

MICROEMULSÕES II: APLICAÇÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA¹

MARIA VIRGÍNIA SCARPA²

LUCIANE FLÁVIA RODRIGUES CERA³

1. Professor adjunto, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara – Unesp. Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902-Araraquara, São Paulo. e-mail: oliveiag@fctar.unesp.br

2. Professor assistente doutor, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara, São Paulo. e-mail: mvscarpa@fctar.unesp.br

3. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Araraquara, São Paulo.

Introdução

Embora o sistema já tenha sido definido na parte I deste trabalho, convém lembrar que as microemulsões (ME) são sistemas transparentes, termodinamicamente estáveis, contendo óleo e água, estabilizados por compostos tensoativos usualmente associados a um co-tensoativo, o qual pode ser um álcool de cadeia curta ou média, amina ou outra molé-

cula anfifílica apropriada (1). O trabalho anterior abordou os parâmetros da fundamentação teórica na formação do sistema microemulsionado, incluindo alguns aspectos práticos e a caracterização do sistema baseado em diagramas de fase (2).

A principal característica das microemulsões está no tamanho das gotículas da fase interna, que tipicamente são da ordem de 100Å, podendo chegar até aproximadamente 1000Å, enquanto que o diâmetro das gotículas numa emul-

são cineticamente estável é da ordem de 5000Å (3, 4). Em razão desse reduzido tamanho das gotículas dispersas, as microemulsões oferecem vantagens adicionais sobre as emulsões como sistemas de liberação de fármacos, principalmente para aqueles que são pouco solúveis em água (5).

As propriedades das microemulsões são extremamente variadas, sendo a grande diversidade de suas aplicações consequência direta desse aspecto. Desde que quantidades apreciáveis de água e óleo podem ser readicionadas as microemulsões, este sistema constitui um excelente meio de solubilização, suportando altas concentrações de substâncias nas fases aquosa e oleosa (6, 7).

As microemulsões podem apresentar-se na forma de gel ou líquido, sendo interessantes não somente pela sua transparência óptica, mas, principalmente, pela sua estabilidade termodinâmica (8). Além de aplicações gerais tais como sistemas contendo fragrâncias de aplicação bucal, loções após-barba, anti-sépticos e inseticidas, a aplicação na área farmacêutica é particularmente atrativa pelo fato de poderem proporcionar ação prolongada, tropismo diferenciado para determinados tecidos ou órgãos do organismo e por poderem veicular fármacos com diferentes graus de hidrofilia/lipofilia na mesma formulação.

Sistemas de liberação de fármacos

A aplicação de microemulsões como sistemas capazes de proporcionar a liberação de fármacos através por várias vias de administração têm sido discutida na literatura (9, 10) e o potencial dessa utilização foi descrito por vários autores (11, 12).

Microemulsões como veículo de liberação tópica

O uso de ME na liberação tópica de fármacos foi descrita na literatura, tendo sido verificado que como o conteúdo de água aumenta de 15 a 58% em termos de peso, a média dos valores de autodifusão para a água também aumenta significativamente, pelo fator de 10 vezes. Para o fluxo transdérmico de água da ME, os valores apresentados possuem um perfil semelhante, com aumento de cinco vezes nas mesmas condições de conteúdo de água.

A conclusão é que a liberação da porção polar da água dessa ME é altamente dependente da composição da ME. A tabela I, apresenta os valores de fluxo transdérmico normalizados em função do fluxo de água para a mesma amostra de pele. Quando a quantidade de água aumenta no sistema, o fluxo transdérmico e a média de autodifusão de água também aumentam (13).

Tabela 1 - Valores de autodifusão e de fluxo transdérmico para a microemulsão

Água (%)	D/Dw	Fluxo Normalizado
15	0.035	0.84
35	0.072	2.5
45	0.100	n/a
52	0.200	n/a
58	0.353	5.2
67	0.363	4.5

D/Dw: Coeficiente de autodifusão da água

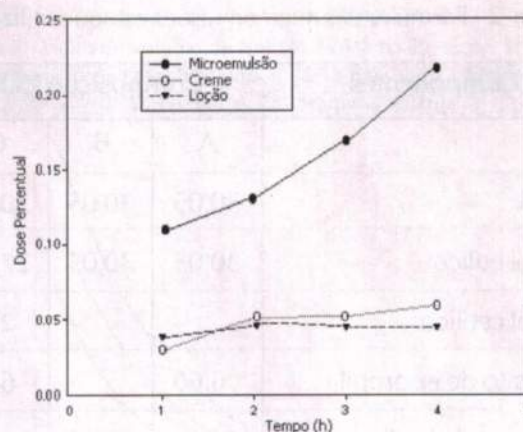
Os baixos valores iniciais para a relação D/Dw e seu subsequente aumento com a adição de água estão diretamente relacionados à ligação de moléculas de água na cabeça polar do tensoativo. Como inicialmente a ligação dessas moléculas será difundida em velocidade muito baixa através do sistema e, provavelmente, na mesma velocidade do tensoativo, com o final da solvatação a maior parte dos sítios de ligação estarão saturados, as moléculas de água livre serão viáveis para difusão e então D/Dw irá aumentar de acordo com o aumento do conteúdo de água.

Microemulsão de liberação transdérmica

A pele exerce intensa função de barreira, deixando penetrar apenas algumas substâncias e em determinadas condições. As microemulsões podem interagir com o extrato córneo desestruturando a camada lipídica do mesmo. Dessa forma os lipídios passam de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através da barreira da pele, fica bastante facilitada.

A permeação *in vitro* de álcool cetílico e octil dimetil PABA através de pele humana e de ratos foi avaliada usando ME água em óleo. Nesse estudo a célula de Frans e microtono criostático de micro-seccionamento foram usados para quantificar a velocidade e a profundidade da penetração das substâncias (14). A velocidade de liberação do álcool cetílico foi muito maior quando comparado com um creme (0,3% contra 0,05%). A figura 1 mostra que a penetração do álcool cetílico na pele humana, com microemulsão como veículo, foi muito mais rápida que o creme e a loção.

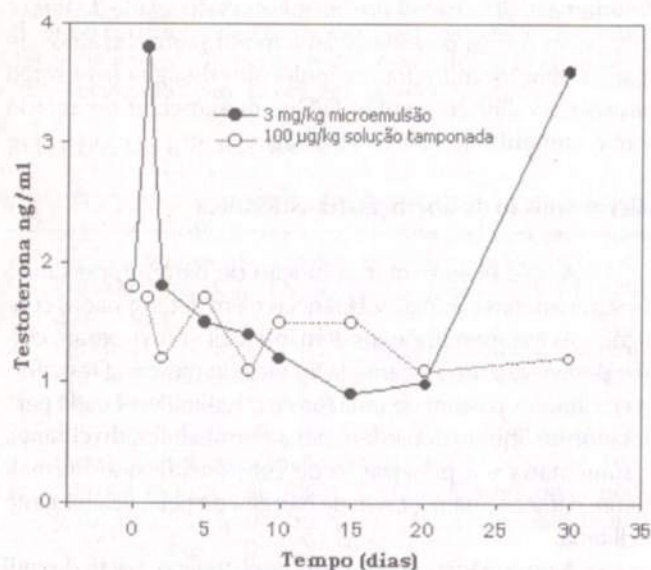
Figura 1 - Velocidade de penetração do álcool cetílico na pele humana com microemulsão, creme e loção (14)



Sistemas de liberação prolongada

Sistema de microemulsão biocompatível de liberação prolongada contendo hormônio luteinizante (LH-RH) foi descrito por Gasco et. al. (9). No estudo, injeção intramuscular de 500µg/ml de um análogo de LH-RH veiculado em microemulsão água em óleo foi aplicada em ratos e o nível de testosterona foi determinado, mostrando efeito prolongado, que durou entre 10 e 20 dias, quando comparado com a administração de 100µg/kg de LH-RH em solução tamponada como padrão de comparação (figura 2).

Figura 2 - Média da concentração plasmática de testosterona em ratos, pela administração de 3 mg/kg de microemulsão de [D-Trp-6] LH-RH em dose única e injeção diária intramuscular de 100mg/kg de solução tamponada (9)



A literatura mostra que a liberação de substâncias ativas dissolvidas na fase interna de microemulsões óleo em água é mais lenta em relação ao fármaco livre, mostrando a habilidade desse tipo de agregado como sistema reservatório que pode proporcionar efeito prolongado. Os estudos com anti-inflamatórios não esteróides conduzidos em nosso laboratório com o piroxicam e naproxeno demonstraram claramente esse fenômeno (5, 15-17). As microemulsões catiônicas utilizadas apresentaram a seguinte composição:

Tabela 2 - Fórmulas das microemulsões estoque utilizadas

Componentes	Composição (%)		
	A	B	C
CTAB	30,05	30,05	30,05
Álcool etílico	30,05	30,05	27,90
Álcool cetílico	-	-	2,15
Miristato de isopropila	6,60	-	6,60
Estearato de butila	-	6,60	-
Tampão fosfato pH 5,5	33,30	33,30	33,30

Os sistemas microemulsionados contendo miristato de isopropila como fase interna foram definidos pelo diagrama de fase apresentado na figura 3, o qual mostra a melhor tendência do sistema em formar microemulsões óleo em água e um limite claramente definido para a formação de microemulsões água em óleo representado pela proporção de 37% de tensoativo (T), 58% de fase oleosa (O) e 5% de fase aquosa.

Figura 3 - Diagrama de fase da microemulsão contendo Etanol-CTAB (T), miristato de isopropila (O) e tampão aquoso (A) (5)

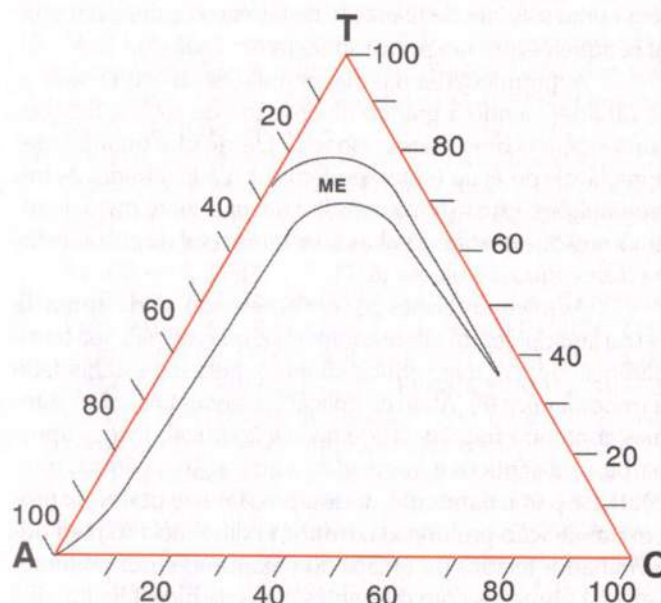


Tabela 3 - Composição das fórmulas de microemulsões contendo piroxicam

Componentes	Fórmulas							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Piroxicam	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
b-ciclodextrina	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5
Carbopol 940®	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0
Microemulsão* q.s.p.	-	-	100	100	-	-	100	100
TpF pH 5,5 q.s.p.	100	100	-	-	100	100	-	-

* Correspondente à fórmula A.

TpF= Tampão fosfato

O perfil de liberação *in vitro* do piroxicam e seus complexos com b-ciclodextrina (b-CD) em tampão fosfato pH 5,5 e microemulsão, através de membrana de acetato de celulose a 37°C (17), mostra que a incorporação do piroxicam no sistema contendo b-CD e microemulsão catiônica interfere muito significativamente no processo de liberação *in vitro* produzindo inibição significativa da velocidade de liberação (figura 4).

Esse fenômeno cria um grau de retenção da substância ativa cerca de dez vezes maior em relação ao controle interno. A característica mais importante evidenciada nos resultados foi o parâmetro de retenção da substância ativa pela fase interna oleosa da microemulsão, a qual proporciona a liberação constante e regular numa faixa mais ampla de tempo, quando comparada ao controle (figuras 4 e 5). Esses resultados são importantes, pois fornecem uma base comparativa complementar para a interpretação dos resultados dos ensaios de atividade anti-inflamatória *in vivo*.

Figura 4 - Efeito de microemulsão catiônica na liberação *in vitro* do piroxicam, em tampão fosfato pH 5,5, através de membrana de acetato de celulose a 37°C (17). Ver tabela 2 para detalhes das fórmulas utilizadas

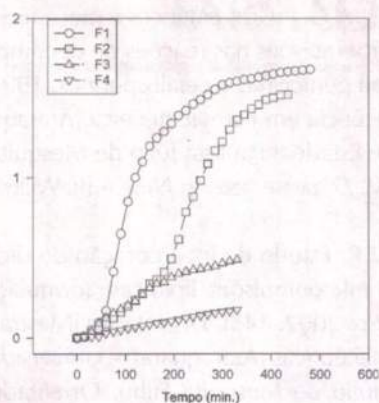
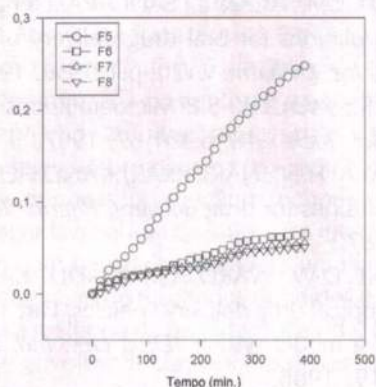


Figura 5 - Efeito da microemulsão catiônica na liberação *in vitro* do piroxicam, em tampão fosfato pH 5,5, através de membrana de acetato de celulose a 37°C (17). Ver tabela 2 para detalhes das fórmulas utilizadas

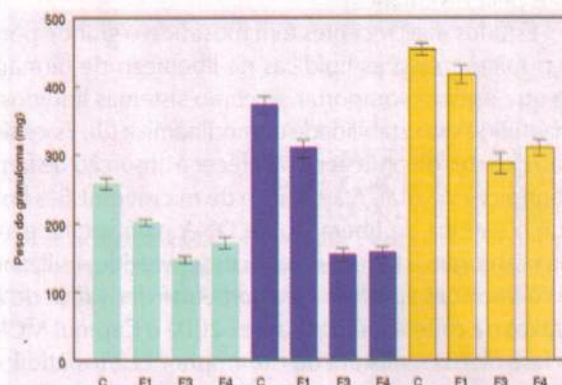


A propriedade da microemulsão como sistema capaz de proporcionar efeito prolongado foi testada *in vivo*, utilizando o método de formação de tecido granulomatoso, ideal para avaliação de inflamação crônica. A duração do efeito antiinflamatório foi testada com as fórmulas F1, F3 e F4, a primeira isenta de ME e as outras que apresentaram maior atividade antiinflamatória por via subcutânea (17). Administrou-se dose única de piroxicam (10mg/kg), por via subcutânea, determinando-se o efeito antiinflamatório depois de 3, 6 e 9 dias.

Ao final do terceiro dia, observou-se que todas as fórmulas exibiam efeito antiinflamatório significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0,05$), sendo que F3 e F4 mostravam efeito superior ao da F1. Ao final do sexto dia, a F3 e F4 mantinham o efeito antiinflamatório superior a F1. Os resultados da figura 6 indicam que a atividade antiinflamatória de F3 e F4 aumentou de 43 e 33%, respectivamente, para 59 e 58%. Por outro lado, F1, contendo piroxicam em tampão, já no terceiro dia, exibia atividade máxima de 21,80%, decaindo no sexto dia para 16,80%.

Esse fenômeno foi muito bem evidenciado, ao final de nove dias, quando a inibição foi não-significativa em relação ao controle ($p > 0,01$). Isso mostra claramente o efeito reservatório *in vivo* proporcionado pela fase interna da microemulsão, o qual demonstra o efeito prolongado da ME como veículo para a administração de AINE's.

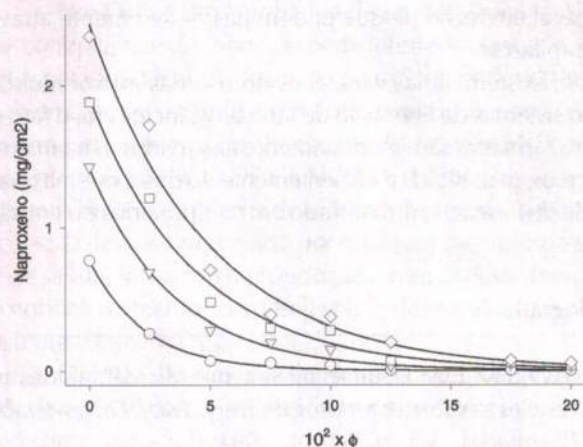
Figura 6 - Efeito da administração subcutânea das formulas F1, F3 e F4 em dose única de 10 mg/kg na formação de tecido granulomatoso no 3º, 6º e 9º dias. C, controle de tampão fosfato pH 5,5. As barras representam a média $\pm$ E.P. com 6 ratos (17)



Para o naproxeno, a liberação *in vitro* mostra intensa dependência da velocidade de liberação em relação ao volume de fase interna da microemulsão (figura 7), demonstrando que o sistema funciona como reservatório do fármaco e proporciona efeito prolongado com relação à atividade antiinflamatória *in vivo* (16).

A Avaliação da atividade antiinflamatória tópica do naproxeno, em ratos, medindo-se o efeito da aplicação do antiinflamatório incorporado ou não em microemulsões, contra um controle de microemulsão sem o fármaco, utilizando-se as metodologias do edema de pata provocado por carragenina, a dermatite por óleo de crôton e a permeabilidade vascular induzida por histamina, revelou que em todos os casos a atividade antiinflamatória foi significativamente mais intensa quando a microemulsão foi utilizada como veículo de administração (16).

Figura 7 - Efeito do volume de fase (ϕ) da ME na liberação *in vitro* do Naproxeno em diferentes tempos. $\diamond$ 60 minutos; $\square$ 120 minutos; ∇ 180 minutos; $\circ$ 240 minutos (16).



Liberação oral de peptídeos e proteínas

A liberação de peptídeos e proteínas, através de administração oral, possui muitos obstáculos em sua aplicação devido às barreiras enzimáticas e físicas do trato gastrointestinal. Degradação de peptídeos ocorre frequentemente em vários locais, tais como lume intestinal e mesmo intracelularmente.

O direcionamento de certos peptídeos por via linfática pode ser interessante pois a corrente sanguínea é muito mais eficiente em remover compostos absorvidos do que a linfa (10). Basicamente, somente fármacos muito lipofílicos e com boa solubilidade em triglicerídeos seriam preferencialmente absorvidos pela via linfática.

Estudos mais recentes têm mostrado o grande potencial das microemulsões lipídicas na liberação de fármacos, desde que podem comportar-se como sistemas líquidos ou gel, mantendo sua estabilidade termodinâmica (8). Esses sistemas são capazes de proteger e favorecer a absorção de fármacos peptídicos via oral. A aplicação de microemulsões lipídicas como sistema de liberação de DNA para vacina gênica por via oral contra a tuberculose foi desenvolvido, utilizando-se microemulsões água em óleo contendo derivados de ácidos graxos de cadeia média (Captex 200 e Capmul MCM) como fase oleosa e mistura de Cremophor EL e fosfatidilcolina de soja como tensoativo (18). Plasmídeos contendo gene repórter b-gal ou gene hsp65 ("heat shock protein" de 65kDa, de *Mycobacterium leprae*) foram incorporados na fase interna da ME.

A imunização de camundongos Balb/c com hsp65 mostrou produção anticorpos IgG total e IgG2a aumentadas em relação aos grupos controle, resposta proliferativa e produção de INF- γ específica nas culturas de células esplênicas dos camundongos. Os dados são indicativos que a transfecção foi alcançada e que a resposta imune desenvolvida seja específica e de padrão Th1, adequado para proteção contra a tuberculose (18).

Conclusões

Ao lado das aplicações mencionadas, certamente existem muitas outras aplicáveis na área farmacêutica. Por exemplo, as ME contendo óleos fluorocarbonados em água podem ser usadas como componentes de sangue artificial, já que são capazes de estocar oxigênio e liberá-lo na presença de dióxido de carbono. Desde que os diâmetros das gotículas da fase interna são menores que 1000 Å, isto faz o sistema aplicável em razão de que podem passar livremente através dos capilares.

Existem várias vantagens no uso das microemulsões como sistemas de liberação de fármacos, incluindo, o fato de que os fármacos são imediatamente absorvidos e, na maioria dos casos, mais rápida e eficientemente do que a mesma quantidade de fármaco administrado em comprimidos ou em cápsulas.

Bibliografia

1. LAWRENCE, M.J. Surfactant Systems: Microemulsions and Vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacok.*, v.3, p.257-69, 1994.
2. OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V. Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. *Infarma*, v.13, 9-10, p.14-19, 2001.
3. BENITA, S. (Ed.) *Submicron emulsion in drug targeting and delivery*. Amsterdam: Harwood Academic, 1998, 338p.
4. GARTI, N. (Ed.) *Thermal behavior of dispersed systems*. New York: Marcel Dekker, 2001, 520p.
5. DALMORA, M.E. & OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with b-ciclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. *Int. J. Pharm.*, v.184, n.2, p.157-164, 1999.
6. OLIVEIRA, A.G. Efeitos cinéticos e mecanísticos de micelas e microemulsões nas reações de decomposição de aminofenil penicilinas e cefalosporinas. 1997. 160f. Tese (Livre-docência em Farmacotécnica [Araraquara]) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
7. TAKEO, M. *Disperse systems*. New York: Willey-VCH, 1999, 317p.
8. CERA, L.F.R. Estudo da incorporação do diclofenaco sódico em microemulsões lipídicas: formulação e liberação in vitro. 2002. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas [Araraquara]) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.
9. GASCO, M.R.; PATTARINO, F.; LATTANZI, F. Long-acting delivery systems for peptides: reduced plasma testosterone levels in male rats after a single injection. *Int. J. Pharm.*, v.62, p.119-23, 1990.
10. SARCIAUX, J.M.; ACAR, L.; SADO, P.A. Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. *Int. J. Pharm.* v.120, p.127-36, 1995.
11. PAUL, B.K.; MOULIK, S.P. Microemulsions: overview. *J. Disper. Sci. Tech.* v.18, p.301-67, 1997.
12. BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A AND LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.* v.11, p.46, 1987.
13. OSBORNE, D.W.; WARD, A.J.; O' NEILL, K.J. Microemulsions as topical drug delivery vehicles. Part 1. Characterization of a model system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v.14, p.1202-19, 1988.
14. LINN, E.E.; POHLAND, R.C.; BYRD, T.K. Microemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dime-thyl PABA. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v.16, p.899-920, 1990.
15. DALMORA, M.E. Interação do piroxicam com microemulsão catiônica e b-ciclodextrina formulação, liberação in vitro e avaliação biológica. 1996. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria. Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.
16. CORREA, M.A. Incorporação do naproxeno em sistema microemulsionado: Liberação in vitro e avaliação biológica. 1997. 146f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos [Sp-Capital]) – Universidade de São Paulo. Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.
17. DALMORA, M. E., DALMORA, S.L., OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. in vitro release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.*, v.222, p.45-55, 2001.
18. WARGAFTIG, T.N. Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose. 2001. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas [Araraquara]) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.