



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÃO
ÓLEO EM ÁGUA (O/A) DE 5CN06**

**CAMPINA GRANDE – PB
2012**

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÃO
ÓLEO EM ÁGUA (O/A) DE 5CN06**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação de **Farmácia** da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno.

CAMPINA GRANDE – PB
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

P314a

Patriota, Yuri Basilio Gomes.

Atividade Antimicrobiana de Microemulsão Óleo em
Água (O/A) de 5CN06 / Yuri Basilio Gomes Patriota. – 2012.
26f. : il.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

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

1. Microemulsão. 2. Nanotecnologia. 3. 5CN06. I.
Título.

21. ed. CDD 615.43

YURI BASILIO GOMES PATRIOTA

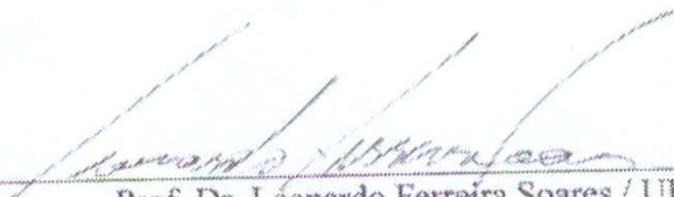
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÃO
ÓLEO EM ÁGUA (O/A) DE 5CN06**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação de **Farmácia** da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

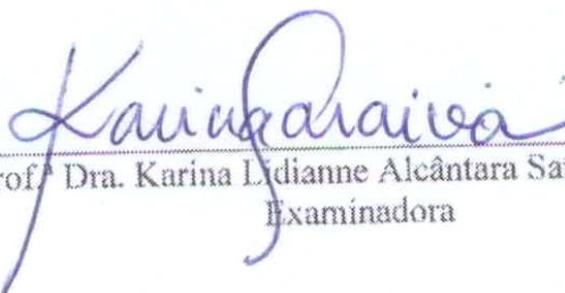
Aprovada em 28/11/2010.



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



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares / UEPB
Examinador



Prof. Dra. Karina Lidiane Alcântara Saraiva/ UEPB
Examinadora

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA (O/A) DE 5CN06

DAMASCENO, Bolívar Ponciano Goulart de Lima^{1,2}, MENDONÇA JUNIOR, Francisco Jaime Bezerra de⁴, GUIMARÃES Geovani Pereira², SILVA, José Alexsandro da^{1,2}, SILVA, Natan Emanuell de Sobral¹, CATÃO, Raissa Mayer Ramalho³, ROCHA, Wilma Raianny Vieira da³, PATRIOTA, Yuri Basilio Gomes¹

RESUMO

As microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis e apresentam uma ampla capacidade de solubilização de outro líquido ou outras moléculas como fármacos insolúveis e nutracêuticos. Os derivados heterocíclicos nitrogenados, como os compostos derivados do heterociclo tiofeno apresentam uma enorme gama de atividades biológicas já comprovadas. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma ME óleo em água (O/A) do derivado tiofênico 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[B]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06), caracterizá-lo físico-quimicamente e avaliar sua atividade antimicrobiana. MEs com o 5CN06 foram desenvolvidas adotando 3 métodos diferentes utilizando Labrasol[®] (tensoativo), miristato de isopropila (fase oleosa) e água destilada (fase aquosa). Um diagrama de fase pseudoternário foi construído, as formulações microemulsionadas foram desenvolvidas, caracterizadas físico-quimicamente e avaliadas a sua atividade antimicrobiana. Os valores de pH e condutividade indicaram que não houve mudança na microestrutura das MEs. Os sistemas se mostraram bastante estáveis e o estudo calorimétrico (DSC) comprova a microestrutura O/A da ME. A eficiência de encapsulação foi de 58%, 98% e 92% para as MEs M1, M2 e M3, respectivamente. Para a concentração inibitória mínima (CIM), as formulações mostraram atividade frente a bactérias e fungos com CIM de 200 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para bactérias e de 200 a 6,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para leveduras. Portanto, os sistemas desenvolvidos apresentaram um grande potencial para a atividade antimicrobiana, sendo bastante promissor para a terapêutica futura.

PALAVRAS-CHAVE: 5CN06. Microemulsão. Nanotecnologia.

¹Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), Campina Grande/PB, Brasil. E-mail: yuribgp@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Segundo Klepser (2011), a população de pacientes em risco de micoses invasivas tem aumentado como resultado de infecções, neoplasias malignas, e avanços na medicina que permitem que mais pacientes se submetam a procedimentos de transplante, recebam terapias imunossupressoras agressivas e, em geral criam uma população de pacientes mais susceptíveis. *Candida* e *Aspergillus* permanecem como a causa da maioria das infecções fúngicas, mas outros patógenos fúngicos menos comuns e emergentes estão sendo cada vez mais diagnosticados. (KLEPSER, 2011) A incidência anual de candidíase é estimada em 72-228 por milhão de pessoas e é associada com uma mortalidade de 10-49%

Na atualidade, a maioria dos fármacos é veiculada em formas farmacêuticas ditas convencionais e, geralmente, elas não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque entre o local de aplicação e o alvo onde deve exercer seu efeito farmacológico, interpõem-se uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco (DALMORA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármacos tem aumentado nos últimos anos. Inúmeros destes produtos apresentam a finalidade de melhorar o tratamento das doenças, no que diz respeito ao aumento da eficácia e redução da toxicidade dos fármacos, facilitando a adesão do paciente ao tratamento (DASMACENO, 2010).

As microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis e apresentam uma ampla capacidade de solubilização de outro líquido ou outras moléculas como aditivos alimentares, nutracêuticos, aromas, compostos cosméticos, substâncias ativas e fármacos. As microemulsões são excelentes veículos para solubilização e transporte de compostos ativos insolúveis em água e/ou em óleo. (ASERIN, 2006) Elas oferecem várias vantagens para uso farmacêutico, incluindo a facilidade de preparação, estabilidade termodinâmica, a alta capacidade de solubilização para fármacos lipofílicos e hidrofílicos e sua capacidade de facilitar o transporte de fármacos através de membranas biológicas. (ACOSTA, 2010)

Concomitantemente com a pesquisa de novos sistemas de liberação, surge a necessidade da pesquisa de novos fármacos antifúngicos devido o aumento da importância clínica de infecções fúngicas, o aumento da resistência fúngica e o reduzido número de antifúngicos disponíveis, estes muitas vezes mostrando apenas a atividade fungistática.

Os derivados heterocíclicos nitrogenados, como os compostos derivados do heterociclo tiofeno apresentam também uma enorme gama de atividades biológicas já comprovadas. Segundo Nogueira *et al.*(2003), os compostos tiofênicos apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante.

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma ME óleo em água (O/A) do derivado tiofênico, 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[B]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06), caracterizá-la físico-quimicamente e avaliar sua atividade antimicrobiana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Microemulsões

Segundo Cera (FORMARIZ, 2005) nos últimos anos a procura por novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados.

De acordo com Danielsson (SILVEIRA, 2009) o conceito de ME foi introduzido nos anos quarenta por Hoar e Schulman que geraram uma solução transparente, de única fase, por titulação de uma emulsão de aspecto leitoso com hexanol.

Segundo Aserin (2006), microemulsões são sistemas semelhantes a soluções com um interior formado por nanogotas estabilizadas por um conjunto de agentes tensoativos. As microemulsões são termodinamicamente estáveis, líquidos não newtonianos e apresentam uma ampla capacidade de solubilização de outro líquido ou outras moléculas como aditivos alimentares, nutracêuticos, aromas, compostos cosméticos, substâncias ativas e fármacos. As microemulsões são excelentes veículos para solubilização e transporte de compostos ativos insolúveis em água e/ou em óleo. (ASERIN, 2006)

As microemulsões oferecem várias vantagens para uso farmacêutico, incluindo a facilidade de preparação, estabilidade termodinâmica, a alta capacidade de solubilização para fármacos lipofílicos e hidrofílicos e sua capacidade de facilitar o transporte de fármacos através de membranas biológicas. (ACOSTA, 2010)

As microemulsões podem formar várias estruturas, tais como gotículas de óleo em água, gotículas de água em óleo, misturas randômicas bicontínuas, gotículas ordenadas e misturas lamelares com ampla faixa de equilíbrio entre elas e com excesso de fase oleosa e/ou aquosa, sendo que a formação dessas estruturas depende do tensoativo, do co-tensoativo e da natureza do óleo. Portanto, a escolha adequada e as concentrações desses componentes tornam-se extremamente importantes para a orientação desses sistemas (SIROTTI *et al.*, 2002).

Segundo Fanun (2011), as microemulsões apresentam-se como gotículas de água em óleo ou gotículas de óleo em água rodeadas pelos agentes tensoativos, ou elas apresentam-

se como microestruturas bicontínuas, ou seja, canais contínuos de óleo e água separados por agentes tensoativos.

A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as microemulsões existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes. A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado (FORMARIZ, 2004).

Segundo Bhargava (1987, *apud* FORMARIZ 2005, p. 303), esses diagramas podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar amplo número de amostras de diferentes composições de maneira rápida.

A relação entre o comportamento da fase de uma mistura e sua composição pode ser observada a partir desses diagramas, que compreende óleo, água, tensoativos e no caso nas MEs, um co-tensoativo, no qual cada ápice representa 100% de cada componente em particular. Aquecimento e sonicação são frequentemente utilizados, particularmente em sistemas contendo tensoativos não-iônicos, para acelerar o processo.

Para descrever o equilíbrio entre emulsões, Winsor em 1948 caracterizou alguns sistemas a seguir:

- Winsor I: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso de óleo
- Winsor II: Há equilíbrio entre a fase ME e excesso da fase aquosa
- Winsor III: três fases em equilíbrio (O, A e ME)
- Winsor IV: Há apenas a fase ME que pode ser chamada de sistema pseudomonofásico.

Acosta (2010) caracteriza as microemulsões de acordo com a classificação de Winsor da seguinte maneira: microemulsões óleo em água (O/A) como Winsor I, microemulsões água em óleo (A/O) como Winsor II e microemulsões bicontínuas em água ou óleo como Winsor Tipo III e IV, se não houver fases em excesso.

A caracterização físico-química dos sistemas microemulsionados, principalmente por estudos de viscosidade e determinação de tamanho das gotículas, pode auxiliar na interpretação dos experimentos de liberação *in vitro* e *in vivo*. O diâmetro das gotículas da fase interna das MEs, assim como, a viscosidade do sistema estão diretamente relacionados

com a velocidade de liberação *in vitro* e com o processo de difusão *in vivo*, facilitando ou dificultando a fração disponível por unidade de tempo (CORREA *et al.*, 2005).

2.2. Infecções fúngicas

As doenças acometidas por microrganismos representam um grave problema de saúde no Brasil e no mundo, refletindo-se na economia e na qualidade de vida da população.

Um fato importante a se ressaltar, é que diversos fungos, como por exemplo, os do gênero *Cândida*, são comumente presentes na superfície da pele, mucosas, trato gastrintestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis. No entanto, sob determinadas condições, esses microrganismos são capazes de causar diversos quadros clínicos onde se incluem infecções tanto a nível superficial, quanto sistêmico. (ARAÚJO, 2010)

Segundo Raven *et al.* (2007, apud ARAUJO, 2010) informam que cerca de 40% das mortes por infecções hospitalares em meados dos anos 1980 foram ocasionadas por fungos e, afirmam também que 80% das mortes de portadores de vírus HIV foram ocasionadas pelo fungo *Pneumocystis carinii* (causador da pneumonia), sendo o gênero *Cândida* também importante causador de infecções nas mucosas bucais e outros locais, principalmente em pacientes HIV-positivos.

As infecções causadas por espécies de *Candida*, especialmente candidemia, são atualmente uma das causas mais comuns de infecções hospitalares. (CASTON-OSORIO, 2008) Além disso, as infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus spp* outros fungos menos comuns estão causando uma preocupação crescente, devido ao aumento do número de casos relatados e as limitadas opções disponíveis para a terapia. (CASTON-OSORIO, 2008)

Durante as últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente devido ao número crescente de pacientes em risco. Estes pacientes são na sua maioria imunocomprometidos com doenças como AIDS, diabetes, pacientes que estejam recebendo quimioterapia ou órgãos, transplante de medula óssea ou ter um cateter implantado. As infecções fúngicas oportunistas estão associadas com alta morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes gravemente enfermos. (TANI, 2012)

2.3. Derivados do Tiofeno

Um ponto de preocupação no tratamento de infecções por fungos é o número limitado de drogas antifúngicas eficazes. Muitas das atualmente disponíveis são tóxicas, pois elas produzem recorrência e são fungistáticas e não fungicidas ou levam ao desenvolvimento da resistência em parte devido ao prolongado período de administração, além de apresentarem um limitado espectro de atividade, baixa distribuição tecidual, fraca penetração no sistema nervoso central (SNC), ou custo elevado. (ARAUJO, 2010)

Compostos orgânicos que contêm anéis de cinco membros heterocíclicos aromáticos são amplamente distribuídos na natureza e muitas vezes desempenham um papel importante em vários processos bioquímicos. Como resultado, eles são incorporados como novas entidades químicas. (NOGUEIRA, 2003)

Tendo em vista a necessidade da constante busca por medicamentos mais eficazes, potentes, seguros e menores efeitos colaterais, surgem como uma alternativa bastante promissora os derivados do tiofeno.

O tiofeno é um hidrocarboneto cíclico, de fórmula molecular C_4H_4S (Figura 1). Trata-se também de um composto heteroaromático visto que um dos pares de elétrons livres do enxofre tem potencial para participar da ressonância conjuntamente com elétrons π das duplas ligações.

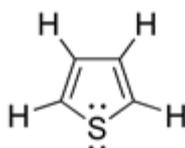


FIGURA 1: Estrutura da molécula do hidrocarboneto cíclico (tiofeno) de fórmula molecular C_4H_4S .

Derivados do benzotiofeno em combinação com outros sistemas aromáticos têm sido extensivamente usados em aplicações farmacêuticas, tais como antialérgica, analgésico, anti-inflamatória e atividades oculares hipotensoras. Além disso, os derivados heterocíclicos nitrogenados, como os compostos derivados do heterociclo tiofeno apresentam também uma enorme gama de atividades biológicas já comprovadas. As principais incluem: antitumorais,

antivirais e antiglaucosomas. Destacam-se principalmente as atividades: analgésicas e antiinflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e herbicidas.

2.4. Validação Metodológica

Os derivados do tiofeno são fármacos que possuem atividade antifúngica, entre outras. Devido à atividade farmacológica apresentada, esses compostos têm sido bastante estudados visando sua utilização na terapêutica. Como passo inicial de um estudo de desenvolvimento galênico com esta molécula se faz necessário a validação de uma metodologia analítica capaz de quantificar a molécula e os produtos farmacêuticos preparados a partir dela. (SANTANA *et al*, 2004)

Há várias definições existentes na literatura para o termo validação de métodos. Segundo a ICH (2005), validação é um programa documentado que proporciona um alto grau de certeza de que um determinado processo, método ou sistema produzirá consistentemente um resultado com critérios pré-determinados de aceitação. “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. (ANVISA *apud* JARDIM, 2004)

Desde a década de 70 que a validação de metodologias vem se destacando como tendência no meio científico. Exigências legais, técnicas e comerciais surgiram para justificar a implantação de validação de métodos analíticos, embora não haja uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. Existem várias agências credenciadoras no mundo e no Brasil, ANVISA e INMETRO, e todas exigem a validação de métodos analíticos como requisito imprescindível para um laboratório ou indústria assegurar sua qualidade e demonstrar competência técnica. (JARDIM, 2004)

Para métodos analíticos que não estão descritos nas farmacopéias ou formulários oficiais, a metodologia só será reconhecida pela ANVISA desde que sejam avaliados os parâmetros a seguir relacionados: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. (FERNANDES, 2003)

- Especificidade e Seletividade:

Especificidade é a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem ser esperados para estarem presentes. Normalmente, estes podem incluir impurezas, produtos de degradação, matriz, etc. (ICH, 2005) A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. (ANVISA, 2003)

- Linearidade:

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. (ANVISA, 2003; ICH, 2005) No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x=0.

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. (ANVISA, 2003)

- Precisão:

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições previstas. Precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. (ANVISA, 2003; ICH, 2005)

1. Repetibilidade: A repetibilidade corresponde à precisão intra-ensaio, consiste na determinação repetidas vezes de uma amostra sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. (ANVISA, 2003)

2. A Precisão intermediária (precisão intercorridas) expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. (ANVISA, 2003)

3. A reprodutibilidade refere-se à precisão entre laboratórios, demonstra a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica. (ANVISA, 2003)

- Exatidão:

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito com o valor encontrado. (ICH, 2005)

- Limite de Quantificação:

O limite de quantificação de um procedimento individual analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas. O limite de quantificação é um parâmetro de ensaios

quantitativos para os baixos níveis de compostos em matrizes de amostras, e é usado principalmente para a determinação de impurezas e / ou produtos de degradação. (ICH, 2005)

- Limite de Detecção:

O limite de detecção de um procedimento individual analítico é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. (ICH, 2005)

- Robustez:

A robustez de um procedimento analítico é uma medida de sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações, mas deliberada em parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal. (ICH, 2005)

3. REFERENCIAL METODOLÓGICO

O fármaco 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4hciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06) foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da UEPB. O miristato de isopropila utilizado como fase oleosa da ME foi adquirido da Via Farma (São Paulo, SP, Brasil), o Labrasol[®] (PEG-8 cáprico/caprílico glicérido), tensoativo da preparação, foi adquirido da Brasquim (São Paulo, SP, Brasil) e a água utilizada foi purificada por um sistema de osmose reversa (Gehaka[®], São Paulo, SP, Brasil).

3.1. *Construção do diagrama de fase pseudoternário (DFPT)*

O DFPT foi construído de modo a obter a faixa de concentração dos componentes para a existência de microemulsões. A proporção em peso de tensoativo e cotensoativo variou de 10:0, 9:1, 8:2, 7:3 a 6:4. Para cada proporção de tensoativos e cotensoativos, adicionou-se, como fase oleosa, miristato de isopropila nas proporções de 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 e 1:9. A água purificada foi adicionada lentamente sob agitação magnética (Ika Staufen im Breisgau, Germany) a temperatura ambiente. As concentrações dos componentes foram registradas assim como os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente para sistema opaco, líquido ou semi-sólido, dispersão opaca ou ainda separação de fases para obter o DPFT completo.

3.2. *Preparação da microemulsão incorporada com o fármaco 5CN06 (ME-5CN06)*

De acordo com as áreas de ME apresentadas no DFPT foi selecionada as proporções entre os componentes para formar a ME. O sistema microemulsionado foi obtido misturando a fase oleosa e o tensoativo e adicionando água destilada lentamente sob agitação à temperatura ambiente. Após o sistema ter sido deixado em repouso, quantidades adequadas do fármaco foi incorporado no sistema por 3 métodos diferentes. A concentração final do 5CN06 na microemulsão foi de 200µg/mL.

3.2.1. *Simples solubilização na microemulsão branca (M1)*

Quantidade adequada do fármaco foi pesada e incorporada na ME-B previamente confeccionada sob agitação magnética à temperatura ambiente.

3.2.2. *Solubilização do fármaco à fase oleosa (M2)*

Quantidade adequada do fármaco foi adicionada à fase oleosa e homogeneizou-se sob agitação magnética por 1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, o tensoativo e a água destilada foi adicionada também sob agitação magnética por 3 minutos à temperatura ambiente.

3.2.3. *Incorporação em sonicador (M3)*

Quantidade adequada do fármaco foi adicionada à fase oleosa, com posterior adição do tensoativo e água destilada sob agitação magnética. Em seguida, o sistema foi levado à uma agitação vigorosa em um sonicador (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 1 minuto posteriormente foi adicionada em um banho de ultrassom (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 1 minuto. Este ciclo de sonicador e banho de ultrassom foi repetido por 3 vezes.

3.3. *Caracterização físico-química da microemulsão*

3.3.1. *pH*

Os valores de pH foram determinados colocando diretamente o eletrodo do pHmetro (Hanna HI 2221, Grass Valley, CA, US) nas amostras e seus valores de pH foram determinados.

3.3.2. *Condutividade*

A microestrutura das microemulsões foi avaliada pela condutividade. Os valores da condutividade foram medidos usando condutivímetro TECNOPON (MCA 150, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Os valores de condutividade das MEs foram determinados.

3.3.3. *Índice de refração (IR)*

Os valores do índice de refração das MEs foram medidos usando um refratômetro de Abbe RMT. A medição foi realizada à temperatura ambiente adicionando 500 µL no prisma do equipamento.

3.3.4. *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

A análise DSC foi realizada no equipamento DSCQ20 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). As curvas foram analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio, usando amostras de 3 mg pesadas com precisão ($\pm 0,1$ mg) e prensadas em painéis de alumínio. A calibração do equipamento foi realizada com o metal índio (99,99%) em relação à temperatura e entalpia. As amostras foram inicialmente submetidas ao resfriamento (25 a -50°C) a uma taxa de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, mantidas por 3 minutos a -50°C. Em seguida, as amostras foram aquecidas até a temperatura de 200°C a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram realizadas análises do fármaco, dos componentes dos sistemas, bem como o próprio sistema com e sem adição do derivado do tiofeno.

3.3.5. *Teste de Centrifugação*

A estabilidade da ME com e sem o 5CN06 foi analisada em microcentrífuga (NOVA NI 1801, Piracicaba, SP, Brasil). Nos microtubos tipo Eppendorf foram adicionados um grama de cada ME e submetidas a vários ciclos de centrifugação de 89g, 559g, 1095g, 2236g e 4382g durante quinze minutos em cada rotação à temperatura ambiente.

3.3.6. *Estresse térmico*

A ME sem e com o 5CN06 (M1, M2 e M3) foram submetidas a uma faixa de temperatura (40 a 80° C), elevando a temperatura em 10°C a cada 30 minutos em banho termostático (SOLAB SL 155/10, Piracicaba, SP, Brasil). Em tubos de ensaio foram adicionados 4 mL de cada ME e submetidas a análise. As leituras foram realizadas ao término dos 30 minutos de cada temperatura e as amostras foram classificadas como levemente modificada (LM), modificada (M), sem alteração (SA) e separação de fases (SF).

3.4. ***Validação de metodologia para doseamento do fármaco 5CN06 em Espectrofotômetro UV/Visível***

A metodologia de doseamento foi validada de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH – 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) para validação de procedimentos analíticos.

3.4.1 Preparo da solução padrão 300 µg/mL e da solução de trabalho do 5CN06

Três miligramas do 5CN06 foi pesado, transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com clorofórmio (concentração final de 300 µg/mL). Alíquotas desta solução foram diluídas em acetonitrila (1:4) até a concentração de 75 µg/mL.

3.4.2 Determinação da linearidade

A curva de calibração foi obtida com 14 concentrações a partir da solução de trabalho, 6-28 µg/mL (n=3). Adicionou-se 2450 µL de acetonitrila na cubeta, acertando a linha de base com este reagente, mais 200 µL da solução de trabalho e fez-se a leitura da absorbância. Em seguida, adicionou-se sucessivamente 100 µL da solução de trabalho.

3.4.3 Exatidão

A exatidão do método de doseamento foi determinada pela análise de três pontos da curva de calibração (9, 18 e 27 µg/mL, n=9).

3.4.4 Precisão

A precisão da metodologia de doseamento foi determinada pela repetibilidade (intra-dia) e pela precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada analisando o ponto médio da curva de calibração em sextuplicata por dois analistas (n=6). A precisão intermediária foi estudada comparando os ensaios por analistas diferentes (n=6).

3.4.5 Especificidade

Fez-se a varredura no espectrofotômetro UV/Visível da ME branca (ME-B) e da ME incorporada com o fármaco 5CN06 (ME-5CN06).

3.4.6 Robustez

A robustez da metodologia de doseamento no espectrofotômetro UV/Visível foi determinada pela análise do ponto médio da curva (n=3) de calibração sob pequenas variações, como alteração do fabricante da acetonitrila (Acetonitrila grau HPLC, VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e Acetonitrila grau HPLC, J.T. (Baker Center Valley, PA, EUA) e alteração do aparelho espectrofotométrico (Espectrofotômetro UV mini 1240, Shimadzu, Nakagyo-ku, Kyoto, Japão) Espectrofotômetro UV/Vis 2000UV (Spectrum SP, Nakagyo-ku,

Kyoto, Japão).

3.4.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram calculados pelas equações da Figura 2 onde δ é o desvio padrão do branco e s é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = \frac{3\delta}{s} \quad LQ = \frac{10\delta}{s}$$

FIGURA 2: Equações para realização dos cálculos para o LD e LQ.

3.4.8 Doseamento a

6)

Para determinar a real concentração do fármaco incorporado na ME, realizou-se a análise no espectrofotômetro das MEs produzidas pelos três métodos para posterior comparação. Uma alíquota de 245 μ L das MEs produzidas foi adicionada em 2450 μ L de acetonitrila e realizou-se as análises espectrofotométricas no comprimento de onda de 307nm em triplicata. A partir da equação da curva de calibração e da média das absorbâncias de cada ME fez-se os cálculos para obtenção da real concentração do 5CN06 incorporado na ME.

3.5 Eficiência de encapsulação (E.E)

Pesou-se 1 grama das amostras em tubos eppendorf e estes foram levados para a microcentrífuga 4382g, a temperatura ambiente por 60 minutos. O fármaco livre (não incorporado) foi sedimentado pela força centrípeta empregada ao sistema. A eficiência de encapsulação (E.E) foi calculada como a relação entre as análises espectrofotométricas antes e após a centrifugação.

3.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das ME-5CN06

Foi realizado o teste de microdiluição em caldo utilizando método proposto pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), segundo protocolo M-27-A2 para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). O inóculo foi preparado na mesma concentração da suspensão de 0,5 McFarland (ou 10⁸UFC/mL), obtidas de colônias frescas de bactérias e fungos.

As cepas de bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853. Cada cepa foi

inoculada em 9,0 mL de solução fisiológica de modo a se obter uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (0,5 MacFarland). Foram distribuídos 200 μ L da ME-5CN06, na concentração inicial estabelecida de 200 μ g/mL, na primeira coluna das cavidades – A1 até C1. Em seguida, distribuiu-se 100 μ L do caldo Mueller Hinton nos poços (2 a 12) correspondentes às cepas testadas. Posteriormente, foi adicionado 20 μ L do inóculo das cepas testadas nos poços correspondentes as cepas testadas 1 a 11. Os poços 11 e 12 serviram como controle positivo e negativo, respectivamente. Na coluna 11 foi colocado o inóculo e na coluna 12 apenas o caldo Mueller Hinton. A partir da concentração inicial foram feitas as diluições seriadas à razão 2 nas cavidades de 2 a 10 obtendo-se as concentrações de 200 até 0,3906 μ g/mL. A leitura para determinação das CIMs das ME-5CN06 sobre as cepas de bactérias foi realizada pelo método visual. Para confirmação de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias foi utilizado o corante resazurina. Nos poços onde houve crescimento observava-se a coloração azul e onde não houve crescimento a coloração rosa.

As cepas de fungos utilizadas foram *Candida albicans* ATCC 76645, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. guilliermondii* ATCC 6260 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 e as análises foram realizadas da mesma maneira e na mesma concentração das CIM para as cepas de bactérias. Foi levada em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Para confirmação de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias foi utilizado o corante resazurina. Igualmente ao que ocorreu para bactérias, nos poços onde houve crescimento observava-se a coloração azul e onde não houve crescimento a coloração rosa.

4 DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

Os resultados desta pesquisa estão em fase final de análise para publicação, portanto não podem fazer parte deste tipo de trabalho de conclusão de curso (TCC).

5 CONCLUSÃO

As MEs foram obtidas com sucesso pela análise do DFPT.e a incorporação da moléculas foi muito boa. Pela análise das características físico-químicas comprovamos a microestrutura óleo em água (O/A) do nosso sistema e que a incorporação do fármaco 5CN06 não provocou mudanças na mesma. Além disso, comprovou-se sua alta estabilidade, fato este desejável para uma formulação que almejamos lançá-la no mercado. Com a avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas comprovou-se que os componentes da ME não apresentam atividade antimicrobiana e que esta ação nas formulações deve-se exclusivamente ao fármaco 5CN06. O sistema microemulsionado apresentou uma ótima atividade antibacteriana e uma excelente atividade antifúngica, inibindo as cepas bacterianas com concentrações de 100 µg/mL e as cepas leveduriformes com concentrações de até 6,3 µg/mL, respectivamente. Com isso podemos observar que este sistema e o fármaco 5CN06 apresentam-se com grande potencial para o mercado farmacêutico como uma nova alternativa para a terapêutica antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa (PROPESQ - 2011/2012) pelo suporte financeiro prestado para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO – UEPB/UFCG) pela análise térmica e ao Departamento de Química da UEPB.

ABSTRACT

Microemulsions (MEs) are systems thermodynamically stable and have a large capacity for solubilization of other liquid or other molecules as insoluble drugs and nutraceuticals. The nitrogen heterocyclic derivatives such as compounds derived from thiophene heterocycle have a huge range of biological activities already proven. The objectives of this study were to develop an ME oil in water (O / W) of derivative of thiophenic 2 - [(2,4-dichloro-benzylidene)-amino] -5,6-dihydro-4H-cyclopenta [b] thiophene-3 -carbonitrile (5CN06), characterize him physico-chemically and evaluate its antimicrobial activity. MEs with 5CN06 been developed adopting three different methods using Labrasol® (surfactant), isopropyl myristate (oil phase) and distilled water (aqueous phase). A phase diagram was constructed pseudoternário, microemulsion formulations were developed, characterized physicochemically and evaluated their antimicrobial activity. The pH and conductivity indicated that there was no change in the microstructure of MEs. The systems have proven quite stable and calorimetric study (DSC) shows the microstructure O/W of ME. The encapsulation efficiency was 58%, 98% and 92% for the MEs M1, M2 and M3, respectively. For minimum inhibitory concentration (MIC), the formulations showed activity against bacteria and fungi with MICs of 200 to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for bacteria and from 200 to 6.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ from yeast. Therefore, the systems developed had great potential for antimicrobial activity, being very promising for future therapy.

KEYWORDS: 5CN06. Microemulsion. Nanotechnology.

REFERÊNCIAS

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

ARAÚJO, R.S.A. **Obtenção e avaliação da atividade antifúngica de derivados sintéticos do tiofeno.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, UEPB. João Pessoa, Paraíba.

ANVISA, Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 23 de setembro de 2012.

ASERIN, A.; SPERNATH, A.. **Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals.** Advances in Colloid and Interface Science. Vol.128, n.130 p. 47–64 ,2006.

BORGES, V. R. A. **Desenvolvimento de novas microemulsões de dapsona para o tratamento tópico da hanseníase.** 2011. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CASTÓN-OSORIO, J.J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS J.. **Epidemiology of invasive fungal infection.** International Journal of Antimicrobial Agents. Córdoba, Vol. 32, n.2, 2008.

CASTRO, R.D; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de Eucalyptus globulus L. sobre Candida spp..** Rev Odontol UNESP, Araraquara, Vol. 39, n.3, p. 179-184, 2010.

CORREA, M.A. *et al.* **On the incorporation of the nonsteroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions.** Colloids Surface. B, Amsterdam, v.43, p.106-112, 2005.

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

DALMORA, M. E., *et al.* **Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect.** International Journal of Pharmaceutics, v.222, n.1, p.45-55. 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Métodos Gerais: Determinação do índice de refração,** 5ª ed., v. 1, 2010. Fiocruz:Brasília, 2010.

FANUN, M.. **Reprint of “Properties of microemulsions with mixed nonionic surfactants and citrus oil.”** Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. Vol. 382, p.226–231, 2011.

FERNANDES, T. R. P. **Desenvolvimento farmacotécnico e validação metodológica analítica para comprimidos revestidos à base de diclofenaco de potássio.** 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

FORMARIZ, T. P. **Incorporação da doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa “in vitro” através de cultura de células.** 2004. 199p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

FORMARIZ, Thalita Pedroni *et al.* **Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos.** Rev. Bras. Cienc. Farm. Vol41, n.3, pp. 301-313, 2005.

GARTI, N. *et al.* **Phosphatidylcholine embedded microemulsions: Physical properties and improved Caco-2 cell permeability.** Journal of Controlled Release. Vol. 119, p. 279–290, 2007.

IBRIC, S.*et al.* **Characterization and evaluation of solid self-microemulsifying drug delivery systems with porous carriers as systems for improved carbamazepine release.** International Journal of Pharmaceutics, n.436, p.58– 65, 2012.

ICH EXPERT WORKING GROUP. **Internacional Conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.** 2005.

JARDIM, I.C.S.F. *et al* **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.** Química Nova, V. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

KLEPSER, Michael PharmD. **The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections.** Journal of Critical Care. V. 26, p. 255, 2011.

KOETZ, J; NOTE,C; KOSMELLA, S. **Structural changes in poly(ethyleneimine) modified microemulsion.** Journal of Colloid and Interface Science, n.302, p.662–668, 2006.

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

MORAIS, J.M *et al.* Physicochemical characterization of Canola oil/ Water Nano emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. Journal of Dispersion Science and Technology. Vol. 27, p. 109-115, 2006.

NEUBERT, R.H.H; GOEBEL, A.S.B.; WOHLRAB, J.. **Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems**. International Journal of Pharmaceutics, n.404, p.159–168, 2011.

NOGUEIRA, C. W et al. **Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents**. Environmental Toxicology and Pharmacology, n. 37, p. 37/44, 2003.

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

SANTANA, D.P. *et al.* **Validação de Metodologia Analítica para doseamento de soluções de Lapachol por CLAE**. Química Nova, V. 27, n. 1, 157-159, 2004.

SILVA, J. A., *et al.* **Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use**. Journal of Dispersion Science and Technology, v.31, n.1, p.1-8. 2010.

SILVEIRA, Walteçá Louis Lima da. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo anfotericina B para uso oftalmológico**. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2009.

SIROTTI, C. *et al.* **Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case**. **Journal Membrane Science**, Amsterdam, v.204, p.401-412, 2002.

TANI, Niina *et al.* **Antifungal activities of novel non-azole molecules against S. cerevisiae and C. albicans**. European Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 47, p.270-277, 2012.