EHL do óleo tem influência direta sobre a escolha e proporção da mistura dos tensoativos, de forma que, este dado influencia em maior êxito no preparo das formulações, em que, sistemas estáveis estão diretamente ligados a aproximação dos valores de EHL entre a fase oleosa e tensoativos empregados. (ORAFIDIYA & OLADIMEJI, 2002).

Assim, segundo os fabricantes, considerando o valor de 11,5 como sendo o valor EHL para o MIR, foi utilizada a proporção de 9:1 para a mistura de LAS<sup>®</sup> (EHL:

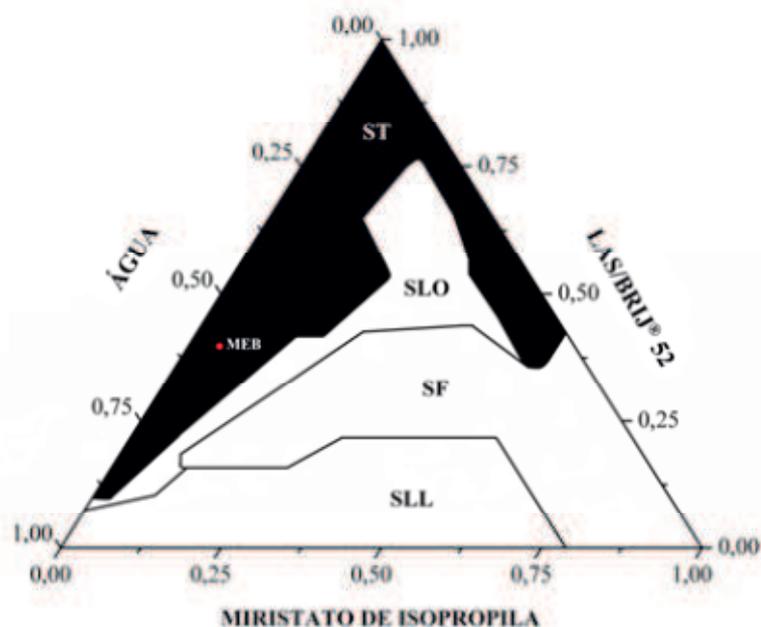
12) e Brij<sup>®</sup>52 (EHL: 5), respectivamente. Mediante essa proporção, o EHL final dessa mistura foi de 11,3, valor desejável uma vez que estava bem próximo ao valor de EHL da fase oleosa. Dessa forma, por atenderem todas essas necessidades, os tensoativos LAS<sup>®</sup> e Brij<sup>®</sup>52, juntamente com o MIR, foram selecionados para seguir o estudo com a construção do diagrama de fases pseudoternário.

## 5.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO

Após definir os componentes, seguiu-se para a construção do DFPT, sendo esta técnica uma das ferramentas mais utilizadas para estudar o comportamento de dispersões, como as MEs, constituídas por vários componentes. Por meio desse método, uma representação gráfica dos domínios de regiões de ME pode ser obtida, tendo como vantagem a escolha da região cuja viscosidade (dentre outras características) são mais apropriadas para a incorporação do fármaco (DAMASCENO et al, 2011; MA et al, 2015). Pelo fato de ser um método simples, reproduzível e eficaz na obtenção de sistemas microemulsionados, a técnica de titulação de fase aquosa foi a de escolha para a construção do DFPT.

A Figura 4 representa o DFPT construído pela mistura de LAS<sup>®</sup> e Brij<sup>®</sup>52 (9:1), MIR e água deionizada.

Figura 4 - Diagrama de fases pseudoternário para o sistema LAS<sup>®</sup>/BRIJ<sup>®</sup>52 (9:1), miristato de isopropila e água deionizada.



Fonte: Dados do autor.

Legenda: ST = sistema transparente; SLO = sistema líquido opaco; SLL = sistema líquido leitoso; SF = separação de fases; ● MEB.

Ao analisar o diagrama obtido, pode ser observada a ocorrência de quatro diferentes regiões: sistema líquido opaco (SLO); sistema líquido leitoso (SLL); separação de fases (SF) e sistemas transparentes (ST). Sendo este último, caracterizados como sistemas homogêneos, límpidos e translúcidos.

### 5.3 SELEÇÃO DAS MICROEMULSÕES E INCORPORAÇÃO DA AZITROMICINA

A partir da região ST foi selecionado um ponto do diagrama correspondente a ME do tipo O/A. A proporção de cada componente do sistema tanto para a formulação branca (MEB), com para a formulação na presença do fármaco (MEAZ) pode ser observada na Tabela 1. Essa proporção de tensoativos adotada se enquadra no estabelecido no Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE, SHESKY & QUINN, 2009), que preconiza um valor máximo de até 55% de LAS<sup>®</sup> para aplicação tópica como agente auto-emulsificante. Dessa forma, trabalhamos com valores abaixo desse valor referenciado.

Após a seleção da formulação, a AZ foi incorporada na ME (MEAZ) de modo a se obter uma concentração de 20 mg/mL.

Tabela 1 - Composição em porcentagem das MEs óleo-em-água na presença e ausência de AZ.

Componentes	ME (ausência de AZ)(%) (p/p)	ME (presença de AZ)(%) (p/p)
	MEB	MEAZ
Miristato de isopropila	5	5
Água deionizada	55	54,8
LAS <sup>®</sup> e Brij <sup>®</sup> 52 (9:1)	40	40
AZ	-	0,2

Fonte: dados do autor.

A incorporação da AZ foi realizada mediante agitação por ultrassom (sonicação), o fármaco foi inicialmente disperso na mistura de MIR e tensoativos antes da adição de água.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES

Os parâmetros físico-químicos são fundamentais para formação, estabilidade, comportamento e uso das formulações (ROSSI et al., 2007). Desta forma, alguns parâmetros foram avaliados para servirem como base no desenvolvimento das MEs. Decorridas 48 horas do período da incorporação da AZ e estabilização dos sistemas, não foram observadas modificações na aparência macroscópica das MEAZs, mantendo-se como um líquido incolor, límpido e com aspecto levemente viscoso (Figura 5). Uma das características macroscópicas das MEs é a sua transparência. Segundo Damasceno e colaboradores (2011), essa característica se dá devido ao tamanho de gotícula ser menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de luz incidente, o que evita o espalhamento da luz.

Figura 5 - Aparência macroscópica das MEs antes e após a incorporação do fármaco.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na tabela abaixo, encontram-se os valores referentes a pH, centrifugação, condutividade elétrica e índice de refração das MEs.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das MEs na presença e ausência de AZ.

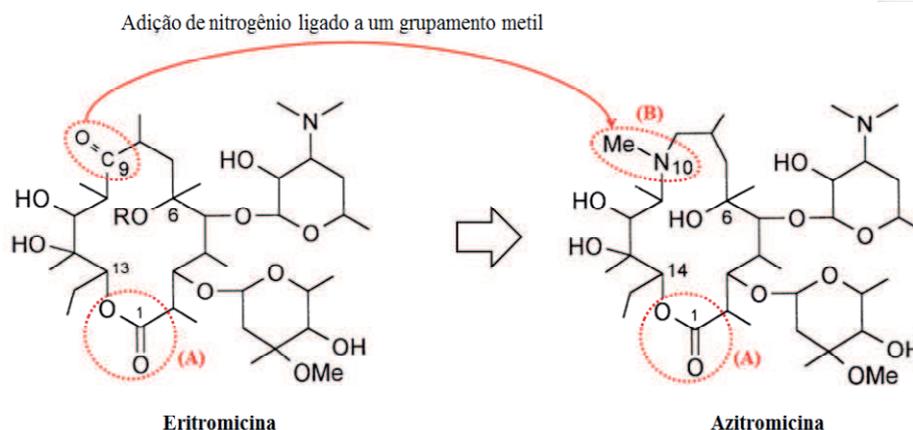
Código da Formulação	Aspecto macroscópico	pH	Centrifugação	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Índice de refração
MEB	Límpida	$3,16 \pm 0,01$	Instável	$127,3 \pm 1,39$	$1,39 \pm 0,001$
MEAZ	Límpida	$6,75 \pm 0,02$	Estável	$630,1 \pm 4,30$	$1,40 \pm 0,008$

Fonte: dados da pesquisa.

A determinação do pH das formulações é de suma importância uma vez que estes dados podem influir no grau de ionização dos fármacos, além de serem levados em conta na avaliação da compatibilidade dos valores com o local destinado ao uso. Para uso tópico, os limites aceitáveis de tolerância do pH variam entre 5,5 e 8,0 (SILVA et al., 2009), portanto, como pode-se observar na Tabela 2, os valores de pH das MEs com a presença da AZ (MEAZ) são aceitáveis, atendendo a proposta do uso das MEs desenvolvidas. É importante observar que os valores do pH para a ME sem o fármaco (MEB) foram incompatíveis para administração tópica, o que sugere que a presença da AZ está influenciando no aumento do pH final, o que, desta forma, viabiliza seu uso.

A provável explicação para o aumento do pH das MEs com a adição do fármaco é devido ao seu caráter dibásico. A AZ é um derivado semisintético da eritromicina pela adição de um metil ligado a um nitrogênio na posição C-9 do anel lactônico (Figura 6), sendo esse processo responsável pela característica dibásica única dentre os macrolídeos, uma vez que a molécula já possui um grupamento amino (GUALDONI et al, 2015).

Figura 6 - Estrutura do processo semisintético de produção de azitromicina a partir da eritromicina.



Fonte: Adaptado de KESS, SPANGLER & WELLENHOFER, 1998.

Legenda: (A) = lactona na posição C-14 para eritromicina e C-15 para azitromicina; (B) = N-Metil substituído.

Na análise de estabilidade preliminar por centrifugação, pôde-se observar que as MEAZ se mantiveram estáveis depois de submetidas à força centrífuga, o que não aconteceu com as MEB. Este resultado sugere que o fármaco melhorou a

estabilidade da formulação. Uma das explicações possíveis para isso é que devido a presença dos tensoativos não iônicos, que possuem a característica química de formação de cargas parciais negativas e positivas. Essas cargas são geradas pelo seu arranjo molecular que possui moléculas de oxigênio intercaladas a átomos de carbono da cadeia de oxido de eteno. (TUMMALA, SHI & STRIOLO, 2011; VITIELLO et al, 2014). Desta forma, provavelmente a azitromicina pode estar interagindo com as cargas negativas principalmente do LAS<sup>®</sup>, provocando maior estabilidade pela neutralização das cargas.

A condutividade elétrica é utilizada para investigar a estrutura das ME, assim como alterações na mesma (ROSSI et al., 2007). Essa característica é importante para determinar os domínios contínuos aquosos ou oleosos, podendo-se a partir disso avaliar o tipo de ME quanto à fase dispersa e dispersante. Sistemas O/A possuem efeito condutor, ou seja, denota altos valores de condutividade. De modo contrário, sistemas A/O possuem um efeito isolante, caracterizados por baixos valores de condutividade (NAOUI et al, 2011). Os resultados corroboraram com o citado anteriormente na literatura, logo que os altos valores indicam um sistema O/ A para a ME na presença e ausência do fármaco.

Segundo Gaudin e colaboradores (2010), a AZ apresenta log P=4,0, tendo assim aspecto lipofílico, desta forma, o sistema microemulsionado do tipo O/A é preferível, pois em um sistema com essas características espera-se que o fármaco fracamente solúvel em água fique retido na fase dispersa. Essas informações são importantes também para as características de liberação e permeação do fármaco, uma vez que, a mudança das fases dispersantes podem alterar esses parâmetros.

Outra análise simples e acessível que atesta a característica isotrópica de um sistema microemulsionado é a medição do seu índice de refração. Ainda de acordo com a Tabela 2, pode-se observar que para ambas as formulações os índices de refração mensurados foram únicos e sem variações significativas entre as MEs na ausência e presença do fármaco. A confirmação da isotropia foi confirmada posteriormente pela análise de microscopia de luz polarizada.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROEMULSÕES

As formulações MEAZ e MEB foram avaliadas por meio de inspeção visual na microscopia de luz polarizada, esta técnica é de grande importância para elucidar as características de isotropia ou anisotropia das formulações. Após as análises, observou-se sob o plano de luz polarizada, a presença de um campo escuro nas MEs (com e sem o fármaco), descartando a possibilidade de sistemas estruturados, como cristais líquidos, e confirmando os seus comportamentos isotrópicos.

Para determinar o comportamento isotrópico é necessário perceber que o plano de luz polarizado não sofre dupla refração, todo o campo avaliado apresenta as mesmas propriedades ópticas. Desta forma, o raio de luz incidente do polarizador não sofre alteração ao atravessar o sistema, por isso a formação do campo escuro como resultado da análise. De modo contrário, materiais anisotrópicos exibem diferentes índices de refração (birrefringência) promovendo uma mudança na orientação da luz incidente gerando imagens conhecidas como “cruzes de malta” (CHORILLI et al, 2011; FRANZINI et al, 2012).

O tamanho de gotículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram mensurados para caracterização morfológica, os resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de tamanho de gotículas, IPD e potencial zeta com e sem a azitromicina incorporada.

Código da Formulação	Tamanho de gotículas (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
MEB	18,72 ±0,63	0,172 ±0,005	-0,3307 ±0,1690
MEAZ	20,89 ±0,24	0,166 ±0,008	-0,1653 ±0,0290

Fonte: dados da pesquisa.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), também denominada espectroscopia de correlação de fótons, foi utilizada para analisar o tamanho de gotículas das MEs em estudo, por se mostrar uma técnica útil, acessível e rápida para a determinação do tamanho de gotículas de MEs (ACHARYA & HARTLEY,

2012). Como visto na Tabela 3, o tamanho médio das gotículas das MEB e MEAZ atenderam ao tamanho previsto para sistemas microemulsionados, ou seja, entre 10 e 100 nm (DJEKIC et al., 2012). Notou-se também um discreto aumento do tamanho médio das gotículas após a incorporação da AZ, este fato pode ser justificado pela interação existente entre o fármaco e a membrana de tensoativos das gotículas da ME, fato que já foi sugerido pelo aumento do pH e da condutividade elétrica, conferindo assim o aumento do seu tamanho. A distribuição do tamanho de gotículas da fase interna foi classificada como do tipo monomodal e homogêneo mediante a ocorrência de um pico único de alta intensidade para todas as leituras dos sistemas em estudo, fato comprovado pelo IPD apresentado (para ambas formulações o IPD foi abaixo de 0,2).

Esses valores servem para indicar o grau de uniformidade do tamanho de gotículas presentes no sistema disperso desenvolvido. Desse modo, quanto mais próximo de zero for o valor do IPD, mais homogênea será a distribuição das gotículas (CHUDASAMA et al, 2011; MOGHIMIPOUR, SALIMI & EFTEKHARI, 2013). Assim, para ambas as formulações os valores de IPD mensurados estão em concordância com o discutido na literatura, revelando gotículas de distribuição uniforme.

Em relação ao potencial zeta, sua medição determina justamente a diferença de potencial presente na interface entre essas duas camadas (sendo essa denominada de plano de deslizamento/cisalhamento) (DALVIN, 2011; BHATTACHARJEE, 2016). Segundo Dai e colaboradores (2014), valores elevados acima de +25 mV ou menor que -25 mV são considerados ideais para que seja formado um bloqueio que impeça a coalescência das gotículas.

Os baixos valores de potencial zeta medidos, podem estar relacionados com a utilização de tensoativos do tipo não-iônicos (CHHIBBER et al, 2015). Apesar disso, as formulações apresentaram-se como estáveis dias após a sua preparação e mediante ao teste de centrifugação como visto anteriormente. .

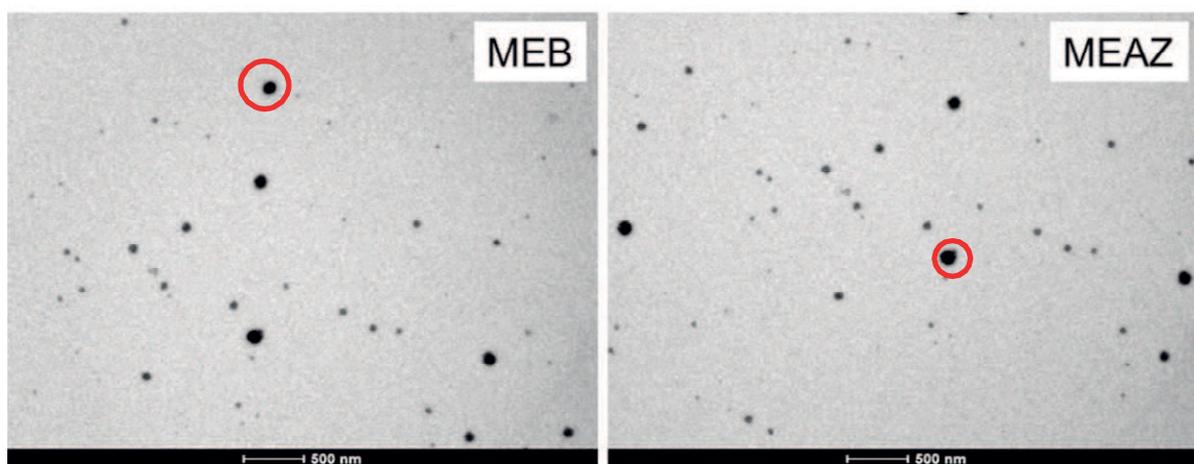
A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta imprescindível para avaliação morfológica de estruturas micro e nanométricas. A utilização desse método possibilita uma leitura de parâmetros de estabilidade para formulações como MEs. Diferentemente da microscopia óptica, a MET permite

aumentos maiores e fixação superior do material, de modo que utiliza feixes de elétrons como fonte de luz, o que permite uma elevada resolução já que o comprimento de onda de um feixe de elétrons é muito menor do que o da luz (DUDKIEWICZ et al, 2011).

Apesar das vantagens, a coloração e secagem das estruturas a serem analisadas requerem muito cuidado para evitar alterações que comprometam a interpretação da leitura, de forma que, estes fatores não possam interferir nas características das amostras. Levando em conta isto, optou-se por realizar a uma secagem simples (ao ar seco) e sem a utilização de nenhum tipo de corante uma vez que, tanto o processo de secagem e coloração podem criar falsas interpretações durante a leitura da imagem devido a alterações estruturais que os sistemas podem sofrer, quando submetidos a essas duas técnicas citadas (KUNTSCHE, HORST & BUNJES, 2011; KLANG et al, 2012).

A Figura 7 mostra as fotomicrografias das MEB e MEAZ, onde, a partir disso, puderam-se avaliar as estruturas.

Figura 7 - Fotomicrografias das microemulsões selecionadas por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Dados da pesquisa.

Como visto, as gotículas (circuladas em vermelho) apresentaram distribuição uniforme nos dois casos, este, por sua vez, sugere boa estabilidade a formulação. As gotículas apresentam-se com formatos esféricos heterogêneos, tamanho nanométrico e boa distribuição no campo, corroborando os resultados do DLS.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dentre os métodos utilizados para avaliar a susceptibilidade de cepas bacterianas, o método de microdiluição em caldo foi o teste de escolha por ser um método simples e eficaz, além de ser apropriado para evidenciar a menor concentração do agente submetido ao teste que é capaz de inibir o crescimento bacteriano, para confirmar os resultados obtidos e aumentar a confiabilidade do teste, amostras foram recolhidas das placas de microdiluição para leitura em semeadura em placa.

Na Tabela 4 podemos observar os resultados da concentração inibitória mínima para cada microrganismo.

Tabela 4 - Determinação da Concentração Mínima (CIM) das formulações produzidas.

Microorganismos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	MEAZ	ME-BRANCA
<i>S.aureus</i>	1 $\mu\text{g/mL}$	R
<i>S.epidermidis</i>	128 $\mu\text{g/mL}$	R
<i>E.coli</i>	16 $\mu\text{g/mL}$	R

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: R= resistente.

Para evidenciar que as condições de realização da análise eram adequadas foi realizado um controle negativo contendo apenas o meio de cultura, onde se pôde observar o crescimento bacteriano em todos os poços. Como esperado, a MEAZ apresentou atividade contra todas as bactérias testada, de modo a apresentar-se mais eficiente na inibição do crescimento do *S. aureus*, de forma que, todos os poços, desde a primeira e maior concentração até a última e menor, que corresponde a 1  $\mu\text{g/mL}$ . Já para as MEB não houve inibição, ficando evidente o crescimento do microrganismo em todos os poços, sugerindo que os componentes

não apresentam atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. Para o *S. epidermidis*, a inibição do crescimento deu-se até a terceira diluição, portanto, a formulação demonstrou-se eficaz até 128 µg/mL.

Por último, para a *E. coli*, as MEAZ apresentaram atividade até a sexta diluição, determinando assim sua CIM em 16 µg/mL. Todas as análises foram confirmadas por semeadura em placa. Faz-se necessário outra análise com um controle positivo utilizando uma solução de AZ nas mesmas concentrações, desta forma será possível uma avaliação comparativa da atividade das MEAZ e MEB. Com os resultados obtidos ficou evidente que a menor CIM encontrada foi contra as cepas de *S.aureus*, seguidas de *E.coli* e *S.epidermidis*.

*Conclusão*

---

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que a técnica de DFPT mostrou-se simples e útil para desenvolver um modelo gráfico de regiões de sistemas opticamente transparentes e por meio desta, selecionar as MEs do tipo O/A para a encapsulação da AZ. A encapsulação de AZ foi conseguida mediante a ausência de precipitados ou turvação após a adição do fármaco ao sistema, além da ausência de aglomerados que poderiam indicar fármaco não encapsulado pela técnica do MET. Entretanto, estudos de doseamento e eficiência de encapsulação devem ser conduzidos para confirmar esse pressuposto.

A análise de pH confirmou a compatibilidade das MEs na presença de AZ com a pele, logo que o pH dessas formulações se encontraram dentro da faixa especificada para aplicação cutânea. A estabilidade preliminar das formulações foi atestada pela centrifugação e os indicativos dos sistemas O/A foram conseguidos a partir da condutividade. As características isotrópicas foram evidenciadas pelo índice de refração, sendo posteriormente confirmados a partir da microscopia de luz polarizada. Por meio da MET foi possível a visualização nanométrica das gotículas da fase interna. Enquanto que, a técnica de espalhamento de luz dinâmica mostrou-se acessível, simples e eficiente para a mensuração do tamanho das gotículas. Por fim, a atividade antibacteriana da MEAZ foi comprovada contra cepas das espécies *S.aureus*, *S.epidermidis* e *E.coli*.

Como perspectivas futuras, é importante destacar, que estudos posteriores serão conduzidos para desenvolver e validar um método para quantificação de AZ no sistema proposto. Uma vez possível essa quantificação, estudos para traçar o perfil de liberação do fármaco das MEs também serão conduzidos.

## *Referências Bibliográficas*

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p

ACHARYA, D.P.; HARTLEY, P.G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.274-280, 2012.

ACOSTA, E. J, et al. Effects of surfactant concentration on transdermal lidocaine delivery with linker microemulsions . **International Journal of Pharmaceutics**. Vol 392, p.274-284, 2010.

ALKRAD, J.A.; MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.H.H. Development and characterization of microemulsions containing hyaluronic acid. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, p. 84-90, 2016.

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

BARDHAN, S.; KUNDU, K.; SAHA, S.K.; PAUL, B.K. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.402, p.180-189, 2013.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v.235, p.337-351, 2016.

BOUCHER, H. W., WILCOX, M., TALBOT, G. H., PUTTAGUNTA, S., DAS, A. F., & DUNNE, M. W. Once-weekly dalbavancin versus daily conventional therapy for skin infection. **New England Journal of Medicine**, v.370, n.23, p.2169-2179, 2014.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Modulo 3 : **Principais Síndromes Infeciosas/Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**.– Brasília: Anvisa, 2013.

CARVALHO, R.D.S.; CARVALHO, W.A. In: SILVA P. **Farmacologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.

CASTRO, R.M.L., “**Emulsão: uma revisão bibliográfica**”, UFP-CCS, Brasil, 2014.

CAVALCANTI, A.L.M.; REIS, M.Y.F.A.; SILVA, G.C.L.; RAMALHO, I.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, p.351-360, 2016.

CHHIBBER, T.; WADHWA, S.; CHADHA, P.; SHARMA, G.; KATARE, O.P. Phospholipid structured microemulsion as effective carrier system with potential in methicillin sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) involved burn wound infection. **Journal of Drug Targeting**, v.23, n.10, p.943-952, 2015.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v.85, p.182-188, 2011.

CHUDASAMA, A.; PATEL, V.; NIVSARKAR, M.; VASU, K.; SHISHOO, C. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of itraconazole. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.2, n.1, p.30-38, 2011.

DAI, J.; KIM, S.M.; SHIN, I-S.; KIM, J.D.; LEE, H.Y.; SHIN, W.C.; KIM, J-C. Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.2103-2110, 2014.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**, Blucher, São Paulo, 327p., 2011.

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**, 32, 9-18, 2011.

DAMASCENO, B.P.G.L. **Sistemas microemulsionados como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 2010. 61f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.

DAS, A.; PARTA, A.; MITRA, R.K. Modulation of anionic reverse micellar interface with non-ionic surfactants can regulate enzyme activity within the micellar waterpool. **Colloid Polymer Science**, v.294, n.4, p.715-726, 2016.

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

DUDKIEWICZ, A.; TIEDE, K.; LOESCHNER, K.; JENSEN, L.H.S.; JENSEN, E.; WIERZBICKI, R.; BOXALL, A.B.A.; MOLHAVE, K. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n.1, p.28-43, 2011.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; SILVA JÚNIOR, A.A.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.03, 2005.

FORTES, T. M. L., SUFFREDIN, I. B. Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**. v. 32, n. 1, p. 94-101, 2014.

FOULKES, G. N., et al. "Topical azithromycin and oral doxycycline therapy of meibomian gland dysfunction: a comparative clinical and spectroscopic pilot study." **Cornea** 32.1 (2013): 44.

FRANZINI, C.M.; PESTANA, K.C.; MOLINA, E.F.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLVEIRA, A.G. Structural Properties Induced by the Composition of Biocompatible Phospholipid-Based Microemulsion and Amphotericin B Association. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.8, p.350-359, 2012.

GANDHI, R; KAUL, C.L; PANCHAGNULA, R. Pharmacokinetic evaluation of an azithromycin controlled release dosage form in healthy human volunteers: a single dose study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.270, p.1-8, 2004.

GAUDIN, K.; MILLET, P.; FAWAZ, F.; OLLIARO, P.; WHITE, N.J.; CASSUS-COUSSÈRE, C.; AGBAHOUNGHA, U.; DUBOST, J. Investigation of porous graphitic carbon at high-temperature liquid chromatography with evaporative light scattering detection for the analysis of the drug combination artesunate—Azithromycin for the treatment of severe malária. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.75-81, 2010.

GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.105, p.152-157, 2013.

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão contendo derivado do tiofeno**. 2013. 120f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, 2013.

GUALDONI, G.A.; LINGSCHIED, T.; SCHMETTERER, K.G.; HENNING, A.; STEINBERGER, P.; ZLABINGER, G.J. Azithromycin inhibits IL-1 secretion and non-canonical inflammasome activation. **Scientific Reports**, v.5, p.1-10, 2015.

GUPTA, M.; VAIDYA, B.; MISHRA, N.; VYAS, S.P. Effect of Surfactants on the Characteristics of Fluconazole Niosomes for Enhanced Cutaneous Delivery. **Artificial Cells**, v.39, p.376-384, 2011.

HOU, W.; XU, J. Surfactant-free microemulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.25, p.67-74, 2016.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. 11ª Edição**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008.

KAUSS, T.; GAUDIN, K.; GAUBERT, A.; BA, B.; Tagliaferri, S.; FAWAZ, F.; FABRE, J-L.; BOIRON, J-M.; LAFARGE, X.; WHITE, N.J.; OLLIARO, P.L.; MILLET, P. Screening paediatric rectal forms of azithromycin as an alternative to oral or injectable treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, p.624-630, 2012.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n.1, p 141-164, 2013.

KESS, F.; SPANGLER, S.; WELLENHOFER, M. Determination of macrolides in biological matrices by highperformance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography A**, v.812, p.287-293, 1998.

KIM, B.S.; WON, M.; YANG LEE, K.M.; KIM, C.S.; In vivo permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. **Drug delivery**, v.15, p. 465-269, 2008.

KISH, T.D.; CHANG, M.H.; FUNG, H.B. Treatment of Skin and Soft Tissue Infections in the Elderly: A Review. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v.8, n.6, p.485-513, 2010.

KLANG, V.; MATSKO, N.B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v.43, p.85-103, 2012.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.77-78, 2002.

KUMAR, G.P.; RAJESHWARRAO, P. Nonionic surfactante vesicular systems for effective drug delivery-na overview. **Acta pharmaceutica sinica B**, v.1, n.4, p.208-219, 2011.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J.C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission élétron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.417, p. 120-137, 2011.

LANE, M.E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.447, n, 1-2, p.12-21, 2013.

LAWRENCE, M.J; REES, D.G. Microemulsions-based asnovel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.,Arlington**, v.45, p.89-121, 2000

LI, L.; YI, T.; LAM, C.W. Effects of Spray-Drying and Choice of Solid Carriers on Concentrations of Labrasol® and Transcutol® in Solid Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS). **Molecules**, v.18 ,p.545-560, 2013.

MA, Y.; YUAN, X.; XIN-PENG; HOU-WANG; HUANG, H.; SHAN-BAO; HUAN-LIU; XIAO, Z.; ZENG, G. The pseudo-ternary phase diagrams and properties of anionic–nonionic mixed surfactant reverse micellar systems. **Journal of molecular liquids**, v.203, p.181-186, 2015.

McCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v.8, p.1719-1729, 2012.

MAHALE, N.B.; THAKKAR, P.D.; MALI, R.G.; WALUNJ, D.R.; CHAUDHARI, S.R. Niosomes: Novel sustained release nonionic stable vesicular systems — An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.183-184, p.46-54, 2012.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; EFTEKHARI, S. Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.3, n.1, p.63-71, 2013.

MUKHERJEE, B.; DUTTA, L.; MONDAL, L.; DEY, N.S.; Chakraborty, S.; MAJI, R.; SHAW, T.K. Nanoscale Formulations and Diagnostics With Their Recent Trends: A Major Focus of Future Nanotechnology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n.36, p.5172-5186, 2015.

MONTENEGRO, L.; LAI, F.; OFFERTA, A.; SARPIETRO, M.G.; MICICCHÈ, L.; MACCIONI, A.M.; VALENTI, D.; FADDA, A.M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.32, p.100-112, 2016.

MORAES, D. C. M., BARROS, P. O., TAMOS, E. F., ZUIM, N. R. B. Ação cicatrizante de substâncias ativas: d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **Rev. FOCO**. v. 4, n.4, p. 83-97, 2013.

NAOUI, W.; BOLZINGER, M.; FENET, B.; PELLETIER, J.; VALOUR, J.; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. **Pharmaceutical Research**, v.28,p.1683-1695, 2011.

OKUR, Ü.; ÇAĞLAR, E.Ş.; ARPA, M.D.; KARASULU, H.Y. Preparation and evaluation of novel microemulsion-based hydrogels for dermal delivery of benzocaine. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p.1-11, 2016.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 237, p. 241–249, 2002.

PAILLER-MATTEI, C., PAVAN, S., VARGIOLU, R., PIROT, F., FALSON, F., ZAHOUANI, H. Contribution of stratum corneum in determining bio-tribological properties of the human skin. **Wear**. v. 263, p. 1038-1043, 2007.

PARNHAM, M.J.; HABER, V.E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; PERLETTI, G.; VERLEDEN, G.M.; VOS, R. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.143, p.225-245, 2014.

PEREIRA, L.B. Impetigo – review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.89, n.2, p. 293-299, 2014

PRAJAPATI, S.K.; KUMAR, S.; SAHU, V.K.; PRAKASH, G. Proniosomal gel of flurbiprofen: formulation and evaluation. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v.2, n.1, p.1-5, 2012.

RAJAN, S. Skin and soft-tissue infections: Classifying and treating a spectrum. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.79, n.1, p.57, 2012.

RAO, GOWTHAM A., et al. "Azithromycin and levofloxacin use and increased risk of cardiac arrhythmia and death." **The Annals of Family Medicine** 12.2 (2014): 121-127.

RAY, G.T.; SUAYA, J.A.; BAXTER, R. INCIDENCE, MICROBIOLOGY, AND PATIENT CHARACTERISTICS OF SKIN AND SOFT-TISSUE INFECTIONS IN A U.S. POPULATION: A RETROSPECTIVE POPULATION-BASED STUDY. **BMC Infections Diseases**, v.13, n.1, p.252, 2013.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética 2a edição**. Pharmabooks, 2010.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural**, RJ:EDUR, vol.26, n. 1-2, p.45-66, 2007.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, **Pharmaceutical Press** - Royal Pharmaceutical Society, London, 6ª Edição, 917 p., 2009.

SAMPSON, M.R.; DUMITRESCU, T.P.; BROUWER, K.L.R.; SCHMITH, V.D. Population pharmacokinetics of azithromycin in whole blood, peripheral blood mononuclear cells, and polymorphonuclear cells in healthy adults. **CPT: Pharmacometrics & Systems pharmacology**, v.3, n.3, p.1-7, 2014.

SANTOS, P.S. DA S., "**Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno**", Tese de Mestrado, FF-UP, Porto, Portugal, 2015.

SHARMA, S.P.; JUN, C.X. Azithromycin 1% ophthalmic solution for treatment of blepharitis. **Journal of General Practice and Emergency Medicine of Nepal**, n.5, p.48-53, 2014.

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

SILVA, J.A.; GUIMARÃES, G.P.; PATRIOTA, Y.B.G.; SILVA, N.E.S.; SOUSA, C.E.M.S.; MENDONÇA JÚNIOR, F.J.B.; SANTANA, D.P.; DAMASCENO, B.P.G.L. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.4, p.643-649, 2014.

SILVA, J.A; DAMASCENNO, B.P.G.L; BORBA, V.F.C; EGITO, E.S.T; SANTANA, D.P.; Uso de diagrama de fases pseudoternário como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdermicas. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 90, n. 3, p. 245-249, 2009.

SILVA, M. F. MORAES, M. A., NOGUEIRA, G. M., RODAS, A. C.D. HIGA, O. Z., BEPPU, M. M. Glycerin and Ethanol as Additives on Silk Fibroin Films: Insoluble and Malleable Films. **Inc. J. Appl. Poly. Sci.** v. 128, p. 115–122, 2013.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUSA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.31, n.3, p.125-134, 2010.

TORTORA, G, J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia- Ç12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TUMMALA, N.R.; SHI, L.; STRIOLO, A. Molecular dynamics simulations of surfactants at the silica–water interface: Anionic vs nonionic headgroups. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.362, p.135-143, 2011.

VITIELLO, G.; MANGIAPIA, G.; ROMANO, E.; LAVORGNA, M.; GUIDO, S.; GUIDA, V.; PADUANO, L.; D'ERRICO, G. Phase behavior of the ternary aqueous mixtures of two polydisperse ethoxylated nonionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.442, p.16-24, 2014.

WEERAPOL, Y.; LIMMATVAPIRAT, S.; NUNTHANID, J.; SRIAMORNSAK, P. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Nifedipine: Impact of Hydrophilic–Lipophilic Balance and Molecular Structure of Mixed Surfactants. **AAPS PharmSciTech**, v.15, n.2, p.456-464, 2014.

WOLINSKY, J. B.; COLSON, Y.L.; GRINSTAFF, M.W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. **Journal of controlled. Release**, v. 159, p.14-26, 2012

YAN, M.; MA, X.; DONG, R.; LI, X.; ZHAO, C.; GUO, Z.; SHEN, Y.; LIU, F.; MA, R.; MA, S. Synthesis and antibacterial activity of 400-O-(trans-b-arylacrylamido) carbamoyl azithromycin analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.103, p.506-515, 2015.

ZUCKERMAN, J.M. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. **Infectious Disease Clinics**, v.18, p.621-649, 2004.