



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

**JÉSSICA OHANNA ANDRADE MARTINS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA  
INCORPORAÇÃO DO 5CN05-LSVM**

**CAMPINA GRANDE – PB  
2014**

JÉSSICA OHANNA ANDRADE MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA  
INCORPORAÇÃO DO 5CN05-LSVM**

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

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Coorientador: Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães

CAMPINA GRANDE – PB  
2014

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

M386d Martins, Jéssica Ohanna Andrade.  
Desenvolvimento de sistema microemulsionado para  
incorporação do 5cn05-lsvm [manuscrito] / Jéssica Ohanna Andrade  
Martins. - 2014.  
45 p. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -  
Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e  
da Saúde, 2014.  
"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima  
Damasceno, Departamento de Farmácia".  
"Co-Orientação: Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães,  
Departamento de Farmácia".  
1. Microemulsões. 2. Derivado tiofênico. 3. Fármacos. I.  
Título.

21. ed. CDD 615.1

**JÉSSICA OHANNA ANDRADE MARTINS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA  
INCORPORAÇÃO DO 5CN05-LSVM.**

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

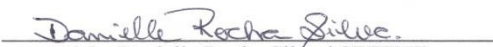
Aprovada em 04/04/2014.



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



Prof. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima / UEPB  
Examinadora



Ma. Danielle Rocha Silva / CETENE  
Examinadora

A Deus, fonte da minha força e inspiração;  
Aos meus pais Cláudia e José, por não  
medirem esforços para que esta conquista  
fosse alcançada, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, e por ter ajudado a manter a fé nos momentos mais difíceis.

A minha amada mãe Cláudia, por se doar completamente fazendo sempre o seu melhor, me ensinando a valorizar a maior riqueza que um ser humano pode ter; a sabedoria. E por investir seu tempo, carinho e orações durante todos esses anos.

Ao meu amado pai, José por ter me conduzido ao colégio bem como a faculdade durante todos esses anos, lutando juntamente comigo para que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu amado Yury, por me abraçar forte e dizer sempre que eu iria conseguir, por ser meu cúmplice e acalentador, trazendo-me a memória a fidelidade de Deus para com os seus filhos.

As minhas Avós Maria Andrade e Dorotéia Tavares, por serem matriarcas tão exemplares, cheias de bons ensinamentos e de uma sabedoria imensurável.

Ao meu Avô Carlos Andrade (*in memoriam*), que mesmo tendo partido deixou na memória de muitos sua honra e seu caráter e ao meu avô José Martins, que apesar do pouco convívio sempre se mostrara carinhoso.

Ao Professor Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, por me apresentar a seriedade e a beleza do universo da pesquisa, por acreditar e aceitar que fizesse parte de sua equipe de pesquisa e, principalmente, por me conceder conversas que contribuíram além da minha formação acadêmica.

Ao Professor Me. Geovani Pereira Guimarães, por ter sempre paciência e boa vontade em me ajudar, por ter transmitido seu conhecimento de modo tão rico e humilde, principalmente por me conceder grandes contribuições ao longo deste trabalho.

A amiga e Me. Gabriela Muniz Felix Araújo, por me acolher durante um ano como sua aluna de Iniciação Científica e por tornar a nossa experiência prática laboratorial algo tão prazeroso e dinâmico.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, em especial Alexandra, Yuri, Danielle, João Paulo, Juliana, Natan, Airlla, Rayanne, Morgana, Yargo, Camila, Ízola e Ana Cláudia pelo auxílio e pela colaboração prestada, sem os quais não teria conseguido realizar o presente trabalho.

A todos os professores e funcionários do Curso de Farmácia pela boa convivência e aprendizado em todos os dias desses cinco anos de vida universitária.

A todos pertencentes à Turma 2009.2, concluintes 2014.1, pelos momentos vividos e todo apoio e amizade oferecidos durante a graduação.

As minhas lindas amigas Andressa e Wilma, por me honrarem com suas amizades sinceras, pelo companheirismo e auxílio sempre que precisei.

Ao meu amigo e tio adotivo Joselito Santos por ser um exemplo de Mestre em tudo o que faz e por orientar-me sempre a caminhos de sucesso.

A minha querida comissão de formatura nas pessoas de Gustavo Souto, Jéssica Rangel, Wilma Raianny e especialmente Jéssica Romualdo, sem a qual não teria tido tanto êxito em meus experimentos.

Aos meus tios e tias, por sempre acreditarem que eu seria capaz de chegar com êxito ao fim dessa jornada.

Aos meus primos e primas, por serem responsáveis por boa parte dos momentos de descontração e alegria.

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas”.

**(Horácio)**



## RESUMO

Atualmente o tratamento convencional das enfermidades ocasionadas por fungos apresenta um número limitado de quimioterápicos, os quais apresentam problemas sérios relacionados à efetividade, espectro de ação, toxicidade, baixa potência e farmacocinética inadequada. A 5CN05-LSVM é uma molécula com comprovada atividade antifúngica *in vitro*, baixa solubilidade e, possivelmente, baixa permeabilidade. Sistemas coloidais como as microemulsões (MEs) são utilizados como sistemas transportadores de fármacos, sendo formados por dois líquidos imiscíveis (água e óleo) na presença de um tensoativo e se necessário um co-tensoativo. Tais sistemas têm se mostrado capazes de favorecer a solubilidade de moléculas antifúngicas pouco solúveis, como é o caso do derivado tiofênico 5CN05-LSVM, possibilitando a administração e absorção destas com maior segurança e menor incidência de efeitos adversos. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um sistema microemulsionado para incorporação do derivado tiofênico 5CN05-LSVM, bem como desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) para doseamento da molécula em microemulsões. As MEs foram obtidas a partir da elaboração de um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) e a incorporação do 5CN05-LSVM deu-se o método de sonicação. A formulação selecionada apresentava em sua composição Polissorbato 80 (22,5%), Brij<sup>®</sup> 52 (2,5%) na proporção de 9:1(tensoativo/co-tensoativo), triglicerídeo de ácido cáprico (8%) como fase oleosa e água deionizada (67%). Todas as formulações mostraram pH próximo da neutralidade e condutividade apropriada para sistemas óleo em água. A metodologia proposta para quantificação do 5CN05-LSVM nas MEs foi validada de acordo com as recomendações da Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As análises foram realizadas no comprimento de onda de 386 nm; o método demonstrou seletividade, linearidade, faixa linear, limite de detecção/quantificação, exatidão, precisão e robustez adequados para o uso pretendido. Concluiu-se com este estudo que o método analítico desenvolvido apresentou confiabilidade e segurança necessárias para o doseamento em sistemas transportadores de fármacos como as microemulsões, a incorporação do fármaco pelo método de sonicação mostrou-se simples, fácil e reproduzível, possibilitando futuros estudos como uma nova alternativa terapêutica.

**Palavras-chaves:** Derivado tiofênico, microemulsões, validação.

## ABSTRACT

Nowadays, the conventional treatment of diseases caused by fungi is based on few chemotherapeutic agents which there are serious problems in effectiveness, action spectrum, toxicity, low power and poor pharmacokinetics. The 5CN05-LSVM is a molecule with proven *in vitro* antifungal activity, low solubility and possibly low permeability. Colloidal systems such as microemulsions (MEs) are used as drug delivery systems, being formed by two immiscible liquids (oil and water) in the presence of a surfactant and a co-surfactant if necessary. Those systems have been able to promote the solubility of insoluble antifungal molecules such as the thiophenic derivative, 5CN05-LSVM, enabling the administration and absorption with greater safety and lower incidence of adverse effects. This study aimed to develop a microemulsion system for incorporation of the 5CN05-LSVM, and to develop and validate an analytical method by ultraviolet / visible (UV/VIS) absorption spectrophotometry for quantification of the molecule in microemulsions. The MEs were obtained from the elaboration of a pseudoternary phases diagram (DFPT) and incorporate the 5CN05-LSVM was used the sonication method. The selected formulation was composed by Polysorbate 80 (22.5%), Brij<sup>®</sup> 52 (2.5%) in the ratio of 9:1 (surfactant / co-surfactant), triglycerides of capric acid (8%) as oil phase and deionized water (67%). All the formulations showed near - neutral pH and appropriate conductivity to oil/water systems. The proposed methodology to quantify the 5CN05-LSVM in MEs was validated according the recommendations of Resolution 899/2003 of the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). The analyzes were accomplished at a wavelength of 386 nm, the method demonstrated selectivity, linearity, linear range, limit of detection / quantification, accuracy, precision and robustness adequate for the intended use. From this study, it is possible to conclude that the developed analytical methods, showed reliability and security necessary for the determination of the 5CN05-LSVM in carrier systems such as microemulsions. The incorporation of drugs by the sonication method proved to be simple, easy and reproducible; making possible future studies as a new therapeutic alternative.

**Keywords:** Thiophenic derivative, microemulsions, validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do anel tiofeno.....	17
Figura 2- Representação da estrutura do 5CN05-LSVM.....	18
Figura 3- Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), pela fase aquosa (branca) e por um filme interfacial de tensoativo/cotensoativo.....	20
Figura 4- Fluxograma para construção do Diagrama de Fases Pseudo-Ternário.....	25
Figura 5- Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema Polissorbato 80/Brij <sup>®</sup> 52 (9:1), ácido cáprico e água.....	31
Figura 6- Representação da ME-Branca (A) e da ME-5CN05-LSVM (B).....	32
Figura 7- Varredura espectrofotométrica da solução do 5CN05-LSVM.....	33
Figura 8- Varredura espectrofotométrica da ME-5CN05-LSVM.....	34
Figura 9- Curva de calibração obtida para avaliação do parâmetro Linearidade do método espectrofotométrico.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição percentual (p/p) da formulação selecionada.....	31
Tabela 2- Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.... <b>Erro! Indicador não definido</b> .....	35
Tabela 3- Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	<b>Erro! Indicador não definido</b> .6
Tabela 4- Determinação da robustez do método espectrofotométrico validado.....	<b>Erro! Indicador não definido</b> .6
Tabela 5- Determinação da concentração real da microemulsão contendo 5CN05-LSVM...37	
Tabela 6- Caracterização das microemulsões.....	38
Tabela 7- Determinação da eficiência de encapsulação do 5CN05-LSVM na formulação ME.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5CN05	2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopen-ta[b]tiofe- no-3 carbonitrila
A/O	Água em óleo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coefficiente de Variação
DFPT	Diagrama de Fases Pseudo-Ternário
DP	Desvio Padrão
EE	Eficiência de Encapsulação
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
G	Aceleração Gravitacional
log P	Coefficiente de Partição
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
ME	Microemulsão
ME-5CN05- LSVM	Matriz contendo o fármaco
ME-branca	Matriz isenta do fármaco
MEs	Microemulsões
O/A	Óleo em água
R	Coefficiente de correlação
RE	Resolução
S1	Solução de diluição
SP	Solução Padrão
UV-VIS	Ultravioleta Visível
$\Lambda$	Comprimento de Onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Novos Agentes Terapêuticos: derivados tiofênicos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Microemulsões</b> .....	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Materiais e equipamentos</b> .....	<b>23</b>
4.1.1 Equipamentos .....	23
4.1.2 Substâncias .....	23
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>24</b>
4.2.1 Desenvolvimento do Sistema Microemulsionado.....	24
4.2.1.1 Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL).....	24
4.2.1.2 Diagrama de Fases Pseudo-ternário (DFPT).....	24
4.2.1.3 Seleção da formulação e incorporação do 5CN05 -LSVM .....	25
4.2.2 Desenvolvimento e Validação de metodologia para doseamento do 5CN05-LSVM .....	25
4.2.2.1 Especificidade e Seletividade.....	26
4.2.2.2 Linearidade.....	26
4.2.2.3 Exatidão.....	26
4.2.2.4 Precisão .....	26
4.2.2.5 Robustez .....	27
4.2.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação .....	27
4.2.2.7 Doseamento do 5CN05-LSVM no sistema microemulsionado .....	27
4.2.3 Caracterização físico-química das formulações .....	28
4.2.3.1 Aspecto macroscópico.....	28
4.2.3.2 Determinação do pH.....	28
4.2.3.3 Condutividade elétrica.....	28
4.2.3.4 Eficiência de Encapsulação da ME-5CN05-LSVM.....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Desenvolvimento do Sistema Microemulsionado</b> .....	<b>30</b>
5.1.1 Diagrama de Fases Pseudo-ternário (DFPT).....	30
5.1.2 Seleção da Formulação.....	31
5.1.3 Incorporação do 5CN05-LSVM.....	31
<b>5.2 Desenvolvimento e Validação de metodologia para doseamento do 5CN05-LSVM</b> .....	<b>33</b>
5.2.1 Determinação do comprimento de onda de detecção .....	33
5.2.2 Especificidade e Seletividade.....	33
5.2.3 Linearidade.....	34
5.2.4 Exatidão.....	35
5.2.5 Precisão .....	35
5.2.6 Robustez.....	36

5.2.7 Doseamento do 5CN05-LSVM no sistema microemulsionado .....	37
<b>5.3 Caracterização físico-química das formulações .....</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos são os fatores que contribuem para o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, com destaque a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o câncer, os transplantes, o uso de sistemas de suporte de nutrição parenteral e o uso indiscriminado de antimicrobianos (FRANZINI, 2006). Em decorrência do comprometimento imunológico, tais pacientes tornam-se alvos fáceis para infecções fúngicas sistêmicas (ARAÚJO, 2005).

O aumento no perfil de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos e quimioterápicos revela um crescente problema de saúde pública mundial tornando-se o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que o número de fármacos disponíveis continua a reduzir (BENGHEZAL et al., 2007; OLIVEIRA, SILVA, 2008;).

Atualmente o tratamento convencional das enfermidades ocasionadas por fungos baseia-se em um número limitado de agentes quimioterápicos, tais como os azóis e os poliênicos, que apresentam problemas sérios relacionados à efetividade, espectro de ação, toxicidade, baixa potência (sendo a maioria considerada fungistática ao invés de fungicida) e farmacocinética inadequada (SCOTTI et al., 2012).

Tendo em vista a dificuldade atual no tratamento das infecções fúngicas os compostos heterocíclicos derivados do tiofeno apresentam-se como alternativa de tratamento relevante. Tais moléculas apresentam várias atividades biológicas já comprovadas, dentre as quais se podem destacar: antitumorais (NAIR, ABRAHAM, 1993), antivirais (BONINI et al., 2004), analgésicas e anti-inflamatórias (TALLEY et al., 2006), antibacterianas, herbicidas e especialmente, antifúngicas principalmente contra espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*) (PINTO et al., 2008).

A busca por sofisticados sistemas de liberação de fármacos é outro aspecto muito relevante, no sentido de proporcionar alternativas terapêuticas de elevada eficácia, favorecendo a administração e absorção de fármacos com maior segurança e menor incidência de efeitos adversos (DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ et al., 2005).

Esses sistemas revelam-se capazes de proporcionar melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução, especialmente, para os fármacos que pertencem a classes biofarmacêuticas de baixa solubilidade (ASTIER, 2006).

A perspectiva atual tem dado ênfase à incorporação desse tipo de molécula em sistemas microemulsionados; o crescente uso destas formulações pode ser atribuído às suas



propriedades particulares como aumento na solubilidade aparente dos fármacos e controle de sua liberação por meio de uma cinética específica (TENJARLA, 1999; SILVA et al., 2009a).

As propriedades particulares dos sistemas microemulsionados relacionam-se principalmente à sua baixa tensão interfacial, grande área de interface, tamanho reduzido das gotículas, baixa viscosidade e alta capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos, hidrossolúveis e anfifílicos (FANUN, 2012). Portanto, fármacos que apresentam dificuldade de incorporação em formas farmacêuticas convencionais, como a 5CN05-LSVM, que apresenta elevada lipofilicidade, podem utilizar-se deste sistema.

Todavia, conhecendo a ausência de métodos normatizados ou farmacopéicos para avaliação do 5CN05-LSVM em produtos farmacêuticos, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) a fim de dosear esta molécula na microemulsão (ME) formada.

De maneira que o desenvolvimento de metodologias analíticas é essencial, uma vez que através de ensaios experimentais alguns parâmetros podem ser conhecidos, tornando possível a avaliação das interações entre os componentes da formulação e o fármaco. A validação é a garantia que os resultados obtidos por esse método analítico sejam reprodutíveis e confiáveis.

Diante dos aspectos abordados, o estudo teve como objetivo desenvolver um sistema microemulsionado que pudesse ser utilizado para incorporação do derivado tiofênico 5CN05-LSVM, bem como desenvolver e validar metodologia analítica por espectrofotometria de absorção no UV/VIS capaz de quantificar o mesmo, avaliando as características físico-químicas das formulações com e sem o fármaco em termos de aspecto macroscópico, pH e condutividade elétrica, visando o melhor aproveitamento deste agente antifúngico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Novos agentes terapêuticos: derivados tiofênicos

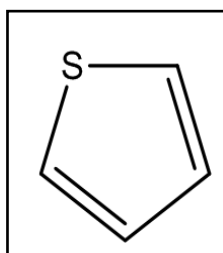
O uso indiscriminado e desnecessário dos antifúngicos tem sérias complicações, uma vez que proporciona o aumento da emergência dos perfis de resistência, estabelecendo-se assim uma relação direta entre o quantitativo de fármacos utilizados e a incidência de resistência (MARIN et al., 2003).

Através da técnica de modificação molecular, torna-se possível a obtenção de novos medicamentos. Esta técnica atua na identificação de novos análogos ativos do substrato natural do receptor ou do agonista da enzima eventualmente eleita como alvo-terapêutico. O planejamento molecular racional destes análogos-ativos pode se dar pelo emprego do bioisosterismo, da simplificação molecular, da hibridação molecular, entre outras metodologias de planejamento molecular da Química Medicinal (BARREIRO, FRAGA, 2005).

Os compostos heterocíclicos têm sido bastante utilizados como base para essa modificação molecular, visto que correspondem a cerca de 65% dos fármacos empregados na terapêutica, dos quais 95% desses apresentam-se nitrogenados, e outros 25% apresentam átomos de enxofre em sua composição química (BARREIRO, FRAGA, 2001).

Compostos orgânicos contendo anéis heterocíclicos aromáticos, tais como o anel tiofeno (Figura 1), encontram-se bem distribuídos na natureza e geralmente são de grande importância em vários processos bioquímicos (GUIMARÃES, 2013), apresentando largo espectro de propriedades farmacológicas (MOHAMMAD et al., 2012). A vasta aplicabilidade sintética e atividade biológica destes heterociclos os tornam importantes segmentos estruturais na química medicinal sintética, servindo de base para o planejamento e implementação de novos agentes terapêuticos (MEOTTI et al., 2003).

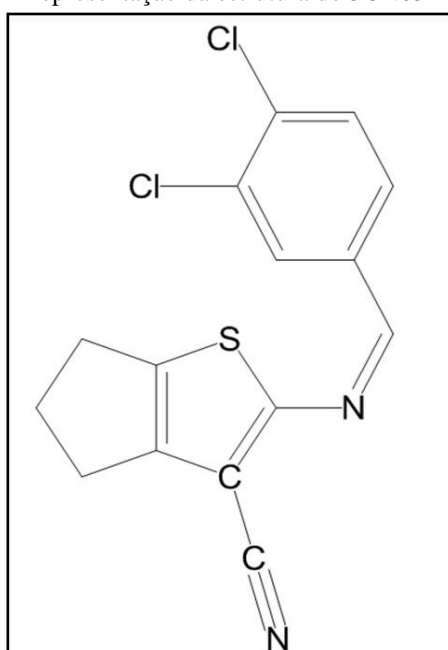
**Figura 1**– Estrutura do anel tiofeno.



(Fonte: GUIMARÃES, 2013)

A molécula em estudo, 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, referida como 5CN05-LSVM (Figura 2) possui comprovada atividade antifúngica *in vitro* (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; SOUZA et al., 2012), sendo caracterizada macroscopicamente como um pó amorfo de coloração amarela. Apresenta fórmula molecular  $C_{15}H_{10}N_2SCl_2$ ; massa molecular  $320g.mol^{-1}$  e ponto de fusão entre 190-194°C. Suas características biofarmacêuticas não estão de fato esclarecidas, principalmente no que diz respeito a sua permeabilidade. Entretanto, o valor de seu coeficiente de partição ( $\log P = 5,98$ ) é um indicativo de que a molécula pode apresentar baixa solubilidade e permeabilidade (GUIMARÃES, 2013).

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



(Fonte:GUIMARÃES, 2013)

## 2.2 Microemulsões

A utilização das microemulsões na tecnologia farmacêutica visando o aumento da eficácia de fármacos existentes é relativamente recente e, devido às potenciais vantagens oferecidas, elas têm despertado grande interesse como sistemas transportadores de moléculas.

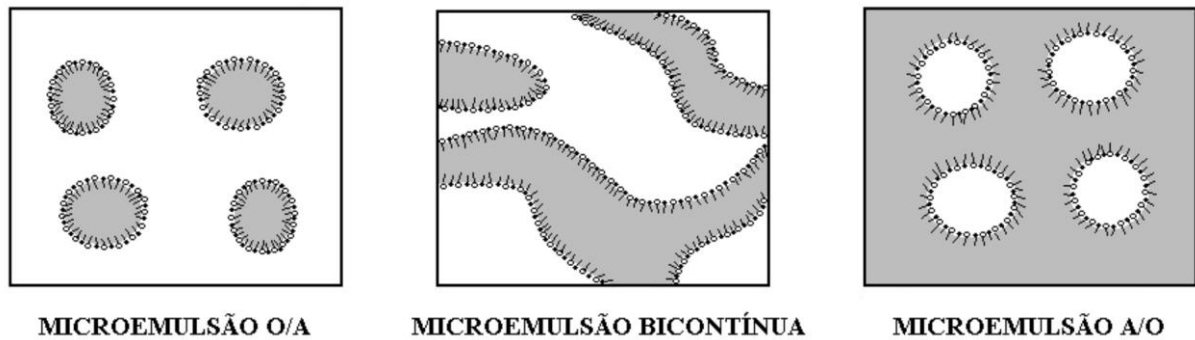
Historicamente o termo ME foi introduzido na década de 40 por Hoar e Schulman para definir um sistema fluido e translúcido obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média como o hexanol ou o pentanol (HOAR, SCHULMAN, 1943).

Em 1973, foram desenvolvidas pesquisas utilizando as microemulsões, no sentido de aumentar a recuperação do petróleo. Nestas pesquisas, os sistemas do tipo bicontínuo apresentaram grande interesse na remoção do petróleo preso nos poros dos reservatórios, oferecendo grande potencial econômico e estimulando a pesquisa desses sistemas (JÚNIOR et al., 2003). Na década de 80 até a atual, as MEs atraem considerável atenção tendo em vista seu uso em muitos produtos, como tintas, refrigerantes, loções pós-barba, refrescantes bucais, substituintes do sangue, cosméticos e como carreadores de fármacos (BAKER et al., 1984; CONSTANTINIDES, YIV, 1995; TENJARLA, 1999).

Conceitua-se MEs como sistemas claros, isotrópicos e termodinamicamente estáveis formados pela dispersão de dois líquidos imiscíveis estabilizados por tensoativos, frequentemente em combinação a um co-tensoativo (FANUN, 2012; LI et al., 2012; SILVA et al., 2009b). São geralmente formados pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, co-tensoativo e eletrólito (DAMASCENO et al., 2011).

As MEs podem apresentar-se em três diferentes organizações: 1) óleo em água (O/A), onde a fase interna, dispersa ou descontínua é um componente lipossolúvel e a externa, dispersante ou contínua é o componente água; 2) água em óleo (A/O), apresentando como fase interna o componente aquoso e fase externa o componente oleoso e 3) bicontínua, onde não são observadas gotículas esféricas e podem ser formadas pela transição do sistema O/A para A/O ou quando há proximidade dos volumes utilizados das duas fases (DAMASCENO et al., 2011).

**Figura 3**– Tipos de microemulsões esquematizadas pela fase oleosa (cinza), pela fase aquosa (branca) e por um filme interfacial de tensoativo/cotensoativo.



(Fonte: DAMASCENO et al., 2011)

O Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) é um parâmetro empírico representativo do conteúdo de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de um tensoativo (GUIMARÃES, 2013). O valor de EHL atua como indicador da preferência de migração do tensoativo na interface O/A proporcionando um caminho simples para a seleção do tensoativo de acordo com o tipo de ME desejada. O valor de EHL requerido pelo óleo para a formação das MEs pode ser proporcionado pela mistura de tensoativos com diferentes valores de EHL em determinadas proporções (ZHANG, HAN, 2009).

O tamanho da gotícula de uma ME, é cerca de 10-300 nm, é aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões, que é em torno de 1-10  $\mu\text{m}$  (DAMASCENO et al., 2011). A redução do tamanho quando comparado às emulsões normais se deve ao fato de que as moléculas de tensoativo formam um filme localizado na interface entre as fases aquosa e oleosa, diminuindo, portanto, a energia interfacial livre (ALTHANYAN et al., 2011), o que sem dúvida favorece a formação de estruturas estáveis de MEs. Outro aspecto relevante, está relacionado ao tamanho das gotículas de uma ME que apresenta-se menor que 1/4 do comprimento de onda da luz, o que faz com que neste tipo de sistema a luz incidente não sofra dispersão e o mesmo apresente uma transparência característica (DAMASCENO et al., 2012).

Os sistemas micro e nanoemulsionados têm a capacidade de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais apresentam propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (BHARGAVA, NARURKAR, LIEB, 1987). Segundo Cruz e Uckun (2001), esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo.

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

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver sistemas microemulsionados para incorporação de uma molécula de baixa solubilidade (5CN05-LSVM), bem como desenvolver e validar uma metodologia analítica para sua quantificação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e utilizar diagrama de fase pseudo-ternário para obtenção e identificação das regiões possíveis de formação de sistemas microemulsionados;
- Explorar um sistema microemulsionado para incorporação do 5CN05-LSVM;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do 5CN05-LSVM no sistema obtido, utilizando a técnica de espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS);
- Desenvolver um protocolo de caracterização para as formulações com e sem o fármaco, contemplando as análises de: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica e eficiência de encapsulação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e equipamentos

#### 4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica (OHAUS, AR 2140); Barueri - SP, Brasil;
- Balança semi-analítica BEL Mark 500 (Bel<sup>®</sup>); De Pere, EUA;
- Banho de ultrassom (Unique USC 2800 A); Indaiatuba - SP, Brasil;
- Condutivímetro mCA 150, MS Tecnopon, Brasil;
- Espectrofotômetro UV/Visível UV mini 1240 Shimadzu; São Paulo - SP, Brasil;
- Medidor de pH mPA 210, MS Tecnopon, Brasil;
- Microtubos tipo eppendorf;
- Mini centrífuga de bancada NI1801, Nova Instruments, Brasil;
- Pipeta automática Kacil FS 2000 µL;
- Pipeta automática Kacil FS 500µL;
- Pipeta automática Peguepet 1000µL;
- Purificador de água Osmose Reversa OS10 LX (GEHAKA<sup>®</sup>); São Paulo - SP, Brasil;
- Sonda de ultrassom (Sonicador Unique Modelo Desruptor); Indaiatuba - SP, Brasil;
- Vórtex V1, IKA, Alemanha.

#### 4.2.2 Substâncias

- 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopen-ta[b]tiofeno-3 carbonitrila (5CN05), obtido e sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba;
- Água deionizada;
- Álcool Metílico P.A – ACS (Sol-Tech), Brasil;
- Brij<sup>®</sup> 52 (Sigma Aldrich); Alemanha;
- Polissorbato 80 (Via Farma); São Paulo - SP, Brasil;
- Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (Via Farma); São Paulo - SP, Brasil.



## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Desenvolvimento do Sistema Microemulsionado

#### 4.2.1.1 Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)

O valor de EHL proporcionado pela mistura dos tensoativos foi calculado através da Equação 1, obtida por Griffin em 1950:

$$\mathbf{EHL}_{\text{Total}} = \mathbf{0,01} \cdot (\%_{\text{tensA}} \times \mathbf{EHL}_{\text{tensA}}) + \mathbf{0,01} \cdot (\%_{\text{tensB}} \times \mathbf{EHL}_{\text{tensB}}) \quad (1)$$

Onde:

$\mathbf{EHL}_{\text{Total}}$  = equilíbrio hidrófilo-lipófilo resultante entre o Polissorbato 80 e o Brij<sup>®</sup> 52 na proporção 9:1;  $\%_{\text{tensA}}$  = proporção em porcentagem do tensoativo Polissorbato 80;  $\mathbf{EHL}_{\text{tensA}}$  = equilíbrio hidrófilo-lipófilo do tensoativo Polissorbato 80;  $\%_{\text{tensB}}$  = proporção em porcentagem do co-tensoativo Brij<sup>®</sup> 52,  $\mathbf{EHL}_{\text{tensB}}$  = equilíbrio hidrófilo-lipófilo do co-tensoativo Brij<sup>®</sup> 52.

Sabendo que o valor de EHL requerido pelo ácido cáprico era de 15,3 considerou-se, o valor de EHL para o Polissorbato 80 como sendo 15 e para o Brij<sup>®</sup> 52 o valor de 5,0. Os valores de EHL adotados foram fornecidos pelos seus respectivos fabricantes.

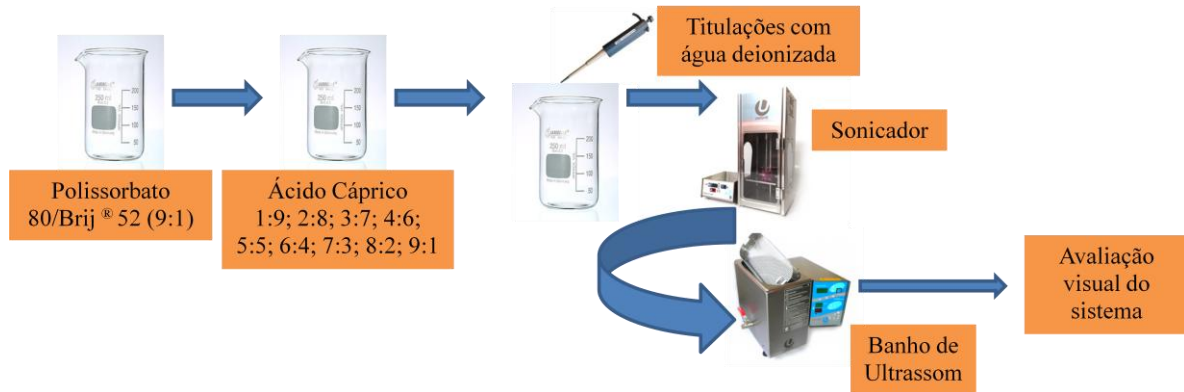
#### 4.2.1.2 Diagrama de Fases Pseudo-ternário (DFPT)

O DFPT foi obtido através da inspeção visual das misturas entre o Polissorbato 80 e o Brij<sup>®</sup> 52 na proporção 9:1 (tensoativo/co-tensoativo), fase oleosa e água deionizada. Foi adicionado à mistura de tensoativos o triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Foram realizadas titulações para adição ao sistema de quantidades pré-determinadas de água deionizada em temperatura ambiente.

Durante a titulação, as amostras foram homogeneizadas em sonda de ultrassom por 1 minuto na potência de 50W, seguida de banho de ultrassom por 1 minuto, sendo as mudanças do aspecto visual do sistema observadas contra um fundo preto (Figura 4). Após as titulações, as devidas proporções de tensoativo, co-tensoativo, óleo e água foram utilizadas para plotagem dos pontos onde se observaram os fenômenos de transição de fases para sistema líquido transparente (ST), microemulsão (ME), microemulsão gel-like (ME-GEL) emulsão líquida opaca (ELO) ou líquida leitosa (ELL), emulsão semi-sólida (ESS) ou separação de

fases (SF). O diagrama foi obtido e os seus pontos foram plotados com o auxílio do software Origin Pro<sup>®</sup> 8.0.

**Figura 4-** Fluxograma para construção do Diagrama de Fases Pseudo-Ternário.



#### 4.2.1.3 Seleção da formulação e incorporação do 5CN05-LSVM

Partindo-se do diagrama obtido, foi selecionada uma formulação para incorporação do 5CN05-LSVM através do método de sonicação. Durante a sonicação, ondas sonoras produzidas pelo sonotrodo causam vibrações mecânicas, seguidas pelo processo de cavitação acústica, no qual as gotículas da emulsão sofrem violentos colapsos, gerando gotículas menores (LIN; CHEN, 2008). O ponto da formulação selecionada encontrava-se na região de formação de ME O/A. Posteriormente aos cálculos, pesou-se o Brij<sup>®</sup> 52, o Polissorbato 80 e o ácido cáprico em seguida realizou-se a incorporação do fármaco 5CN05-LSVM por sonicação, na concentração de  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Por último fez-se a adição de água deionizada. Novamente as amostras foram para o sonificador por mais 1 minuto e no banho de ultrassom pelo mesmo tempo.

#### 4.2.2 Desenvolvimento e Validação de metodologia para doseamento do 5CN05-LSVM

Segundo a Resolução da Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA) (RE) n<sup>o</sup> 899/2003, para métodos analíticos que envolvam a quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação (intervalo), precisão, exatidão e robustez devem ser cuidadosamente avaliados (BRASIL, 2003).

Inicialmente foi realizada uma diluição do 5CN05-LSVM em clorofórmio de modo a obter uma solução padrão (SP) de concentração igual a  $1 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ . Partindo-se da SP foi feita uma diluição em metanol (S1) de concentração igual a  $80 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , que foi posteriormente

diluída até obtenção de uma solução de concentração igual a  $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Esta solução foi submetida a uma varredura espectrofotométrica na região do UV/VIS, na faixa de 300 a 600 nm, com o objetivo de identificar em qual comprimento de onda o fármaco apresentava valores de absorbância máximos.

#### 4.2.2.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade do método espectrofotométrico foram determinadas fazendo-se uma comparação entre as curvas espectrais obtidas através das leituras de diluições individuais do sistema, comparando o comportamento da matriz isenta da substância de interesse (ME-branca), a matriz contendo o 5CN05-LSVM (ME-5CN05-LSVM) e amostras de solução do fármaco em concentração conhecida.

#### 4.2.2.2 Linearidade

Partindo-se de uma diluição do 5CN05-LSVM em clorofórmio a uma concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (SP), obteve-se uma solução S1 de concentração igual a  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em metanol.

Introduziu-se na cubeta 2450  $\mu\text{L}$  de metanol acrescidos de 50  $\mu\text{L}$  da solução S1 e, através de acréscimos sucessivos de 50  $\mu\text{L}$  da mesma solução foram feitas as leituras no comprimento de onda de 386 nm e anotadas as absorbâncias.

A partir das diluições de S1, obtiveram-se soluções de 2; 3; 5; 6; 7; 9; 10; 11; 12; 14; 15 e 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  do fármaco em metanol. A linearidade do método espectrofotométrico foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

#### 4.2.2.3 Exatidão

A exatidão foi determinada por análises em triplicata de três soluções do fármaco em diferentes faixas de concentração, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração, respectivamente 5, 9 e  $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### 4.2.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada através da leitura em sextuplicata de diluições do 5CN05-LSVM na concentração do ponto médio da curva de calibração ( $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). A

precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), por analistas distintos, sendo expressas como coeficiente de variação (CV%) segundo a Equação 2:

$$\mathbf{CV = DP/CMD} \quad (2)$$

Onde:

CV = é o coeficiente de variação;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

#### 4.2.2.5 Robustez

A análise da robustez foi realizada com a alteração de dois parâmetros no método. As modificações propostas consistiram na utilização do metanol proveniente de diferentes fornecedores e diferentes modelos de espectrofotômetro UV/VIS. Os valores das absorbâncias foram obtidos em triplicata, sendo expressos juntamente com seus respectivos desvios-padrões.

#### 4.2.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados de acordo com as equações 3 e 4 (BRASIL, 2003):

$$\mathbf{LD = DP \times 3/IC} \quad (3)$$

$$\mathbf{LQ = DP \times 10/IC} \quad (4)$$

Onde:

LD= Limite de detecção;

LQ= Limite de Quantificação;

DP = desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com três curvas analíticas;

IC = média dos coeficientes angulares das respectivas curvas.

#### 4.2.2.7 Doseamento do 5CN05-LSVM no sistema microemulsionado

Para quantificar o 5CN05-LSVM contido na ME foram realizadas diluições em triplicata da formulação em metanol de modo a obter uma solução de concentração teórica igual a  $9 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Testou-se a diluição ME em acetonitrila, entretanto, não foi possível realizar

as leituras em espectrofotômetro UV/VIS, uma vez que ao adicionar o solvente o sistema apresentava-se turvo. O valor médio de absorbância foi utilizado para determinação da concentração real da amostra por meio da equação da reta obtida durante a determinação do parâmetro linearidade.

#### 4.2.3 Caracterização físico-química das formulações

As formulações ME-5CN05-LSVM e ME-branca foram caracterizadas em termos de aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica e eficiência de encapsulação. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

##### 4.2.3.1 Aspecto macroscópico

Aspectos como coloração, homogeneidade das microemulsões, separação de fases ou presença de precipitados foram avaliados decorridas 48 horas após a obtenção de cada formulação. As amostras encontravam-se armazenadas em frascos transparentes, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente (25°C).

##### 4.2.3.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado em pHmetro com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 à uma temperatura de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

##### 4.2.3.3 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das formulações foi determinada em condutivímetro digital. O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de  $1413 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , à temperatura de 25°C.

##### 4.2.3.4 Eficiência de Encapsulação da ME-5CN05-LSVM

Para realização deste ensaio, 1ml da ME-5CN05-LSVM foi submetido à centrifugação (4300g por 1h). Ao término do ciclo, alíquotas do sobrenadante foram cuidadosamente

extraídas e diluídas em metanol de modo a obter soluções com concentração teórica de 9  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A Eficiência de Encapsulação (EE) foi calculada conforme Equação 5 (DAMASCENO, 2005):

$$\mathbf{EE = (Abs_{sob}/Abs_{form}) \times 100} \quad \mathbf{(5)}$$

Onde:

**EE** = eficiência de encapsulação;

**Abs<sub>sob</sub>** = Absorbância do sobrenadante das formulações pós-centrifugação no  $\lambda= 386$  nm;

**Abs<sub>Form</sub>**= Absorbância das formulações antes da centrifugação no  $\lambda= 386$  nm.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do Sistema Microemulsionado

#### 5.1.1 Diagrama de Fases Pseudo-ternário (DFPT)

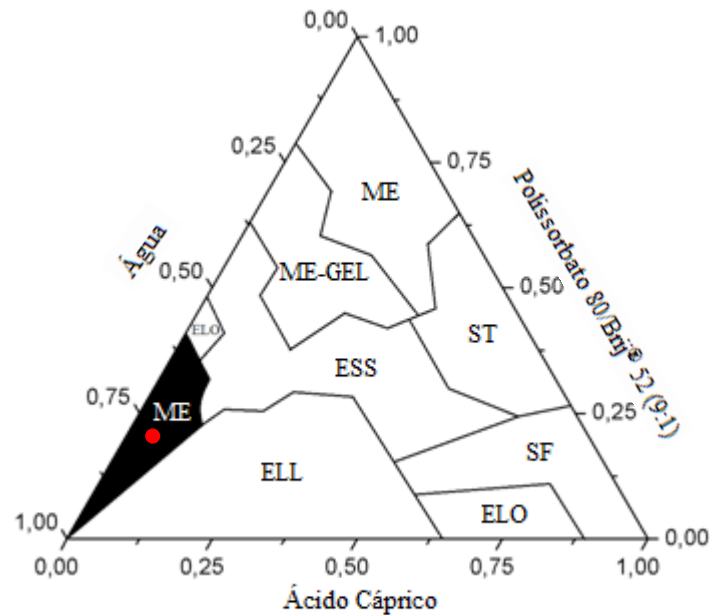
O estudo do diagrama de fases é de extrema importância para o desenvolvimento de sistemas microemulsionados. Para que tais formulações consigam se apresentar estáveis, é preciso direcionar a procura pelo sistema de tensoativos ideal para estabilizar a formulação pretendida (DALTIM, 2011). De acordo com Damasceno et al. (2011), esta procura pode ser auxiliada através do EHL, o qual leva em consideração a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo.

Segundo Ansel et al. (2000), o tensoativo escolhido deve possuir EHL igual ou o mais próximo possível do valor requerido pela fase oleosa, podendo-se fazer a combinação de dois ou mais emulsionantes de modo a obter-se um EHL resultante semelhante ao da fase oleosa.

Como discutido optou-se por construir um diagrama de fases no qual a proporção de tensoativos utilizados fosse capaz de fornecer um valor de EHL próximo ao triglicerídeo do ácido cáprico de valor (15,3), favorecendo assim a formação de sistemas microemulsionados estáveis. A proporção 9:1 (Polissorbato 80/Brij<sup>®</sup> 52), foi escolhida para obtenção do diagrama, uma vez que com esta combinação é possível obter formulações com valor de EHL igual a 14.

A Figura 5 representa o comportamento de fase das misturas dos tensoativos, fase oleosa e aquosa, obtidas neste estudo. Diversos são os estados observados, ressaltando-se a presença de áreas de formação de microemulsão, que são regiões onde a energia empregada e as proporções dos componentes foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até a formação de um sistema homogêneo, límpido e translúcido (SILVA et al., 2009a).

**Figura 5**– Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema Polissorbato 80/Brij® 52 (9:1), ácido cáprico e água.



SF: separação de fases; ELL: emulsão líquida leitosa; ELO: emulsão líquida opaca; ESS: emulsão semi-sólida; ME-GEL: microemulsão gel; ST: sistema transparente; ME: microemulsão, ●: Formulação ME selecionada.

### 5.1.2 Seleção da Formulação

A partir do diagrama obtido, selecionou-se uma formulação para incorporação do 5CN05-LSVM. A Tabela 1 apresenta as proporções dos componentes da formulação. Escolheu-se um ponto do diagrama que representasse uma formulação ME do tipo óleo em água (O/A).

Tabela 1– Composição percentual (p/p) da formulação selecionada.

Constituintes	Percentual (%)
Água deionizada	67,0
Ácido Cáprico	8,0
Polissorbato 80/Brij® 52 (9:1)	25,0

### 5.1.3 Incorporação do 5CN05-LSVM

Damasceno et al. (2011) afirmaram que a encapsulação máxima de um fármaco em uma formulação ME pode ser alcançada incorporando o mesmo durante a formação do sistema. Guimarães (2013) por sua vez, avaliou dois métodos distintos de incorporação e comprovou através da eficiência de encapsulação que o método de sonicação foi capaz de proporcionar melhor incorporação; este é descrito como um método rápido e eficiente para



formulação de microemulsões estáveis com pequeno diâmetro de gotículas e com reduzida polidispersão.

O diâmetro das gotículas também pode ser controlado pela otimização de outros parâmetros como a proporção de óleo e tensoativos, viscosidade da fase contínua, tempo de emulsificação e energia aplicada (GHOSH, MUKHERJEE, CHANDRASEKARAN, 2013; NAKABAYASHI et al., 2011).

De modo a aperfeiçoar o processo de incorporação do 5CN05-LSVM na ME, optou-se por adicionar uma alíquota do mesmo à mistura de tensoativo/co-tensoativo e fase oleosa, levando-a em seguida ao sonicador por um intervalo de 1 minuto. Decorrido este tempo, realizou-se a adição da fase aquosa, sendo a mistura submetida a mais um ciclo de sonicação nas mesmas condições anteriormente citadas.

De acordo com DAMASCENO et al. (2011) a incorporação de fármacos lipofílicos em sistemas microemulsionados do tipo O/A, como o obtido neste trabalho, pode ocorrer por meio da solubilização das moléculas do ativo no filme interfacial de tensoativos ou no núcleo oleoso das gotículas, os quais apresentam propriedades distintas das do meio aquoso externo.

Após a incorporação, notou-se mudança de cor do sistema, que passou de uma mistura com coloração amarelo opaca (A) para um sistema ainda translúcido e de coloração mais amarelada (B). Visualmente a solubilização do fármaco demonstrou ter sido adequada devido à ausência de precipitado mesmo depois de decorridas 48 horas.

**Figura 6**– Representação da ME-branca (A) e da ME-5CNO5-LSVM (B).

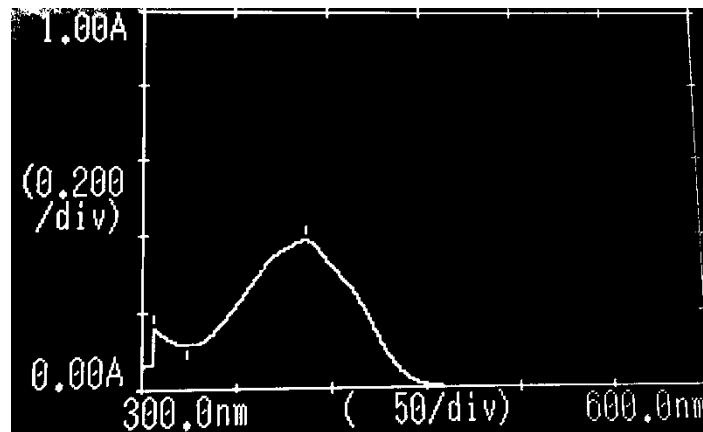


## 5.2 Desenvolvimento e Validação de metodologia para doseamento do 5CN05-LSVM

### 5.2.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

A partir da diluição do 5CN05-LSVM em metanol, foi realizada uma varredura espectrofotométrica, na faixa de 300-600 nm (Figura 7), verificando-se que o máximo de absorbância encontrava-se no comprimento de onda de 386 nm, este valor foi definido para utilização no desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria UV/VIS.

Figura 7– Varredura espectrofotométrica da solução do 5CN05-LSVM.



### 5.2.2 Especificidade e Seletividade

A avaliação da seletividade deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico. Este parâmetro deve ser monitorado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (SILVA et al., 2010).

A metodologia desenvolvida para quantificação do 5CN05-LSVM demonstrou ser seletiva, uma vez que em leituras pontuais da formulação branca em 386 nm não houve valores significativos de absorbância que pudessem influenciar nos resultados. De acordo com a legislação, o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz sem o fármaco apresentar absorbância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (BRASIL, 2003; ICH; 2005). O método adotado foi também capaz de produzir resposta para o analito em questão sendo, portanto, considerado específico (Figura 8).

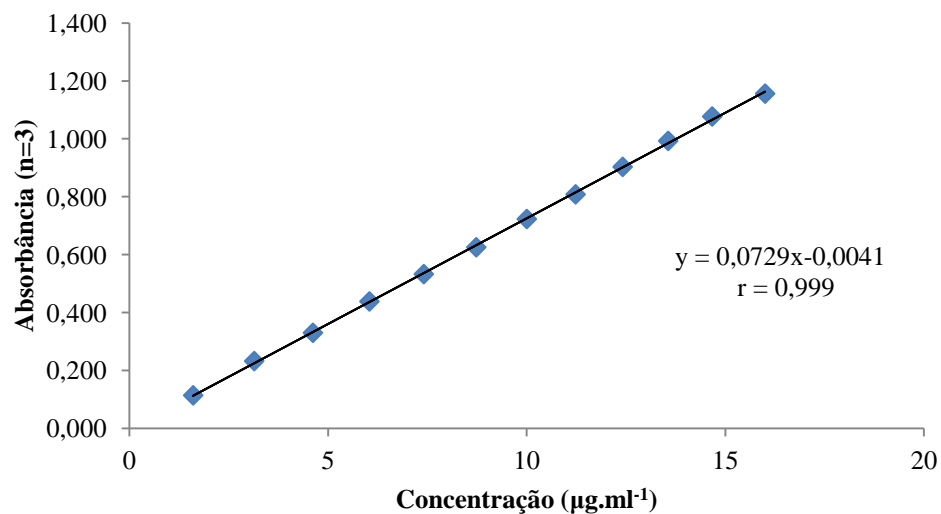
**Figura 8**– Varredura espectrofotométrica da ME-5CN05-LSVM



### 5.2.3 Linearidade

A curva obtida, bem como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 9.

**Figura 9**– Curva de calibração obtida para avaliação do parâmetro Linearidade.



O método apresentou-se linear em uma faixa de 2 a 16 µg.ml<sup>-1</sup>. A curva analítica ( $y = 0,0729x - 0,0041$ ), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,999. O valor mínimo de  $r$  estabelecido pela RE 899/2003 é  $r = 0,99$  (BRASIL, 2003) sendo recomendado pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90.

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (NUNES et al., 2005). Sendo assim, o valor de  $r$

obtido para a análise do 5CN05-LSVM pelo método de espectrofotometria UV/visível encontra-se dentro das conformidades legais exigidas.

O limite de detecção e o limite de quantificação encontrado foi de  $0,10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.2.4 Exatidão

O resultado das análises em triplicata das 3 concentrações (baixa, média e alta) do 5CN05-LSVM, conforme Tabela 2, mostra que o método pôde ser considerado exato, visto que os coeficientes de variação encontram-se inferiores a 5%, limite este estabelecido pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 2– Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.

<b>Parâmetro</b>	<b>Concentração Nominal (<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração Obtida (média <math>\pm</math> DP*; n=3)</b>	<b>Precisão (CV** %)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Exatidão</b>	5,00	4,58 $\pm$ 0,009	2,57	92,00
	9,00	8,63 $\pm$ 0,01	1,84	96,00
	12,00	12,44 $\pm$ 0,03	3,28	104,00

\*DP: Desvio Padrão; \*\*CV: Coeficiente de Variação; (n=3): Número de Amostras.

#### 5.2.5 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (inter-corrída) e a precisão intermediária (intra-corrída). Amostras na concentração do ponto médio da curva de calibração ( $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) foram analisadas em sextuplicata (repetibilidade) e em dias distintos e por analistas distintos (precisão intermediária). A Tabela 3 exhibe os valores de concentração obtidos e seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 3– Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

<b>Analista</b>	<b>Dia</b>	<b>Concentração nominal (µg/ml)</b>	<b>Concentração obtida (média ± DP*; n=6)</b>	<b>Precisão (CV** %)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
Analista 1	Dia 1	9,00	8,77 ± 0,01	3,03	97,49
	Dia 2	9,00	7,31 ± 0,01	2,45	89,00
Analista 2	Dia 1	9,00	8,71 ± 0,01	1,73	96,80
	Dia 2	9,00	7,48 ± 0,02	3,97	83,00

\*DP: Desvio Padrão; \*\*CV: Coeficiente de Variação; (n=6): Número de Amostras.

O coeficiente de variação apresentou um valor menor que 5%; e a exatidão das medidas realizadas se mostrou próxima a 100%, demonstrando que o parâmetro precisão atendeu às exigências da RE 899/2003.

#### 5.2.6 Robustez

A Tabela 4 mostra os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método espectrofotométrico. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções na concentração do ponto médio utilizando metanol proveniente de diferentes fornecedores e leitura das soluções em diferentes espectrofotômetros.

Tabela 4– Determinação da robustez do método espectrofotométrico validado.

<b>Modificação</b>	<b>Concentração Nominal (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Obtida (média ± DP*; n=3)</b>	<b>Precisão (CV**%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Solvente</b>				
Nuclear	9,00	8,38 ± 0,006	1,00	93,14
Sol-Tech	9,00	8,63 ± 0,01	1,84	95,88
<b>Espectrofotômetro</b>				
UV-mini 1240	9,00	8,63 ± 0,01	1,84	95,88
Spectrum SP-2000	9,00	8,60 ± 0,01	1,62	95,58

\*DP: Desvio Padrão; \*\*CV: Coeficiente de Variação; (n=3): Número de Amostras.

Para Ribani et. al. (2004), muitas são as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos, por isso a avaliação

de tais modificações torna-se necessária. Para que um método seja considerado robusto é importante que ele não seja afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Portanto, foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em meio às variações realizadas.

### 5.2.7 Doseamento do 5CN05-LSVM no sistema microemulsionado

Para o doseamento do 5CN05-LSVM foram realizadas diluições das formulações em metanol, à concentração de  $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A partir desta diluição foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 386 nm, estabelecendo-se a média das absorvâncias e por meio da equação da reta obteve-se o valor real de sua concentração.

Tabela 5– Determinação da concentração real da microemulsão contendo 5CN05-LSVM.

Formulação	ABS* $\pm$ (média $\pm$ DP**; n=3)	Concentração Nominal ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Concentração Obtida (média $\pm$ DP**; n=3)	Concentração Real na ME (média $\pm$ DP**; n=3)
ME-5CN05-LSVM	$0,706 \pm 0,08$	9,00	$9,73 \pm 0,98$	$108,11 \pm 10,91$

\*ABS: Absorbância ; \*\*DP: Desvio Padrão; (n=3): Número de Amostras.

A concentração do fármaco determinada através do espectrofotômetro UV/VIS na formulação ( $108,11 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) foi muito próxima à concentração do fármaco real incorporada ao sistema ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Acredita-se que este valor excedente na concentração real da ME se deva a característica amorfa do fármaco 5CN05-LSVM, o que pode ter contribuído para dificultar a pesagem do mesmo. Entretanto, pode-se considerar a dosagem por espectrofotometria UV/VIS como sensível e capaz de determinar a real concentração de fármaco incorporado ao sistema microemulsionado.

### 5.3 Caracterização físico-química das formulações

Durante o processo de obtenção da formulação ME-5CN05-LSVM verificou -se que a adição do fármaco não modificou o aspecto translúcido e a consistência apresentada da formulação, diferindo da ME-branca principalmente quanto à coloração, que se tornou fortemente amarelada. Esta mudança relaciona-se ao fato do 5CN05-LSVM apresentar-se como um pó amorfo de coloração amarela, conferindo ao sistema esta característica. A Tabela

6 resume os dados obtidos durante a caracterização físico-química das formulações com e sem o fármaco.

Tabela 6– Caracterização das microemulsões.

Parâmetros	Formulações	
	ME-branca	ME-5CN05-LSVM
Aspecto Macroscópico	Límpido	Límpido
pH	7,2 ± 0,35	7,1 ± 0,1
Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	132,5 ± 1,8	132,4 ± 2,81

As amostras foram manipuladas e mantidas à temperatura ambiente (25°C) por 48 horas antes da caracterização. Posteriormente, todas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, livre de indícios de separação de fases ou formação de precipitados.

Os valores de pH evidenciados para as formulações ME-branca e ME-5CN05-LSVM encontraram-se dentro de uma faixa de pH considerada ideal para formulações tópicas. Segundo Silva et al. (2010), o pH ideal de uma formulação tópica é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele, sendo aceitáveis valores entre 5,5 e 8,0.

Os valores de condutividade apresentados sugerem que ambos os sistemas apresentem propriedades de fase externa aquosa, uma vez que a condutividade elétrica está relacionada ao tipo de microestrutura apresentada pela ME, sendo importantes para determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos (LAWRENCE, REES, 2000). Logo pode-se inferir que o sistema formado é uma microemulsão do tipo O/A.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada através da comparação entre os valores de absorbância das amostras antes e após a centrifugação. Os resultados obtidos na determinação da EE em triplicata encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7– Determinação da eficiência de encapsulação do 5CN05-LSVM na formulação ME.

Amostra	Pré-centrifugação ABS* (média ± DP**)	Pós-centrifugação ABS* (média ± DP**)	EE*** (%)
ME-5CN05	0,706 ± 0,088	0,569 ± 0,063	80,54

\*ABS: Absorbância; \*\*DP: Desvio Padrão; \*\*\*EE: Eficiência de Encapsulação.

Não foram observadas separação de fases em nenhuma das formulações após o processo de centrifugação, entretanto, as amostras apresentaram discreta precipitação do fármaco. Mesmo com a presença de precipitado, o percentual de fármaco incorporado ao sistema foi 80,54%, o que caracteriza a incorporação por sonicação como sendo satisfatória.



## 6 CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados obtidos pôde-se concluir que a construção do diagrama de fases se mostrou uma ferramenta simples e de grande utilidade na identificação das regiões de microemulsões, facilitando a seleção do ponto de melhor escolha para incorporação de fármacos lipofílicos como o 5CN05-LSVM. A metodologia de incorporação por sonicação se mostrou bastante eficaz na obtenção de sistemas microemulsionados límpidos e transparentes.

O método analítico desenvolvido apresentou confiabilidade e segurança necessárias para o doseamento em formas farmacêuticas ou sistemas de liberação como as microemulsões, visto que demonstrou estar em conformidade com as especificações exigidas pela legislação em vigor. Os parâmetros estudados garantiram que o método apresentou seletividade, linearidade, exatidão e precisão, sendo considerado, portanto, validado conforme a RE 899/2003 da ANVISA.

De modo geral as formulações ME-5CN05-LSVM apresentaram características físico-químicas favoráveis a sua aplicação cutânea, o que as habilitam para futuros ensaios com a finalidade de torná-las alternativas para o tratamento de doenças antifúngicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHANYAN, M.S.; ASSI, K.H.; CLARK, B.J.; HANAEE, J. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 397–402, 2011.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.
- ARAÚJO, I. B. **Novos Sistemas Carreadores para Anfotericina B: Estudo dos parâmetros tecnológicos e fármaco-toxicológicos**. 2005.112f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 64, n. 1, p. 23-35, 2006.
- BAKER, R.C.; FLORENCE, A.T.; TADROS, T.F.; WOOD, R.M. Investigations into the Formation and Characterization of Microemulsions .1. Phase-Diagrams of the Ternary-System Water Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol and the Quaternary System Water Xylene Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol. **Journal Colloid Interface Science**, v. 31, n. 2, p. 100-311, 1984.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no brasil: proposta de criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, p. 56-63, 2005.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal - As bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M.G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J.P.; COSSON, P. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1336–1342, 2007.
- BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology Duluth**, v. 3, p. 46-54, 1987.

BONINI, C; CHIUMMIENTO, L; DE BONIS, M; FUNICELLO, M; LUPATTELLI, P. Synthesis of a first thiophene containing analog of the HIV protease inhibitor nelfinavir. **Tetrahedron Lett**, v. 45, n. 13, p. 2787-2799, 2004.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE\\_899\\_validacao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_validacao.pdf)>. Acesso em 18 março 2014.

CONSTANTINIDES, P.P.; YIV, S.H. Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsions under Different Dilution and Storage-Conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 34, n. 2-7, p. 115-225, Mar. 1995.

CRUZ, D'J.O.; UCKUN, M.F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, Stoneham, v. 64, p.113-123, 2001.

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

DAMASCENO, B. P. G. L. **Estudo do comportamento físico-químico e farmacotológico da anfotericina B em microemulsões do tipo O/A**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2005.

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

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

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

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

FRANZINI, C. M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral.** 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 338-344, 2013.

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

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado de tiofeno.** 2013. 107f. (Dissertação) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2013.

HOAR, T.P.; SCHULMAN, J.H. Transparent water-on-oil dispersions, the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 3, p. 102-153, 1943.

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

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

JÚNIOR, A. S. C.; FIALHO, S.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, p. 385-391, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

NAIR, M.G.; ABRAHAM, A. Thiophene substitutes antitumor antifolates. US n. Patent 5260296 A, n. 5, p. 260-296, 9 novembro 1993.

NAKABAYASHI, K.; AMEMIYA, F.; FUCHIGAMI, T.; MACHIDA, K.; TAKEDA, S.; TAMAMITSUB, K.; ATOBE, M. Highly clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification. **Chemical Communications**, v. 47, n. 20, p. 5765-5767, 2011.

NUNES, R.S.; SENNA, B.A.A.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

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

PINTO, E.; QUEIROZ, M.J.; VALE, S. L.A.; OLIVEIRA, J.F.; BEGOUIN, A.; BEGOUIN, J.M.; GIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 8172-8177, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

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

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

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

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

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

TALLEY, J.J.; BERTENSHAW, S.R.; COLLINS, P.W.; PENNING, T.D.; REITZ, D.B.; ROGERS, R.S. 3,4-Diaril thiophenes and analogs thereof having use as anti-inflammatory agents. **US Patent**, n. 7, v. 30, p. 153, 2006.

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

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