

**ROGÉRIO APARECIDO DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES E SUA TRANSFORMAÇÃO  
*IN SITU* EM GÉIS DE FASE LÍQUIDO-CRISTALINA COMO PLATAFORMA  
PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS  
E SEU USO NO TRATAMENTO DO ALCOOLISMO**

São Paulo  
2017

**ROGÉRIO APARECIDO DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES E SUA TRANSFORMAÇÃO  
*IN SITU* EM GÉIS DE FASE LÍQUIDO-CRISTALINA COMO PLATAFORMA  
PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS  
E SEU USO NO TRATAMENTO DO ALCOOLISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração (Farmacologia)

Orientadora: Profa. Dra. Luciana B. Lopes

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosana Camarini

Versão original

São Paulo  
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos, Rogério Aparecido dos  
Desenvolvimento de microemulsões e sua  
transformação in situ em géis de fase líquido-  
cristalina como plataforma para liberação  
sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do  
alcoolismo / Rogério Aparecido dos Santos;  
orientador Luciana Biagini Lopes; coorientador  
Rosana Camarini. -- São Paulo, 2017.  
80 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microemulsão. 2. Fase líquido-cristalina. 3.  
Liberação Sustentada. 4. Tratamento. 5. Alcoolismo.  
I. Lopes, Luciana Biagini, orientador. II.  
Camarini, Rosana, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Rogério Aparecido dos Santos

Título da Dissertação: Desenvolvimento de microemulsões e sua transformação *in situ* em géis de fase líquido-cristalina como plataforma para liberação sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do alcoolismo

Orientador: Luciana Biagini Lopes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.103/2015

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 072/14/CEUA, datado de 20/09/2014, e por solicitação da Profa. Dra. **Luciana Biagini Lopes**, responsável pela linha de pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Rogério Aparecido dos Santos** e da pesquisadora colaboradora Profa. Dra. **Rosana Camarini** ao projeto de pesquisa "*Estudo da geleificação in vivo e cinética de liberação promovida por sistemas bioresponsivos nanoestruturados*".

Aprovo, a inclusão de mais 102 animais e dos experimentos: (1) Avaliação da concentração plasmática após 48 h de aplicação da formulação de libração modificada e (2) Avaliação da influência da formulação sobre o efeito recompensador do etanol em modelo de preferência condicionada por lugar. Tais inclusões propõem elucidar a capacidade dos géis nanoestruturados de sustentar a liberação de um marcador fluorescente, com o objetivo de incorporar os fármacos naltrexona e oxitocina (separadamente) na formulação selecionada (5%, m/m) e avaliar a concentração plasmática após 48 h e a influência do gel sobre a aquisição de preferência por lugar.

São Paulo, 14 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador da CEUA-ICB/USP

*Dedico este trabalho às minhas professoras*

*Professora Dra. Luciana Biagini Lopes e*

*Professora Dra. Rosana Camarini*

## **Agradecimentos**

Ao Universo...

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, ao Departamento de Farmacologia por me aceitar como aluno e permitir a realização deste trabalho.

À minha orientadora, professora Luciana B. Lopes, pela amizade, dedicação, confiança, pelos risos proporcionados, a angústia dividida, a incerteza discutida, ao choro compartilhado, o carinho e os senões e aos momentos de descontração. Agradeço a você minha estimada orientadora, por me cobrar detalhes que me fizeram ser melhor do que eu fui, por entender o momento que tenho passado... por não deixar desistir... antes de chegar ao fim e agradecer, pelo amável fato de ser minha orientadora, minha mãe científica.

À professora Rosana Camarini por sua co-orientação, apoio, colaboração para o desenvolvimento do trabalho sempre que precisei.

Ao professor Alexandre Steiner, por me ensinar o manejo dos animais

À minha inestimável amiga Vanessa Franco, por acolher-me no laboratório...

Ao meu querido amigo Gabriel Costa e Marina Rae pela ajuda nos experimentos comportamentais...

Aos meus amigos de Laboratório... Amanda, Débora, Daniela, Pedro, Sandra, Daniel, Lucas, Mariana, Nivea, Marina...

Aos meus colegas de Departamento, as nossas secretárias, aos nossos funcionários, técnicos e faxineiras... meu muito Obrigado.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que queria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Marthin Luther King)*



## RESUMO

Santos, RA. Desenvolvimento de microemulsões e sua transformação *in situ* em géis de fase líquido-cristalina como plataforma para liberação sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do alcoolismo. [Dissertação (mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo;2017.

Esforços significativos tem sido feitos para desenvolver formulações capazes de sustentar a liberação de fármacos usados no tratamento de doenças crônicas e com baixa adesão, como alcoolismo. Ainda assim, são necessárias formulações simples, seguras, passíveis de auto-administração, que aumentem a taxa de adesão ao tratamento e diminuam o custo da saúde pública. Este estudo focaliza o desenvolvimento de microemulsões que após captação de água *in vivo* do tecido subcutâneo transformar-se-ão em géis de fase hexagonal para liberação sustentada da naltrexona. Diagramas de fase mostrando a relação, o tipo e proporção de componentes e sistemas formados foram construídos, e três microemulsões à base de (i) monooleína e tricaprilina (ME-MO), (ii) vitamina E TPGS e propilenoglicol (ME-TPGS) e (iii) TPGS e Span (ME-Span) foram selecionadas. Todas apresentaram diâmetro inferior a 150 nm e comportamento Newtoniano. ME-MO e ME-TPGS originaram fase hexagonal após intumescimento, enquanto que ME-Span originou fase lamelar. Esta última permitiu a incorporação de 3.8-vezes menos naltrexona, e resultou na liberação mais rápida do fármaco (65% em 96 h), provavelmente em decorrência da sua menor viscosidade. Baseado na capacidade do gel formado de resistir à diluição, ME-MO foi selecionada para estudos *in vivo*. Após administração subcutânea, foi observado formação da fase hexagonal em 48 h e sua persistência por mais de 30 dias em camundongos, promovendo liberação prolongada de Alexa flúor 647 durante esse período. A eficácia da formulação foi avaliada utilizando modelo de preferência condicionada por lugar. Os animais foram distribuídos em quatro grupos, sendo administrado por via subcutânea: 1) solução salina (controle); 2) solução de naltrexona (1 mg/kg) diária por 8 dias (30 min antes da administração de etanol); e 3) ME-MO com 5% ou 10% de naltrexona (administração única). Etanol (2 g/kg) ou salina foram administrados por via intraperitoneal antes do experimento. Todos os animais tratados com naltrexona apresentaram menor preferência condicionada ao etanol, sugerindo redução dos efeitos recompensadores da droga. Não observou-se diferença estatisticamente significativa entre a solução de naltrexona e ME-MO 5%, mas o grupo ME-MO 10% diferiu estatisticamente da solução naltrexona diária e ME-MO 5%. Os resultados sugerem que o ME-MO 10% antagonizou a preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol. Esses resultados demonstram o potencial de ME-MO como uma plataforma para liberação prolongada de fármacos visando o tratamento de dependência química.

**Palavras-chave:** Nanocarreador. Liberação sustentada. Alcoolismo. Naltrexona. Preferência Condicionada por Lugar.

## ABSTRACT

Santos, RA. Development of microemulsions and their *in situ* transformation in liquid-crystalline phase gels as a platform for sustained release of drugs and their use in the treatment of alcoholism. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo;2017.

Significant efforts have been made to develop formulations capable of sustaining the release of drugs used in the treatment of chronic diseases, but simple formulations that can be easily and self-administered, and cause minimal local reactions are still needed. This study focuses on the development of microemulsions that can swell and transition into nanostructured hexagonal phase gels upon water uptake *in vivo* as a platform for sustained release of naltrexone. Microemulsions were prepared using monoolein, vitamin E TPGS (TPGS), BRIJ or Span as structure-forming surfactants in combination with mono or tricaprylin as oil phase, water and propylene glycol as viscosity modifier. Microemulsions composed of (i) monoolein and tricaprylin (ME-MO), (ii) TPGS and propylene glycol (ME-TPGS) and (iii) TPGS and Span (ME-Span) were selected. All microemulsions displayed nanometric size below 150 nm and rheological behavior consistent with Newtonian systems. Uptake of 20% or more of water by ME-TPGS and ME-MO led to formation of hexagonal phase while ME-Span resulted in lamellar phase. The later incorporated 3.8% less naltrexone, and promoted the fastest drug release (approximately 65% within 96 h), most likely due its lower viscosity. ME-MO was selected for further evaluation based on its ability to form gels that resisted dilution. Gels formed *in vivo* approximately 48 h after ME-MO subcutaneous administration, and persisted locally for over 30 days providing slow release of Alexa fluor compared to a propylene glycol solution. Formulation efficacy was evaluated using a conditioned place preference model (CPP). Mice were distributed into groups, and subjected to subcutaneous administration of saline (control), 1 mg/kg naltrexone solution daily (8 days), ME-MO with 5 or 10% naltrexone (single administration), Alcohol (2g/kg) or saline was administered intraperitoneally before CPP training. Statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) between groups naltrexone and ME MO solution 5%. However no statistically significant difference was observed between the solution of naltrexone and ME-MO 5%. These results support the use of ME-MO as a platform for sustained release of drugs useful in the treatment of drug addiction.

**Keywords:** Nanocarrier. Sustained Release. Naltrexone. Alcoholism. Conditioned Place Preference.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modulação da via dopaminérgica mesolímbica pelo sistema opióide.....	20
Figura 2- Representação da estrutura química da molécula de naltrexona.....	22
Figura 3- Esquema do sistema proposto e formação do gel in situ. ....	24
Figura 4- Representação esquemática de vários cristais, cristais líquidos e fases fluídas. ....	25
Figura 5- Idealização das fases formadas por tensoativos e outros lipídios formadores de fases.. .....	27
Figura 6- Aparato manual de preferência condicionada por lugar.....	38
Figura 7- Diagramas de fase ternários mostrando a relação entre o tipo de tensoativo utilizado e os sistemas formados.....	40
Figura 8- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a proporção TPGS:PG.. .....	41
Figura 9- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a proporção TPGS: Span. .....	42
Figura 10- Diagrama de fase pseudoternários mostrando a relação entre a composição de formulações e tipo de sistema formado.....	43
Figura 11- Imagem obtida por Microscopia de luz polarizada da microemulsão ME-TPGS.....	44
Figura 12- Imagem obtida por Microscopia de luz polarizada do cristal líquido. (A) TPGS:.....	44
Figura 13- Comportamento reológico e viscosidade das microemulsões .....	46
Figura 14- Gráficos representativos da distribuição de tamanho de partículas das formulações selecionadas.....	48
Figura 15- Imagem obtidas por microscopia de luz polarizada .....	49
Figura 16- Perfis de intumescimento de sistemas líquido-cristalinos das microemulsões .....	50
Figura 17- Imagem em microscopia de Luz polarizada. ....	52
Figura 18- Liberação da naltrexona em função do tempo quando do uso da solução de fármaco em propilenoglicol, ou das formulações (ME-Span, ME-TPGS, ME-MO).....	53
Figura 19- Gráfico comparando a liberação de naltrexona ME-MO5% e ME-MO 10%.....	53
Figura 20- Formação do gel de fase hexagonal in vivo após 2 (A), 10 (B) e 20 dias (C) da administração de ME-MO.. ....	55

Figura 21- Acompanhamento do processo de liberação do marcador Alexa 647 em função do tempo a partir do gel de ME-MO comparado à solução controle em propilenoglicol.....	57
Figura 22- Formação do gel de fase hexagonal com retenção do marcador no gel ME-MO. ....	58
Figura 23- Análise das médias da radiâncias pelo software IVIS. ....	59
Figura 24- Representação gráfica da média e erro padrão dos grupos estudados.....	60
Figura 25- Análise das diferenças das médias utilizando o <i>post hoc</i> de Tukey.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Razões entre os componentes da mistura de tensoativos e fase oleosa utilizadas no desenvolvimento de microemulsões. ....	32
Tabela 2- Composição das microemulsões escolhidas para incorporação do fármaco.....	32
Tabela 3- Indicação dos parâmetros da microemulsões selecionadas.....	47
Tabela 4- Coeficiente de correlação linear obtido no estudo de intumescimento dos sistemas após imersão em água a 37 <sup>o</sup> C.....	51
Tabela 5- Coeficiente de correlação linear obtido no estudo liberação da naltrexona nos sistemas a 37 <sup>o</sup> C.....	54

## ABREVIATÓES

**CR** = Resposta Condicionada

**CT-NTX** = Controle Naltrexona

**CT-SF**= Controle Salina

**GABA** = ácido gama-aminobutírico

**IVIS**= Sistema de Imageamento *In Vivo*

**ME** = Microemulsão

**ME-MO** =Microemulsão Monoleína

**ME-MO 5%**= Microemulsão de Monoleína contendo 5% de Naltrexona

**ME-MO 10%**= Microemulsão de Monoleína contendo 10% de Naltrexona

**ME-TPGS** = Microemulsão de Vitamina E TPGS e propilenoglicol

**ME-Span** = Microemulsão de Vitamina E TPGS com Span

**NTX**= Naltrexona

**NcAcc** = *nucleo Accumbens*

**VS** = Estriado Ventral

**PCL**= Preferência Condicionada por Lugar

**VTA** = Área Tegmental Ventral

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Alcoolismo e alternativas para tratamento</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Naltrexona e outros fármacos utilizados no tratamento da dependência ao álcool</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3 Liberação sustentada e sistemas de liberação líquido-cristalinos</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Fármaco e reagentes</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Desenvolvimento das microemulsões</b> .....	<b>31</b>
3.2.1 <i>Caracterização das formulações</i> .....	33
3.2.2 <i>Intumescimento</i> .....	34
3.2.3 <i>Incorporação de naltrexona</i> .....	34
3.2.4 <i>Liberação in vitro do fármaco</i> .....	35
<b>3.3 Avaliação da capacidade do gel de sustentar a liberação de um marcador fluorescente</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4 Avaliação da influência da formulação sobre a Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida pelo etanol</b> .....	<b>37</b>
3.4.1 <i>Animais</i> .....	37
3.4.2 <i>Aparato utilizado para PCL</i> .....	37
3.4.3 <i>Preferência Condicionada por Lugar – O teste</i> .....	38
3.4.4 <i>Desenho experimental do protocolo de PCL</i> .....	39
3.4.5 <i>Análise estatística</i> .....	39
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 Desenvolvimento das microemulsões</b> .....	<b>40</b>
4.1.1 <i>Avaliação da isotropia</i> .....	43
4.1.2 <i>Avaliação do comportamento reológico e viscosidade</i> .....	45
4.1.3 <i>Tamanho das gotículas por espalhamento dinâmico de luz</i> .....	47

4.1.4 Incorporação de Fármaco.....	49
4.1.5 Avaliação do intumescimento .....	49
4.1.6 Teste de liberação <i>in vitro</i> .....	52
<b>4.2 Avaliação da formação do gel in vivo e sua capacidade de sustentar a liberação de um marcador fluorescente.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 Avaliação da influência da formulação sobre os efeitos reforçadores positivos induzidos por etanol em modelo de preferência condicionada por lugar .....</b>	<b>59</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>71</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*“Beber inicia num ato de liberdade, caminha para o hábito e, finalmente, afunda na necessidade”.*

Benjamin Rush

O álcool é uma substância que acompanha a humanidade desde seus primórdios e sempre ocupou um local privilegiado em todas as culturas, como elemento fundamental nos rituais religiosos, fonte de água não contaminada ou ainda presença constante nos momentos de comemoração e de confraternização, quando se brinda a todos e a tudo (1).

A dependência ao álcool é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde estima-se consumo *per capita* de 10,1 L de etanol para o ano de 2025, no Brasil. Estatisticamente é responsável por 3,2% das mortes no mundo o que em dado absoluto, representa cerca de 5,5 milhões de morte/ano.

Seu tratamento é desafiador, mesmo para os melhores programas terapêuticos disponíveis. Esta dificuldade decorre do pequeno número de medicamentos aprovados para o uso e também pela elevada taxa de abandono, próximo a 50% (2, 3). A naltrexona, administrada por via oral e atualmente por via intramuscular é uma das poucas opções farmacológicas eficazes disponíveis para o tratamento desta condição.

Sabemos que um dos grandes problemas para o tratamento de algumas doenças crônicas é a incidência de efeitos adversos e alta frequência de administração necessária para alguns fármacos, o que acaba levando à falta de adesão às recomendações médicas, um problema enfrentado no dia-a-dia pelos profissionais da saúde. Aqui propomos o desenvolvimento de sistemas biorresponsivos nanoestruturados para a liberação sustentada de cloridrato de naltrexona, utilizando a via subcutânea como via alternativa à administração oral da naltrexona a fim de melhorar a adesão ao tratamento farmacológico.

## 1.1 Alcoolismo e alternativas para tratamento

O transtorno por uso do álcool representa um grande problema de saúde pública devido à sua prevalência, consequências e custos para sistemas de saúde e conseqüentemente para a sociedade (4). Em 1966 a Associação Médica Americana (AMA) passou a considerar o alcoolismo como doença e em 1988 incluiu as dependências a outras drogas como condições médicas passíveis de tratamento.

O Departamento Nacional de Saúde nos EUA publicou em abril de 2010 que 28% dos adultos acima de 18 anos consomem álcool em níveis que os colocam em risco ao desenvolvimento do alcoolismo e problemas hepáticos, entre outros problemas médicos e psicossociais (5).

Uma pesquisa mais recente conduzida pelo Departamento de Saúde Americano (*U.S. Department of Health and Human Services*) disponível em 2012 apontou que 9.2% da população com idade igual ou superior a 12 anos utilizaram drogas ilícitas durante o mês anterior à pesquisa (aproximadamente 30% admitiram ter usado uma vez na vida) (6). Entre as drogas ilícitas, a maconha (cujo uso médico e até recreacional é legalizado em alguns estados americanos) é a mais utilizada, enquanto que o uso ilegal de analgésicos opióides (como fentanil e oxicodona) encontra-se em ascensão, o que é refletido na busca por tratamento (6,7).

Aproximadamente 52% destes indivíduos admitiram a ingestão de álcool, sendo que 6.2% costumam ingerir 5 doses ou mais uma vez por semana. Paralelamente, sabe-se que as lesões traumáticas representam cerca de 30 % de vidas perdidas nos Estados Unidos anualmente entre pessoas de 1 a 44 anos. Em pacientes traumatizados na emergência, encontra-se a exposição ao álcool em cerca de 30% dos casos (7).

O panorama brasileiro não é muito diferente. De acordo com dados publicados do Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas do Ministério da Justiça em 2010, conclui-se que “álcool e tabaco são as drogas de maior prevalência de uso na vida, em todas as capitais brasileiras seguidas pelos inalantes”. O levantamento realizado em 2007, pela Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas (Senad) investigou os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira. O estudo foi realizado em 143 municípios do País e detectou que 52% dos brasileiros acima de 18 anos faz uso de bebida alcoólica pelo menos uma vez ao ano. Do conjunto dos homens adultos, 11% bebem todos os dias e 28% de 1 a 4 vezes por semana. Quanto à intensidade do consumo de bebidas alcoólicas, 24% da população bebe frequentemente e pesado (pelo menos uma vez por semana, 5 ou mais

doses) e 29% são bebedores pouco frequentes e não fazem uso “pesado”. De acordo com dados do “*National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*” estadunidense cerca de 1,5 milhão de adultos receberam tratamento para alcoolismo em instalações especializadas em 2014.

O álcool é um depressor do sistema nervoso central (SNC) que produz inicialmente euforia, diminuição da ansiedade e excitação em concentração sérica baixa e resposta comportamental variável. O efeito deste está intimamente relacionado à concentração sérica; entre 0,01 – 0,05  $\text{gmL}^{-1}$  tem-se comportamento de aspecto normal, já concentração superior a 0,35  $\text{gmL}^{-1}$  confere estado de coma (8). Compreende desde uma intoxicação aguda, com sintomas que incluem sonolência, ataxia e fala arrastada, até torpor e coma (5). O indivíduo que consome bebida alcoólica de forma excessiva, ao longo do tempo, pode desenvolver dependência, condição conhecida como alcoolismo. Os fatores que podem levar ao alcoolismo são variados, envolvendo aspectos de origem biológica, psicológica e sociocultural. A maioria dos parâmetros de farmacocinética do álcool estão sujeitos à grande variabilidade intersubjetiva, como exemplificado pelas altas concentrações de álcool no sangue atingidas na ingestão de doses idênticas ajustadas em peso, tempo até o pico após o final do consumo e a taxa de eliminação de álcool do sangue (8). O etanol é metabolizado pela álcool desidrogenase com a produção de acetaldeído, que é então metabolizado por uma aldeído desidrogenase mitocondrial conhecida como ALDH2.

Quanto ao mecanismo de ação do etanol, as primeiras hipóteses eram voltadas para sua ação em membranas lipídicas. Pensava-se que, devido ao tamanho pequeno da molécula ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) e à natureza não específica da molécula de álcool, provavelmente não teria um domínio de ligação específico sobre as proteínas, mas interferiria nas membranas lipídicas da central sistema nervoso (SNC). No entanto, o etanol interage com a bicamada lipídica em concentrações muito superiores às clinicamente relevantes (9, 10). Desde então, os pesquisadores buscam outros alvos moleculares da droga. Os efeitos do álcool no encéfalo incluem mudanças nos níveis e função de neurotransmissores, canais iônicos, receptores, enzimas e outras moléculas intracelulares, culminando em mudanças sinápticas em circuitos cerebrais que regulam compulsividade e inibição de comportamento. As mudanças nestes sistemas moleculares levam à tolerância e abstinência, quando o álcool é removido do sistema. As ações primárias inibitórias e ativadoras do etanol sobre os diferentes canais e receptores iônicos dependem de uma

série de variáveis, especialmente da concentração de álcool e a composição da subunidade de um canal ou receptor particular (11).

As regiões cerebrais que desempenham um papel importante na mediação dos efeitos reforçadores do etanol foram identificadas por uma variedade de estudos neurofarmacológicos, com lesão de regiões específicas, microinjeção e microdiálise. A amígdala estendida e a via dorsal mesolímbica, incluindo a área tegmental ventral do mesencéfalo (VTA), o *nucleo accumbens* e o córtex pré-frontal, são as principais regiões encefálicas que medeiam as ações reforçadoras do álcool (12, 13). A via dopaminérgica mesolímbica é conhecida por ser controlada, em grande parte, pela atividade glutamatérgica na VTA. O sistema serotoninérgico proveniente do núcleo dorsal da rafe também exerce influência na atividade dopaminérgica da VTA e do núcleo accumbens. A VTA também é regulado pelo GABA e projeções encefalinérgicas do pálido ventral e do núcleo accumbens. Finalmente, os cannabinoídes (CBs) e os opióides podem aumentar a liberação de dopamina no núcleo accumbens, ativando os neurônios dopaminérgicos na VTA (11, 14, 15).

A via mesolímbica da dopamina para a VTA e para o *nucleo accumbens* / e o estriado ventral (NcAcc/VS) possuem um importante papel no reforço positivo do álcool (16). Os níveis extracelulares de dopamina nos roedores no *nucleo accumbens* estão aumentados tanto quando se faz a injeção deste, ou quando da sua administração por via oral (17). O álcool induz a liberação de dopamina no *nucleo accumbens* / e o estriado ventral e parece mediar a ativação de dopamina nos neurônios no VTA; esse aumento da taxa de disparo é visto tanto *in vivo* quanto *in vitro* (16). A administração do etanol como primeiro efeito, ocasionaria mudanças nos corpos celulares dopaminérgicos, localizados na VTA como aumento de liberação de dopamina no NcAcc, logo maior estimulação de receptores D1 e D2, pelo neurotransmissor conferindo aumento da atividade locomotora (via pálido ventral) e efeito reforçador do etanol.

Estudos com roedores têm demonstrado que o aumento de dopamina no NcAcc após a administração aguda de álcool ocorre, em parte, por uma indução da liberação endógena de opióide, um achado confirmado em humanos (18, 19). O reforço positivo do álcool resulta de uma interação entre álcool, opióides endógenos e dopamina, sendo mediado em parte pela liberação endógena de opióides na área ventral tegumentar do mesencéfalo. Estes opióides inibem a ação inibitória de interneurônios GABAérgicos (ácido gama-aminobutírico), desinibindo a via dopaminérgica. Uma vez essa via “desinibida”, aumentam os disparos neuronais, aumentando a liberação de dopamina no *nucleo*

*accumbens* (20) (figura 1). Assim sendo, o receptor  $\mu$ -opióide parece ter importância particular no reforço positivo do álcool.

Assim, os opióides endógenos estão envolvidos não só nas ações das drogas classificadas como opióides, como também nos efeitos do álcool. Existem três classes de opióides endógenos: endorfinas, encefalinas e dinorfinas. Todos exercem seus efeitos ao interagir com três subtipos de receptores opióides:  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . A hipótese de que o reforço positivo do álcool é mediado, pelo menos em parte, pela liberação de opióides endógenos no encéfalo é apoiada por numerosos estudos que demonstram que os antagonistas de opióides suprimem o consumo de álcool em uma variedade de espécies e modelos (21). Além disso, a inativação completa (isto é, *knockout*) do receptor de opióides  $\mu$  bloqueia a auto-administração de álcool em camundongos. A naltrexona, um antagonista de receptor de opiáceos subtipo-inespecífico, atualmente aprovado como um tratamento para o alcoolismo em seres humanos é particularmente eficaz na redução do consumo excessivo de álcool. Os sistemas opióides influenciam as ações do etanol tanto através da interação com o sistema dopaminérgico mesolímbico, quanto independente dele, como demonstrado pelo aumento induzido pelo etanol no conteúdo extracelular de endorfina no *nucleo accumbens* (ver figura 1).

Os antagonistas dos receptores de opióides interferem com os efeitos recompensadores do álcool, atuando em locais na área ventral tegmental, *nucleo accumbens* e núcleo central da amígdala (22).

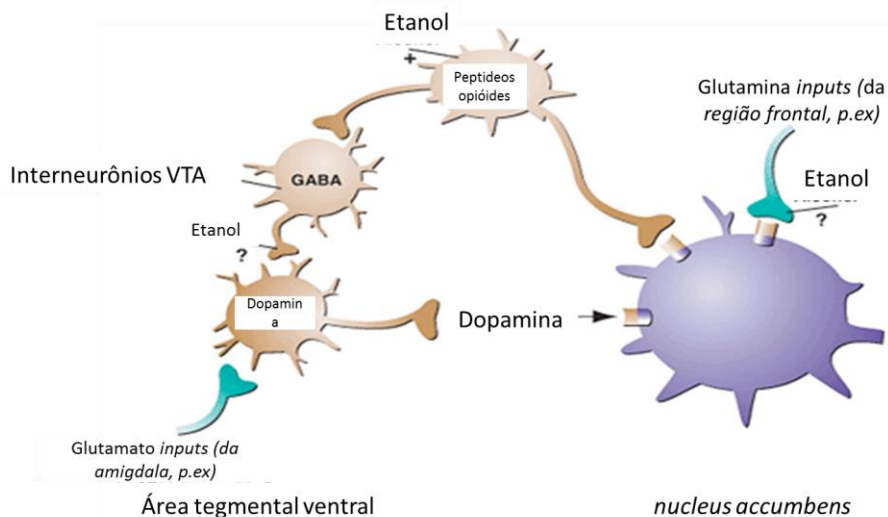


Figura 1- Modulação da via dopaminérgica mesolímbica pelo sistema opioide. Fonte: *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA).

As propriedades reforçadoras do álcool podem ser avaliadas usando um procedimento chamado preferência condicionamento por lugar. O condicionamento é amplamente definido como um pareamento entre um estímulo não-condicionado e um estímulo condicionado. O estímulo não-condicionado é a administração do fármaco ou outra recompensa ao modelo, e o estímulo condicionado é o ambiente distinto no qual o animal é colocado após a administração do fármaco ou recompensa (23). O pareamento muitas vezes se desenvolve de uma associação entre os estímulos não-condicionado e o estímulo condicionado que resulta em uma futura resposta condicionada (CR). O CR pode assumir a forma de preferência ou aversão exibida durante o período de teste. No período de teste, o organismo tem acesso livre para entrar em uma câmara previamente associada ao medicamento ou para entrar em uma câmara não associada ao medicamento (24). Neste procedimento, as pistas contextuais estão associadas à presença ou ausência da droga - por exemplo, os roedores são repetidamente colocados em um ambiente específico onde recebem etanol e em outro ambiente onde recebem salina. Posteriormente, os roedores podem explorar livremente esses ambientes. Se o animal gasta mais tempo explorando o ambiente pareado com etanol, esse comportamento reflete os efeitos de reforço positivo condicionado do etanol (25).

## **1.2 Naltrexona e outros fármacos utilizados no tratamento da dependência ao álcool**

O fármaco naltrexona foi aprovado pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration (FDA)* como farmacoterapia para o alcoolismo e sua eficácia tem suporte em uma meta análise de muitos estudos clínicos randomizados (26). As mensurações motivacionais descritas foram suprimidas pela deleção genética do receptor  $\mu$ -opióide nos ratos, e resultado similar foi obtido com antagonistas  $\mu$ -opióides. (16, 27, 28). Outros fármacos aprovados incluem o acamprosato, que age nos neurotransmissores de GABA e glutamato, o topiramato, que exerce seu efeito aumentando a inibição GABA e reduzindo a neurotransmissão glutamatérgica, e o dissulfiram, que interfere na degradação do álcool, resultando no acúmulo de acetaldeído, o que produz uma reação de “desprazer” (náuseas, palpitações, rubor facial, por exemplo).

A naltrexona é um antagonista de opióides com maior afinidade aos receptores do tipo  $\mu$ , de maneira que o paciente não obtém a sensação de prazer/ euforia associada ao uso de opióides (10, 11). A naltrexona está relacionada quimicamente com outro antagonista de receptores opióides conhecido como naloxona, entretanto sua

biodisponibilidade oral e a duração de ação são maiores (16). Na figura 2, é representada a estrutura molecular do fármaco.

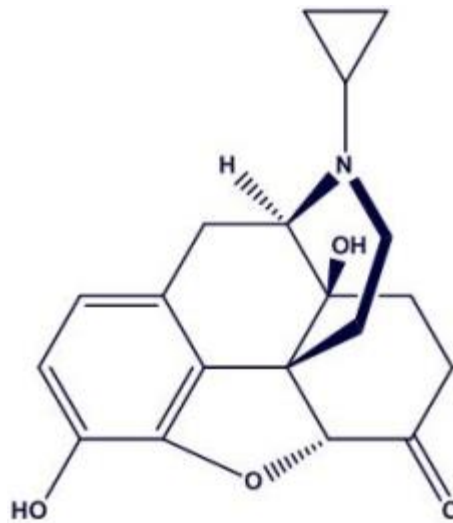


Figura 2- Representação da estrutura química da molécula de naltrexona.

O fármaco também reduz a taxa de recaída do consumo e o desejo compulsivo pelo álcool (29). Há ainda relatos de melhora terapêutica quando da associação de naltrexona e terapia cognitiva comportamental (30). Além de sua utilização no tratamento de dependência ao álcool, sua administração é também aprovada pelo FDA para o tratamento da dependência a opióides, além de ter se mostrado eficaz (mas ainda sem ser aprovado) no tratamento de dependência a metanfetamina e cocaína (em associação à buprenorfina) e no tratamento de compulsão por jogos e obesidade (em associação com bupropiona) (30).

A despeito de suas múltiplas potenciais aplicações, o uso oral da naltrexona é limitado pela sua extensiva eliminação pré-sistêmica o que resulta em biodisponibilidade baixa que varia entre 5 e 40%, e necessidade de administração frequente (31, 32). De frente a este enunciado, sistemas de liberação que utilizem via de administração diferente da oral e ao mesmo tempo, apresentem a propriedade de prolongar a liberação deste fármaco, podem permitir contornar o efeito do metabolismo de primeira passagem além de reduzir a frequência de administração melhorando a adesão ao tratamento.

### 1.3 Liberação sustentada e sistemas de liberação líquido-cristalinos

Diversos sistemas de liberação têm sido investigados para a liberação modificada de naltrexona, incluindo micropartículas, géis, dispositivos transdérmicos, comprimidos bucais e implantes subcutâneos (33-37). De fato, o interesse por novas formulações que contornem as desvantagens apontadas está bem ilustrado em revisões recentemente publicadas (31, 38-40).

Dentre estes, micropartículas para administração intramuscular e implantes poliméricos subcutâneos estão em fase de estudo clínico (implantes) ou receberam aprovação (micropartículas) em alguns países para o tratamento de alcoolismo e/ou dependência associada a opióides. Apesar de seus benefícios, tanto as micropartículas quanto os implantes oferecem desvantagens significativas. Desvantagens associadas às micropartículas incluem o fato do processo de produção ser geralmente dispendioso, envolver múltiplos passos e equipamentos específicos. Além disso, sua administração intramuscular (via aprovada para o sistema) requer um profissional treinado. Já os implantes necessitam de procedimentos cirúrgicos para sua inserção e, com frequência, retirada (29, 41). Com base nesses problemas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas que permitam a liberação prolongada do fármaco por algumas semanas e uma administração mais fácil.

Para tal, propomos o uso de formulações precursoras fluidas, mais especificamente microemulsões que, mediante administração subcutânea e absorção de fluidos do tecido, sofram geleificação *in vivo* formando sistemas líquido-cristalinos nanoestruturados. Com isso propomos combinar a simplicidade da obtenção e estabilidade termodinâmica de microemulsões, a disponibilidade de tensoativos relativamente baratos para sua obtenção, e a habilidade de sistemas líquido-cristalinos de sustentar e modular a liberação de compostos. Conforme mostra a figura 3, a formulação precursora (microemulsão), após administração subcutânea deve absorver água do tecido subcutâneo (processo de geleificação), formando assim um sistema nanoestruturado com habilidade de sustentar a liberação do fármaco.



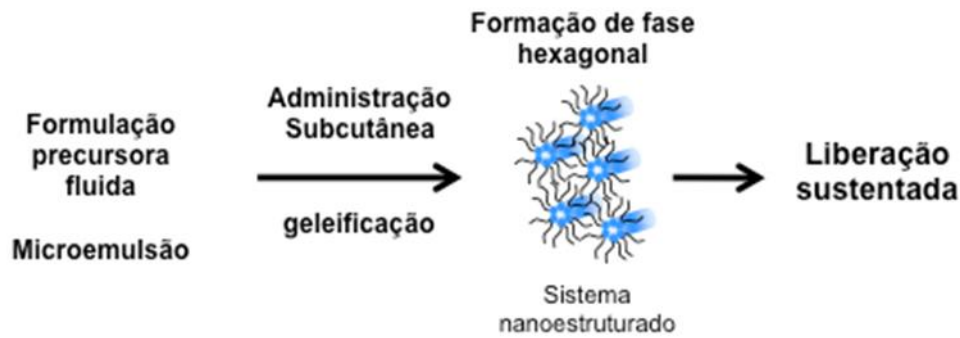


Figura 3- Esquema do sistema proposto e formação do gel *in situ*.

As microemulsões (ME) são agregados, muitas vezes esféricos, com diâmetro geralmente inferior a 150nm, tipicamente da ordem de 100 nm (42, 43). Apesar da denominação "micro", o sistema é formado por gotículas com tamanhos suficientemente pequenos (na faixa nanométrica) para ser opticamente transparente. Por essa razão, outras denominações, como "*submicron emulsion*" têm sido utilizadas para designar esse sistema. ME são, de forma geral, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, resultantes da mistura de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (42-44).

Os sistemas líquido-cristalinos são frequentemente encontrados em nossas vidas. Por exemplo, as membranas das células são resultado de uma fase líquido-cristalina liotrópica que é originada pela agregação de fosfolípides em água. Os cristais líquidos podem ser definidos como o estado da matéria cujas propriedades mecânicas e simétricas são intermediárias entre os sólidos cristalinos e os líquidos isotrópicos. Nos cristais, as moléculas estão altamente organizadas enquanto que nos líquidos, as moléculas difundem-se livremente (45). Sistemas líquido-cristalinos combinam a organização de moléculas dos cristais sólidos com o movimento das moléculas no estado líquido. Os sistemas líquido-cristalinos são de grande importância para administração de fármacos, pois podem incorporar compostos com solubilidades variadas, proteger os fármacos da degradação física e enzimática, diminuir o efeito de primeira passagem e controlar sua liberação (46-48).

São frequentemente classificados em sistemas termotrópicos ou liotrópicos. O primeiro é obtido por aumento de temperatura e o liotrópico, por sua vez é influenciado pela

proporção dos solventes. As fases mais comumente encontradas em sistemas liotrópicos são lamelar, hexagonal e cúbica (49), conforme ilustrado na figura 4.

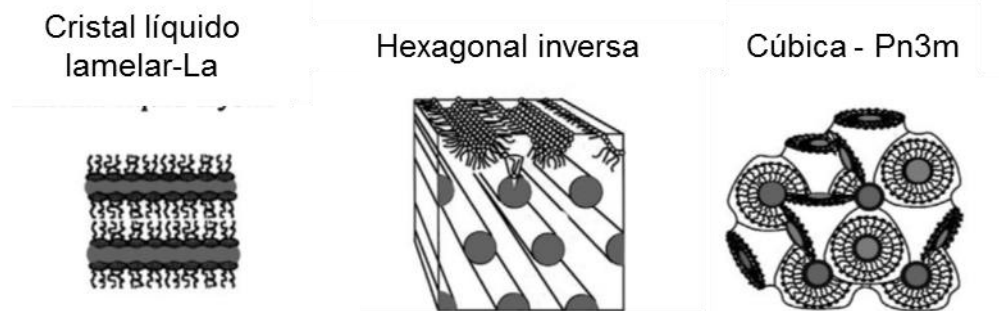


Figura 4- Representação esquemática de fases líquido-cristalinas. Adaptado de Spomenka Milak e Andreas Zimmer (49).

A fase lamelar consiste em estruturas lineares de bicamadas lipídicas alternadas entre canais de água e pode ser usada para obter a fase cúbica por sua habilidade de absorver excesso de água dos fluidos biológicos (49).

A fase líquido-cristalina cúbica exibe a mais complexa organização espacial conhecida das fases líquido-cristalinas. O nome “cúbica” originou-se a partir de resultados de difração de raios -X que mostraram simetria cúbica (49). A estrutura da fase cúbica consiste em bicamadas curvas, que se estendem em três dimensões, apresentam espessura estimada de 3,5 nm e separam duas redes de canais de água contínuos. Esses canais não se interceptam, e exibem diâmetro de aproximadamente 5 nm quando completamente intumescidos (50).

A fase hexagonal é caracterizada por longas estruturas cilíndricas bidimensionais, podendo existir na forma reversa, na qual as cabeças polares do composto formador de fase ficam na região interna dos cilindros e a porção apolar fica localizada ao redor dos cilindros; ou na normal, onde as cabeças polares do composto localizam-se na região externa dos cilindros (51, 52). Embora essas fases se apresentem macroscopicamente como géis, a viscosidade é bastante diferente nas fases cúbica, hexagonal e lamelar, o que pode influenciar a liberação do fármaco (49).

A fase hexagonal foi selecionada aqui em decorrência da sua estrutura nanométrica (diâmetro dos cilindros e espessura das bicamadas é da ordem de nanômetros) e versatilidade estrutural, caracterizada pela presença de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, apresentando a capacidade de prolongar a liberação dos compostos hidrofílicos com

característica físico-químicas semelhantes ao cloridrato de naltrexona (49, 53). Além disso, ela apresenta viscosidade intermediária entre a cúbica e lamelar. Sabe-se que a viscosidade é de grande importância para a liberação de compostos; em decorrência de sua elevada viscosidade, a fase cúbica poderia resultar em liberação mais lenta do fármaco (54, 55) .

A transição de uma fase menos viscosa como por exemplo uma microemulsão ou a fase lamelar em estrutura bicontínua cúbica ou fase hexagonal reversa pode ocorrer em decorrência de alterações na temperatura, concentração de solvente (como água) e/ou adição de outros compostos, como fármacos (48, 53). Aqui propusemos sistemas capazes de se transformar em fase hexagonal (reversa e normal, dependendo do composto formador) mediante absorção de água. Essa transição pode ser explicada pelo fator de empacotamento (K), que relaciona a forma da molécula do composto formador com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar. O fator de empacotamento representa a medida da geometria preferencialmente adotada pelo tensoativo quando da formação de agregados (56). Em outras palavras, é um parâmetro muito útil para prever a mesofase que é preferencialmente formada por um composto, e pode ser calculada pela **equação 1**:

$$K = V_h / A_o \cdot L_c \text{ (equação 1)}$$

**K**=fator de empacotamento

**V<sub>h</sub>**=volume da parte hidrofóbica do tensoativo

**A<sub>o</sub>**=área da secção transversal da cabeça polar do tensoativo

**L<sub>c</sub>**=comprimento da cauda hidrofóbica do tensoativo

De acordo com Engström *et.al*, 1992 tem-se geralmente  $k \sim 1$  para a fase lamelar,  $\sim 1,3$  para fase cúbica bicontínua e  $\sim 1,7$  fase hexagonal reversa. A transição entre fases em função do formato de compostos formadores de fase (principalmente a monoleína) e seu fator de empacotamento foi estudada e idealizada por diversos autores, conforme ilustrado na figura 5 (57):

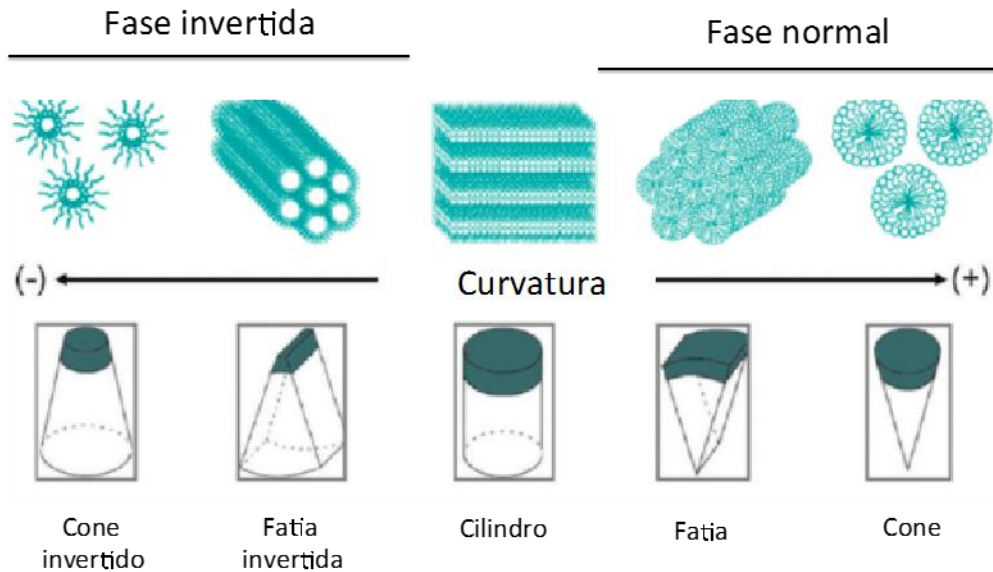


Figura 5- Idealização das fases formadas por tensoativos e outros lipídios formadores de fases em função do formato do tensoativo e seu fator de empacotamento. Adaptado de Kulkarni, Langmuir, 2011(57).

Para compostos que formam sistemas reversos como o monoglicerídeo monoleína, o aumento de água permite que os grupos das cabeças polares do monoglicerídeo se movam mais livremente em uma direção perpendicular relativa ao plano da camada de água. Estes movimentos promovem desordem da cadeia hidrofóbica do monoglicerídeo, aumentando assim  $V_h$ . Como a interação dos grupos da cabeça polar são fortes (em decorrência de ligações de hidrogênio), a sua seção transversal tende a ser constante, e o fator de empacotamento aumenta porque  $V_h$  aumenta, enquanto  $A_o$  e  $LC$  permanecem constantes, facilitando a transformação de fase lamelar para cúbica (47). Uma base racional semelhante pode ser utilizada para transformação da microemulsão A/O em fase hexagonal reversa, já que estas são sistemas mais semelhantes aos micelares reversos (alguns autores utilizam o termo “micela intumescida” para microemulsões), sendo que o aumento de volume da cadeia apolar do tensoativos pode levar a formação do sistema hexagonal.

A transição entre fases quando do uso de compostos que formem sistemas normais na presença de água (como tensoativos BRIJ e Vitamina E TPGS) é menos estudada. Para vitamina E TPGS, por exemplo, acredita-se que a sequência de fases formada à medida que o teor aquoso aumente seja: fase micelar reversa, fase hexagonal e fase micelar normal.(58)

Comparado a outros sistemas de liberação sustentada desenvolvidos para naltrexona, o uso de microemulsões e sua geleificação com formação *in vivo* da fase hexagonal ou lamelar oferece diversas vantagens: (28, 29, 39, 41, 59, 60)

- a viscosidade da formulação precursora pode ser ajustada com a fase oleosa a fim de facilitar sua administração subcutânea,
- microemulsões são de fácil preparação, o que reduz custos e complexidade relacionados ao desenvolvimento,
- a via subcutânea parece ser superior se comparada a outras vias no que diz respeito a potência da naltrexona em reduzir o consumo de etanol,
- a administração subcutânea é mais simples e não requer treinamento extensivo, de modo que familiares do paciente (se não o próprio) podem executar a administração (de maneira similar à insulina);
- ao contrário de implantes que devem permanecer no mesmo sítio, o local de administração do sistema proposto pode ser alternado a fim de reduzir possíveis reações locais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma microemulsão passível de administração subcutânea que mediante absorção de água *in situ*, suscitará em gel nanoestruturado capaz de sustentar a liberação de naltrexona.

### 2.2 Objetivos específicos

- A. Desenvolvimento e caracterização físico – química de formulações precursoras, estudo de sua geleificação e conversão em sistemas nanoestruturados *in vitro* e incorporação de naltrexona
- B. Avaliação da formação da fase líquido-cristalina *in vivo*; e de sua capacidade de sustentar a liberação de um marcador fluorescente;
- C. Avaliação da influência da formulação contendo naltrexona sobre o as propriedades reforçadoras positivas induzidas pelo etanol em modelo de preferência condicionada por lugar.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Fármaco e reagentes

ALEXA FLÚOR 647 carboxylic acid, adquirido da Invitrogen, Lote # 1301255;

BRIJ-97 (BRIJ) Polyoxyl 10 oleyl ether CAS:9004-98-2  $C_{38}H_{76}O_{11}$ , peso molecular 709 Lote: #MKBL6769V. Adquirido de *Sigma Life Science*;

ETANOL adquirido da empresa Synth, Lote #190119

CLORIDRATO DE NALTREXONA (NTX) CAS16676-29-2,  $C_{20}H_{23}NO_4$  HCl.peso molecular 377,86. LOTE#SLBF8548V. Adquirido de *Sigma Life Science*;

MONOCAPRILINA, Glyceryl Monocaprylate (**MC**) CAS 26402-26-6,adquirido de *ABITEC CORPORATION* Lote:11203-6

MONOLEÍNA (MO) adquirido Kerry Lote # 0905800057;

PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) PCODE 1001461214 P4417-50TAB Lote: #SLBD4322V, adquirido de *Sigma Life Science*;

PROPILENOGLICOL (PG) 1,2 Dihydroxypropane CAS (-) - 1,2 - Propanediol [4254-14-2] (+) 1,2 – Propanediol [4254 -15-3] ,  $C_3H_8O_2$ , peso molecular 76,09 Lote:169012, adquirido de *Synth*;

SPAN 80, Sorbitan monooleate (**SPAN**) CAS:1338-43-8  $C_{24}H_{44}O_6$ , peso molecular 429, Lote: #MKBF2220V. Adquirido de *Sigma Life Science*

VITAMINA E-TPGS (TPGS) 4-O-(2-Hydroxyethyl)-1-O-[2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydrochromen-6-yl] butanedioate CAS:9002-96-4  $C_{33}O_5H_{54}(CH_2CH_2O)_{20-22}$ , peso molecular aproximadamente 1513. Possui propriedades anfílicas – cabeça hidrofílica (polietilenoglicol 1000) e a porção lipofílica (d-  $\alpha$ -tocoferol). HBL= 13, adquirido da *ISOCHEM BATCH NUMBER:1101020048*.

TRICAPRILINA (TRI) Captex 300 EP/NF adquirido de ABITEC Corporation, Lote # 13061UT16.

### 3.2 Desenvolvimento das microemulsões

Base racional: é importante ressaltar novamente que as microemulsões foram desenvolvidas e avaliadas em busca de formulações capazes de transformarem-se em fase hexagonal mediante a absorção de água do tecido celular subcutâneo. Tanto a fase do tipo reversa como normal foram consideradas. No entanto, durante o desenvolvimento das formulações, nos deparamos também com microemulsões capazes de formar a fase lamelar. Como esta é menos viscosa, consideramos sua relevância para liberação de maiores quantidades de naltrexona, e por isso, optamos por comparar sistemas capazes de formar fase hexagonal do tipo reversa (contendo monoleína como composto formador), do tipo normal (contendo vitamina E TPGS como composto formador) e fase lamelar (contendo vitamina E TPGS-Span).

Microemulsões foram desenvolvidas usando o método da titulação. Como tensoativos/composto formador de fase foi utilizado vitamina E TPGS (TPGS), monoleína, BRIJ e SPAN, isoladamente ou em associação. Como fase oleosa foi utilizado monocaprilina, sendo esta substituída por tricaprilina quando da utilização de monoleína como lipídio estrutural (53, 61-65). A tricaprilina foi utilizada para permitir a formação de fase hexagonal em temperaturas biologicamente relevantes; em sua ausência, a monoleína forma fase hexagonal somente em temperaturas elevadas (47). O propilenoglicol foi utilizado como co-tensoativo dado sua capacidade de aumentar a incorporação de água em microemulsões e modular a viscosidade (61). Uma possível explicação para o aumento da quantidade de água incorporada resulta da capacidade do propilenoglicol de particionar-se no compartimento aquoso, reduzindo sua polaridade o que conseqüentemente, facilitando a emulsificação (66). Diferentes proporções entre tensoativos foram utilizadas conforme representação na tabela 1. Foi utilizado apenas água destilada como fase aquosa.



Tabela 1- Razões entre os componentes da mistura de tensoativos e fase oleosa utilizadas no desenvolvimento de microemulsões.

ESTUDO	TENSOATIVO: CO-TENSATIVO	PROPORÇÕES
I	TGPS	
II	BRIJ	
III	TPGS: SPAN	1:0,15 e 1:0,30
IV	TGPS: PG	8,6:1,4; 7,5:2,5 e 6,7:3,3
V	(MO: TRI 9:1): PG	64:36

Protocolo experimental: Para desenvolvimento das microemulsões, a fase oleosa e o (s) tensoativo (s), foram aquecidos até fusão em placa de aquecimento (ajustada para 60<sup>o</sup> C) após pesados em balança analítica (Ohaus Pioneer TM, Toledo). A fase oleosa e o sistema tensoativos/co-tensoativo foram misturados (m/m) nas seguintes proporções: 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0 m/m (67). As misturas foram então tituladas, utilizando-se de alíquotas de 5 µL de água destilada, sob moderada agitação. Através da inspeção visual, foi considerado microemulsão a formulação fluída, transparente e de uma única fase (67-70). O desenvolvimento do sistema contendo monoleína foi um pouco diferente: em decorrência da necessidade da tricaprilina para a formação da fase hexagonal, o lipídio foi misturado à tricaprilina em proporção fixa (9:1 m/m) e esse sistema foi então adicionado de propilenoglicol em proporções variando entre 9:1 e 1:9 (m/m).

Com base nos diagramas obtidos, 3 microemulsões foram selecionadas (tabela 2) em decorrência da possibilidade de obtenção de formulações fluídas e isotrópicas – caracterizadas como microemulsões, capazes de transformarem-se em fases líquido-cristalinas mediante a adição de água.

Tabela 2- Composição das microemulsões escolhidas para incorporação do fármaco

Formulação	Tensoativo: Co-tensoativo	Fase Oleosa	Água
ME-TPGS	TPGS:PG, 7.5:2.5, (68%)	Monocaprilina (17%)	15%
ME-Span	TPGS: Span, 1:0.15 (68%)	Monocaprilina (17%)	15%
ME-MO	MO (45%), PG (30%)	Tricaprilina (5%)	20%

### 3.2.1 Caracterização das formulações

Observações visuais e de microscopia de luz polarizada (DM RXP, Leica, DMR, Germany, equipado com software Light Analyze) foram utilizadas para identificar as microemulsões e discerni-las de fases líquido-cristalinas. Enquanto que as microemulsões são sistemas fluidos e isotrópicos, os sistemas líquido-cristalinos do tipo hexagonal foram identificados como sistemas semi-sólidos exibindo birrefringência sob luz polarizada (71, 72).

As formulações foram avaliadas macroscopicamente 24 horas e 5 dias pós-preparo, após repouso em temperatura ambiente, a fim de observar alteração na cor, transparência e homogeneidade (73).

A microemulsões selecionadas (ME-TPGS, ME-Span, ME-MO) e seus respectivos géis de fase hexagonal (obtidos mediante adição de 30% de água para as duas primeiras formulações e 40% de água para a microemulsão de monoleína) foram também avaliados com relação ao comportamento reológico e viscosidade. Para tal, as amostras foram submetidas a taxa de cisalhamento variando até 1000 1/s utilizando-se do reômetro do tipo cone-placa (Brookfield, USA) equipado com cone 50 ou 75. As análises foram realizadas em duplicata (42,49). As medidas de fluxo foram tratadas com a aplicação do modelo da Lei das Potências (indicada na Equação 2) a fim de determinar o índice de escoamento e confirmar o comportamento reológico:

$$\tau = K \gamma^n \text{ (equação 2)}$$

onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento,  $\gamma$  é a taxa de cisalhamento,  $K$  é um índice relacionado à consistência e  $n$  é o índice de escoamento (61). Neste modelo,  $n > 1$  representa um fluido dilatante,  $n < 1$  representa um fluido pseudoplástico e  $n = 1$  um fluido Newtoniano (61). Estes parâmetros foram calculados ajustando o modelo matemático da Equação (2) às curvas de ida dos reogramas utilizando software Origin pro versão 9.

O diâmetro das gotículas das microemulsões foi determinado pelo método de espalhamento dinâmico de luz "*light scattering*". Foi usado equipamento Zetasizer (Malvern, nano Z90) (74). No método, o movimento browniano das moléculas da dispersão é utilizado para o cálculo do raio hidrodinâmico (56, 75). As microemulsões ME-TPGS, ME-Span, ME-MO, foram analisadas sem diluição para que não houvesse transformação de fases, já que as microemulsões se transformaram em fases líquido-cristalinas mediante diluição

### 3.2.2 Intumescimento

Para acompanhar a taxa de absorção de água e determinação da cinética de intumescimento, as microemulsões foram pesadas em tubos do tipo eppendorf (200 mg) e 500 µL de água foi adicionado ao tubo. Este, por sua vez, foi colocado em banho, à temperatura de 37<sup>o</sup> C. Após intervalos de 2, 4, 6, 8 12 e 24 h, a água foi cuidadosamente removida e o gel formado foi pesado. A quantidade de água absorvida em função do tempo foi representada graficamente e as curvas foram analisadas utilizando equações de cinética de ordem zero, primeira ordem (equação 3) ou segunda ordem (equação 4):

$$\ln W_{\infty}/(W_{\infty} - W) = kt \text{ (equação 3)}$$

$$W = t/W = 1/k W_{\infty}^2 + t/ W_{\infty} \text{ (equação 4)}$$

Onde  $W_{\infty}$  é quantidade máxima de água absorvida pela formulação em um tempo  $t$ ,  $W_{\infty} - W$  é a quantidade de água não absorvida e  $k$  é a constante de proporcionalidade (76-80) .

Para determinarmos o tempo necessário para transformação da microemulsão em fase hexagonal, amostras da formulação foram coletadas entre 2 e 24 horas para visualização no microscópio de luz polarizada e acompanhamento da formação da fase hexagonal.

Como os tensoativos BRIJ e TPGS não formam géis resistentes a diluição, também avaliamos o tempo da persistência do gel, ou seja, por quanto tempo a fase hexagonal formada por esses tensoativos era observada em presença de excesso de água.

### 3.2.3 Incorporação de naltrexona

O fármaco foi incorporado nas formulações selecionadas (Tabela 2). A intenção foi incorporar a maior quantidade do fármaco possível sem que houvesse alteração na estrutura do sistema. O fármaco foi dissolvido diretamente na microemulsão a fim de obtermos concentração final variando entre 1 e 10% (m/m). Após 5 dias de repouso, as microemulsões foram inspecionadas visualmente e em microscópio de luz polarizada. Para avaliar a influência do fármaco sobre a formação da fase hexagonal, água foi adicionada (concentração final de 30-40%). Para a formulação ME-TPGS e para a formulação ME-MO

foi possível incorporar 5% de NTX (m/m), sendo essa concentração aumentada para 10% após 5 min de sonicação em banho.

Entretanto, para a formulação ME-Span, a adição de quantidades superiores a 1,3% do fármaco (m/m) resultou em sua precipitação no sistema, mesmo após sonicação em banho.

#### 3.2.4 Liberação *in vitro* do fármaco

Sabe-se que a composição, estrutura interna e viscosidade de sistemas podem influenciar a liberação de fármacos, o que, conseqüentemente influencia sua biodisponibilidade (53, 61). O tempo necessário para formação da fase hexagonal também pode influenciar a liberação, uma vez que a formulação precursora (microemulsão), por ser mais fluida, impõe menor restrição à difusão de compostos (81). Estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos para avaliarmos como a composição da formulação precursora afeta a taxa e mecanismo de liberação do fármaco.

A liberação da naltrexona foi avaliada *in vitro* utilizando a célula de difusão de Franz (área 1 cm<sup>2</sup>) (67). Formulações precursoras foram colocadas no compartimento doador da célula de difusão, separada da fase receptora (tampão fosfato 100mM, pH= 7,4 – preparado 24 horas anterior ao início do experimento) por uma membrana de celulose (*cut off* massa molecular = 1000). Esta membrana foi hidratada em água destilada por 24 horas anteriormente ao início do experimento. O compartimento doador foi preenchido com 3 mL da solução tampão, e a membrana foi clampeada entre os compartimentos de cada célula. O fluido receptor foi mantido sob agitação, utilizando barra magnética constante, a 250 rpm.

No tempo 0 h., 100 mg das microemulsões selecionadas ME-TPGS, ME-Span e ME-MO (tabela 2) contendo naltrexona foram colocadas no compartimento doador. Após 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 84 h, alíquotas de 200 uL da fase receptora foram removidas para quantificação da naltrexona através de espectrofotometria em 220nm.

A quantidade de fármaco liberada foi representada graficamente de diversas formas para avaliação da cinética de liberação (67, 82, 83). Foram gerados gráficos nos quais a quantidade de fármaco liberada foi plotada em função do tempo ou da raiz quadrada do tempo e o log da concentração remanescente foi plotada em função do tempo. A cinética da ordem zero é caracterizada pela relação linear entre a porcentagem liberada e o tempo; em cinética de pseudo primeira ordem (ou Higuchi), a porcentagem liberada é linear em

função a raiz quadrada do tempo, enquanto que em cinética de primeira ordem, o log da quantidade de fármaco remanescente na formulação é linear em função do tempo.

### **3.3 Avaliação da capacidade do gel de sustentar a liberação de um marcador fluorescente**

Este experimento teve como objetivo demonstrar que a fase hexagonal não apenas é formada *in vivo* a partir da formulação precursora, mas também é capaz de sustentar a liberação de compostos. Foi avaliado em tempo real e no mesmo animal se a formulação tinha capacidade de reter o marcador fluorescente Alexa Flúor 647 por longos períodos de tempo (1 semana ou mais) ou se o marcador era removido rapidamente do local do depósito e distribuído. Para este experimento foram utilizadas as formulações ME-TPGS e ME-MO devido à capacidade de incorporar maiores quantidades de fármacos e promoverem liberação mais lenta de naltrexona. Como controle foi utilizada solução do marcador em propilenoglicol na mesma concentração da microemulsão.

Camundongos Black C57 machos fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia– Unidade II (biotério de camundongos) foram utilizados nesse experimento (protocolo 103/ 2015 adendo ao certificado 072/ 2014/CEUA, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo). Os animais tinham idade de 60 dias e peso variando entre 25 e 28 g. Estes animais foram mantidos em gaiola de polietileno branco (28,5 cm X 17,5 cm X 12,0 cm) com cinco camundongos por caixa, com água e ração *ad libitum*. A temperatura da sala foi controlada em 24° C  $\pm$  2° C. Os experimentos foram conduzidos entre 7 horas e 30 minutos e 15 horas. O manuseio dos animais seguiu as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.

Estes animais foram depilados, em dorso, utilizando-se de Veet™, sob anestesia inalatória com isoflurano 1,5 L/min. Foi usado cerca de 5 g deste cosmético no dorso dos animais, massageando com a ponta dos dedos, por cerca de 50 segundos. Com uma gaze úmida foi realizada massagem nos pelos até depilação. Após este procedimento, os camundongos foram devidamente lavados com água aquecida a 37° C, e colocados em estufa climatizada a 29° C até recuperação completa da anestesia inalatória.

Após 24 horas, as formulações precursoras ME-TPGS e ME-MO contendo 0,05% do Alexa Flúor 647 foram administradas subcutaneamente na região dorsal dos camundongos. Foi utilizado um sistema de geração de imagens *in vivo* (IVIS Spectrum, disponível no

centro de Facilidades para Pesquisa do ICB-USP) a fim de visualizar o destino do Alexa Flúor 647.

A retenção do marcador no local de injeção bem como sua distribuição sistêmica foram monitoradas 2, 5, 11, 19 e 34 dias, após a administração. A intensidade da fluorescência no animal foi quantificada utilizando-se o filtro de emissão/excitação entre 650-700 nm.

### **3.4 Avaliação da influência da formulação sobre a Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida pelo etanol**

#### *3.4.1 Animais*

Para o experimento de condicionamento foram utilizados camundongos C57/Bl6 machos, com 60 dias de idade, peso variando de 25-28g fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia– Unidade II (biotério de camundongos) da Universidade de São Paulo. Uma semana antes do experimento, eles foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento do Departamento de Farmacologia. Os animais foram mantidos em condições padrão com temperatura e umidade controlados ( $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C e umidade de 55%), sendo as trocas de caixa moradia realizadas em cada 3 dias, e o ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro (ciclo claro das 7h00 às 19h00).

#### *3.4.2 Aparato utilizado para PCL*

O ensaio foi realizado no equipamento da empresa *Insight™* (EP156 C), que consiste em um aparato de aspecto retangular de três compartimentos ( 4,6 x12,7 x 12,7 cm), contendo um lado com parede pretas com listras brancas verticais e piso em barras, parte central paredes de cor cinza e piso liso de alumínio, e um terceiro compartimento com paredes brancas e listras horizontais pretas e piso em grade de xadrez; cada compartimento é separado por uma guilhotina, conforme mostrado na foto da figura 6 (84).



Figura 6- Aparato manual de preferência condicionada por lugar da empresa *Insight*™ EP 156C visão superior.

### 3.4.3. *Preferência Condicionada por Lugar – O teste*

O ensaio teve duração de dez dias, sendo realizado no período do início da tarde (13h00) e dividido em três fases, com todo o procedimento registrado em vídeo:

-Habituação (primeiro dia) é dado a chance de o animal explorar o aparato, por 15 minutos, onde a partir do momento que o animal estivesse com as quatro patas dentro do compartimento, o tempo foi cronometrado e a soma de cada episódio fez a soma total do tempo da habituação.

-Condicionamento (segundo ao nono dia): nos oito dias consecutivos o animal só teve acesso a um compartimento do aparelho. Os animais receberam injeção de etanol (2,0 g/kg) – via intraperitoneal ou salina em dias alternados e foram pareados nos respectivos compartimentos por 5 minutos. Dentro de cada grupo experimental, metade dos animais recebeu o etanol no compartimento com paredes pretas e listras brancas verticais e piso em barras, e conseqüentemente, a outra metade no compartimento de paredes brancas com listras pretas horizontais e piso em grade de xadrez. A salina foi injetada no compartimento oposto ao do etanol, em dias alternados. Após o pareamento, os animais foram devolvidos à caixa moradia.

-Teste (décimo dia) os camundongos foram alocados, um por cada vez no compartimento neutro da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos, como na fase de habituação. O tempo que os animais permaneceram em cada compartimento foi registrado, durante 15 minutos.

#### 3.4.4 Desenho experimental do protocolo de PCL

Os animais utilizados para o protocolo de estudo foram distribuídos em quatro grupos experimentais, com idade de 60 dias. Durante a fase de condicionamento, os animais dos Grupos 1 e 2 receberam injeções diárias de salina e naltrexona, respectivamente, 30 minutos antes da injeção de etanol. Após a habituação, os animais dos grupos 3 e 4 foram injetados com a microemulsão selecionada ME-TPGS 5% e 10%, respectivamente (tabela 2), subcutaneamente na linha média do dorso do animal imediatamente abaixo da cabeça,

- **Grupo 1: (CT-SF)** aplicação de salina (1 mg/kg -diariamente) sc, n = 7 animais;
- **Grupo 2: (CT-NTX)** aplicação de solução naltrexona (1 mg/kg) sc, diariamente, n = 6 animais ;
- **Grupo 3: (ME-MO 5%)** 100 mg microemulsão contendo 5% de naltrexona, n = 7 animais ;
- **Grupo 4: (ME-MO 10%)**100 mg de microemulsão contendo 10% de naltrexona, n= 6 animais

#### 3.4.5 Análise estatística

O intervalo de tempo gasto no compartimento central foi desconsiderada, a análise foi feita por delta do compartimento pareado com o etanol e no dia do teste. Os resultados de preferência por lugar foram analisados com o teste paramétrico de análise de variância de uma via (ANOVA) e *post hoc* (Tukey) para identificar diferença estatística entre os grupos. A análise estatística da avaliação do estudo da preferência condicionada por lugar foi feita pelo delta de tempo de cada animal do dia do teste no compartimento pareado de etanol com o da habituação. O programa estatístico utilizado foi o Origin 9.0 bit 32.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Desenvolvimento das microemulsões

Diagramas de fase que demonstram a relação entre os tipos de fase formadas e composição dos sistemas foram obtidos e estão apresentados na figura 7-9. As formulações fluidas, transparentes e sem separação de fases foram classificadas como microemulsões e estão demonstradas na região sombreada em preto nos diagramas das figuras 7-9. As regiões sombreadas em cinza denotam géis caracterizados por microscopia de luz polarizada como fase hexagonal. As demais áreas representam sistemas fluidos e turbos ou bifásicos.

Como pode ser observado na Figura 7, o uso de TPGS e BRIJ como tensoativo estrutural permite a formação de microemulsões com áreas extremamente semelhantes e pequenas (aproximadamente 26% da área total do diagrama). Microemulsões capazes de se transformarem em fase hexagonal foram obtidas quando do uso de tensoativo e fase oleosa em proporções variando entre 1:0 e 6:4 (m/m) e teor de água abaixo de 70%. A área da formação do gel foi um pouco maior quando do uso de TPGS (20% comparado a 16% para o diagrama contendo BRIJ), e por isso optou-se pelo uso de TPGS como tensoativo estrutural.

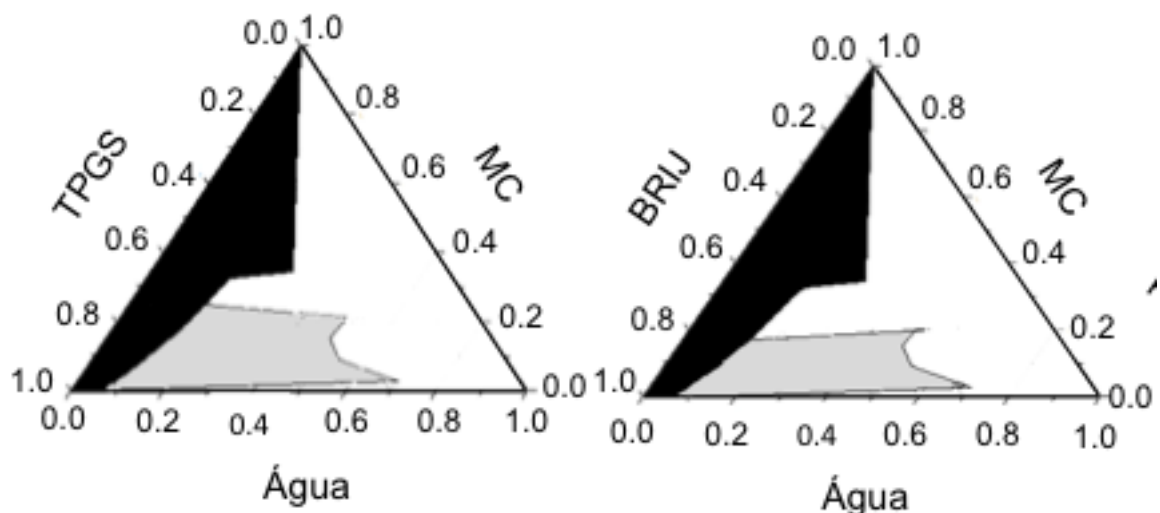


Figura 7- Diagramas de fase ternários mostrando a relação entre o tipo de tensoativo utilizado e os sistemas formados. A região sombreada em preto denota microemulsões, e região em cinza denota géis classificados como fase hexagonal.

Em seguida, adicionou-se propilenoglicol como co-tensoativo a fim de aumentar a área de formação das microemulsões, permitindo a incorporação de maiores quantidades de água nas microemulsões. Isso é importante para reduzir a viscosidade dos sistemas formados (facilitando a administração) e permitir incorporação de mais fármaco, já que o cloridrato de naltrexona é hidrofílico. Como pode ser observado na Figura 8, o aumento na concentração de propilenoglicol promoveu aumento na área de formação da microemulsão, mas também uma redução na área do gel observada quando a proporção de TPGS:PG foi 67:33 (m/m). Assim, optamos por utilizar a proporção de 75:25 a fim de reduzir a viscosidade sem comprometer a formação do gel.

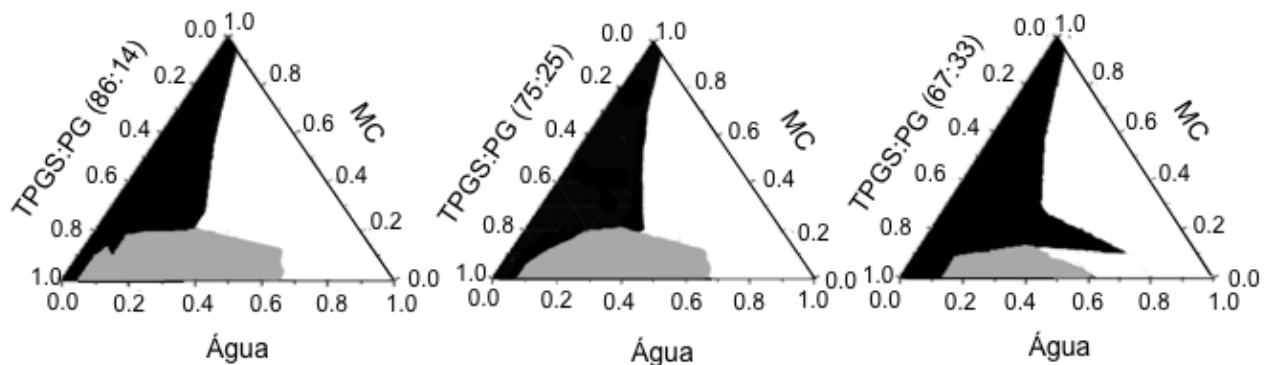


Figura 8- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a proporção TPGS:PG utilizada na mistura tensoativo-co-tensoativo e sistemas formados. A região sombreada em preto denota microemulsões, e região em cinza denota géis classificados como fase hexagonal.

Avaliamos também a utilização do Span 80 como co-tensoativo. A utilização da maior quantidade de Span na mistura tensoativo-co-tensoativo resultou em maior área de microemulsão sem comprometer a formação do gel (Figura 9). No entanto, é necessário ressaltar que o uso do Span induz formação de fase lamelar e não hexagonal. Optamos por utilizar a menor concentração de Span uma vez que a quantidade máxima de água incorporada em microemulsões que originavam fase lamelar não sofreu aumento com a concentração deste co-tensoativo. Para comparar a liberação do gel de fase lamelar e hexagonal, uma microemulsão contendo Span foi também selecionada.

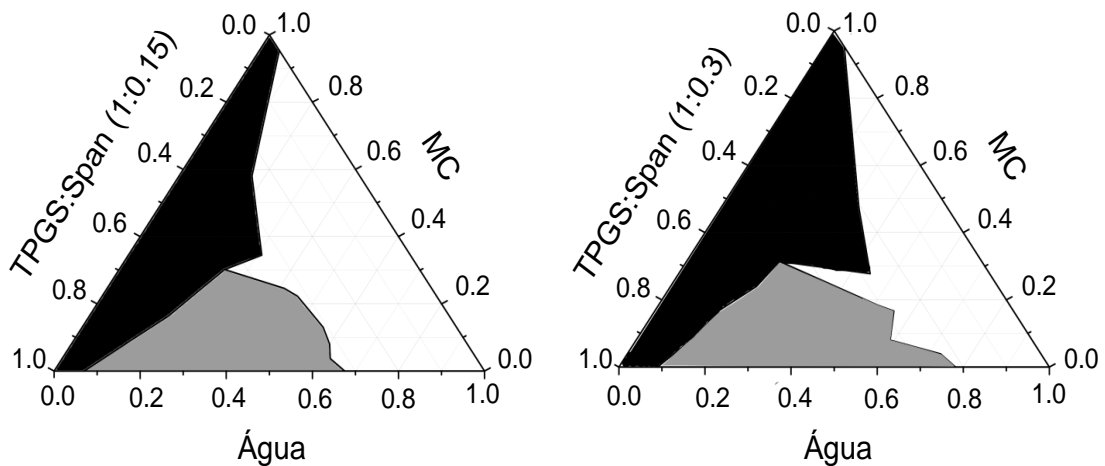


Figura 9- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a proporção TPGS: Span utilizada na mistura tensoativo-co-tensoativo e sistemas formados a região sombreada em preto denota microemulsões, e região em cinza denota géis classificados como fase lamelar.

A fase lamelar formada pela adição de Span pode ser justificada, pois este apresenta balanço hidro lipídico (HLB) 4,3. De acordo com o proposto por William Griffin em 1954, tensoativos com HLB na faixa de 3-6 são hidrofóbicos, logo alteram o parâmetro de empacotamento do TPGS por afetar o volume de cadeia apolar, o que no caso de compostos que formam fase normal, contribui para a transição de fase hexagonal normal em sistemas lamelares (85).

Quanto às formulações contendo monoleína como tensoativo principal, utilizamos tricaprilina como fase oleosa a fim de garantir a formação da fase hexagonal à temperatura biologicamente relevante. O diagrama de fases foi organizado de maneira diferente das demais formulações devido a necessidade de fixarmos a proporção entre monoleína e tricaprilina em 9:1 ou 8:2 (m/m), uma vez que estudos anteriores do grupo mostraram que nessas proporções houve formação de fase hexagonal mediante adição de água acima de 15% (9:1) ou 20% (8:2). Optamos por utilizar aquela com maior quantidade de lipídio estrutural ou seja 9:1, a fim de garantir a formação de fase hexagonal com menores quantidades de água o que resultaria em formação mais rápida do sistema.

Fixando-se a proporção entre monoleína e tricaprilina em 9:1 foi adicionado o propilenoglicol como co-tensoativo e modulador de viscosidade, em diferentes concentrações. O objetivo do propilenoglicol é servir como co-tensoativo na formação da microemulsão, permitindo incorporação de mais água, e tornar a formulação fluida o suficiente para ser injetada subcutaneamente sem impedir a formação da fase hexagonal.

Como pode ser observado na Figura 10, maiores quantidades de água foram necessárias para formação da fase hexagonal (representada por triângulos ou círculos) à

medida que a proporção de propilenoglicol foi aumentada. O uso de proporções MO-TRI:PG menores que 4:6 (m/m) aboliu a formação da fase hexagonal. Diante desses resultados, foi selecionada a microemulsão contendo 50% de MO-TRI, 20% de água e 30% de propilenoglicol por possuir quantidade de água mais similar aos outros sistemas, enquanto mostrando-se fluida para administração.

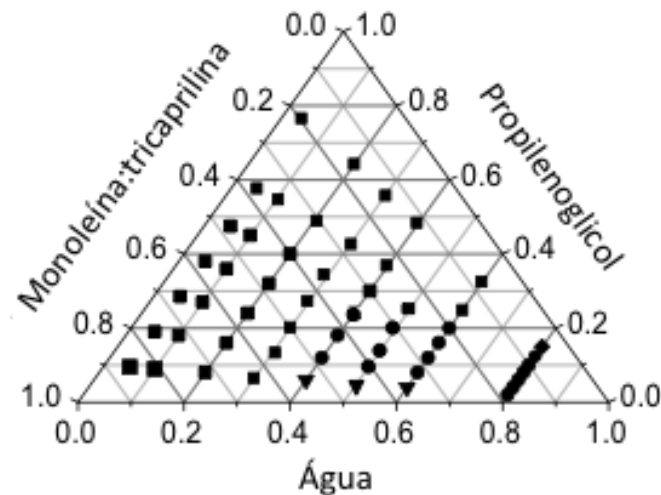


Figura 10- Diagrama de fase pseudoternários mostrando a relação entre a composição de formulações e tipo de sistema formado. Quadrados: sistema isotrópico caracterizado como microemulsão, triângulo invertido: fase hexagonal, círculo: fase hexagonal contendo excesso de água, losango: separação de fases.

#### 4.1.1 Avaliação da isotropia

Na figura a seguir estão apresentadas as diversas formulações quando observadas sob o microscópio de luz polarizada. Esta microscopia é utilizada para diferenciar fases líquido-cristalinas anisotrópicas (como as fases hexagonal e lamelar) de microemulsões e outros sistemas isotrópicos (53, 61). Sob um plano de luz polarizada a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz, logo isotrópica caso isso não ocorra e ao serem avaliadas em microscópio de luz polarizada, apresentaram-se como um campo escuro, sem textura característica (48). Por outro lado, as fases lamelares e hexagonais apresentam texturas características.

Como pode ser observado na figura 11, microemulsões observadas sob luz polarizada apresentam-se como um campo escuro, sem nenhuma textura característica.



Figura 11- Imagem obtida por Microscopia de luz polarizada da microemulsão ME-TPGS. Imagens semelhantes foram obtidas com as outras microemulsões. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Apresentam-se como estruturas estriadas, assemelhando-se a leques, conforme podemos observar na figura 12 (A e C). O arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas "cruzes-de-malta", conforme pode ser observado na figura 12-B (86).

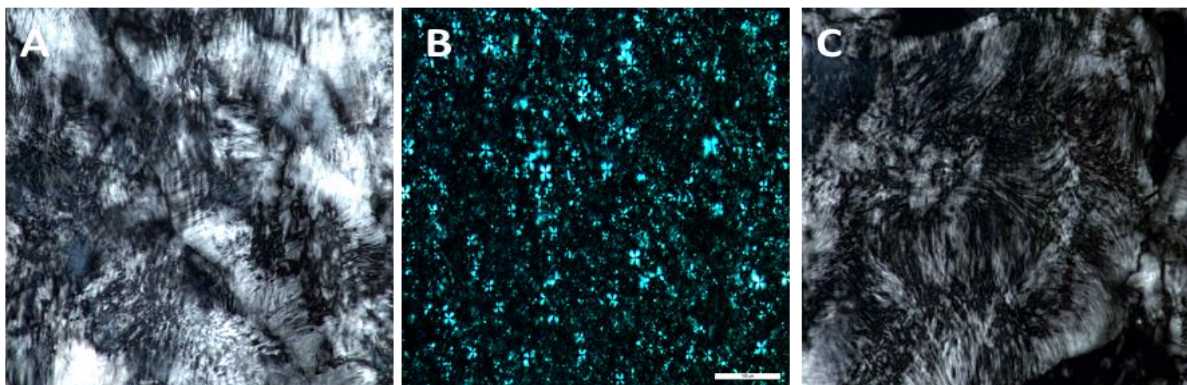


Figura 12- Imagem obtida por Microscopia de luz polarizada do cristal líquido. (A) TPGS: PG (7,5:2,5, m/m), contendo 25% de água. (B) TPGS: Span (1:0,15 m/m) contendo 20% de água. (C) ME-MO contendo 40% de água. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

#### *4.1.2 Avaliação do comportamento reológico e viscosidade*

As formulações selecionadas foram caracterizadas com relação à viscosidade. Nos gráficos da Figura 13 é possível observar a relação entre a viscosidade e taxa de cisalhamento, utilizadas para estudar o comportamento reológico dos sistemas. As microemulsões ME-TPGS, ME-Span e ME-MO (Figura 13 A, Figura 13C e Figura 13 E) apresentam comportamento Newtoniano, no qual a taxa de deformação é diretamente proporcional à tensão do cisalhamento. De acordo com lei de Newton da viscosidade, a relação entre tensão de cisalhamento (força de cisalhamento x área) e o gradiente local de velocidade é definido de uma relação linear, sendo a constante de proporcionalidade a viscosidade do fluido. Esse tipo de fluido apresenta viscosidade constante à mesma temperatura. Esse tipo de comportamento é interessante considerando que a microemulsão será administrada subcutaneamente, de modo que seu cisalhamento durante a injeção não resultará em alteração da viscosidade.

Os géis de fase hexagonal obtidos mediante adição de água na concentração final de 30% (para o sistema formado por TPGS) ou 40% (para o sistema formado por monoleína) apresentaram comportamento reológico compatível com sistemas pseudoplásticos. Tal comportamento é caracterizado pela relação não linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, e redução da viscosidade com aumentos da taxa de deformação (Figura 13 B, Figura 13 D e Figura 13 F).

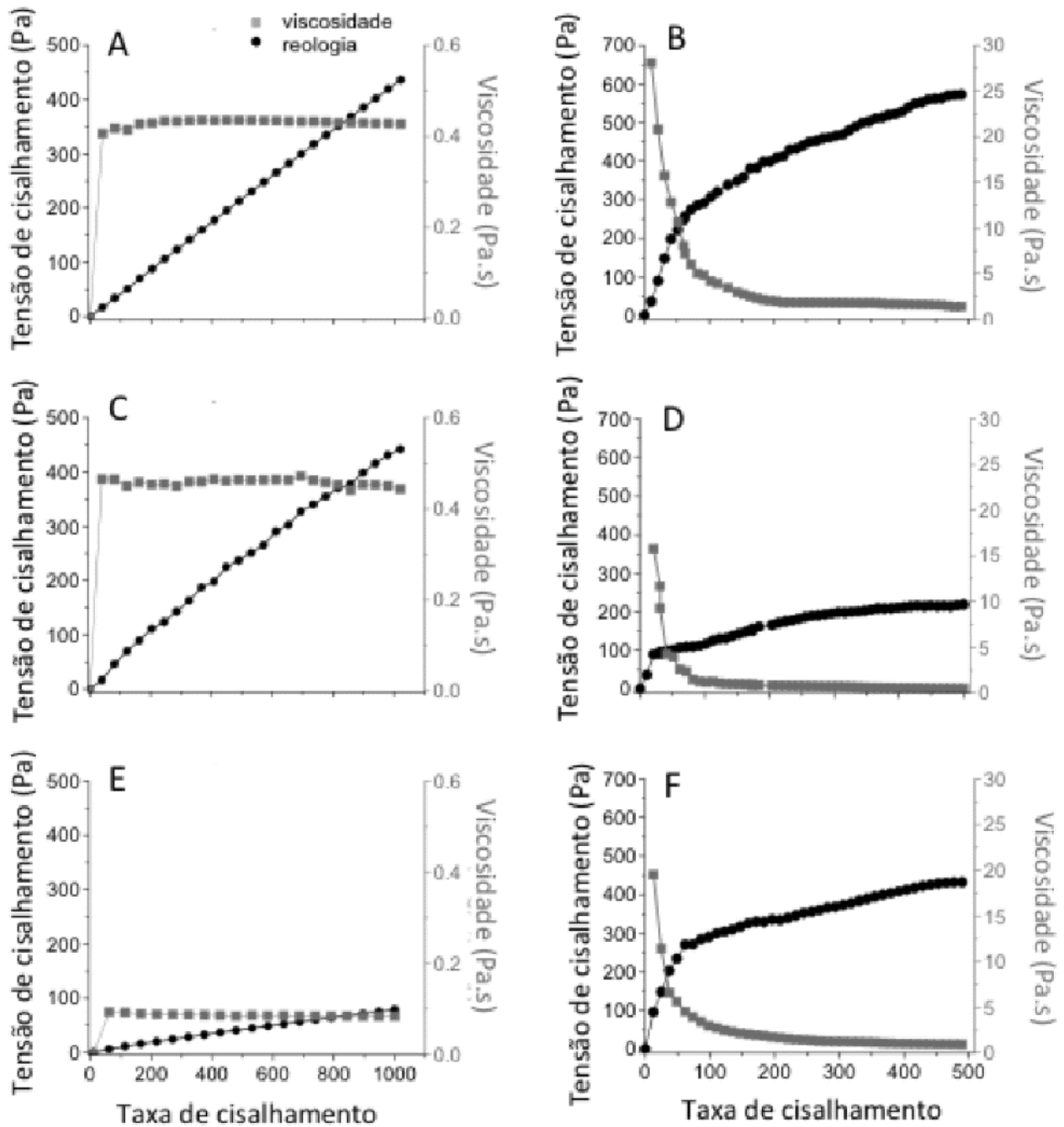


Figura 13- Comportamento reológico e viscosidade das microemulsões (painéis à esquerda) e géis (painéis à direita) selecionados: ME-TPGS (A), gel formado à partir de ME-TPGS (B), ME-Span (C), gel formado à partir de ME-Span (D), ME-MO (E), gel formado à partir de ME-MO (F). O géis foram obtidos mediante adição de 30% de água às microemulsões e 40% no caso de ME-MO.

#### 4.1.3 Tamanho das gotículas por espalhamento dinâmico de luz

As microemulsões foram avaliadas quanto ao seu tamanho e os resultados estão ilustrados na Figura 14 e Tabela 3. Quando essas gotículas são iluminadas por um feixe de luz de *laser*, ocorre o espalhamento deste, que sendo detectado em um ângulo determinado varia em uma taxa dependente da velocidade de difusão da partícula a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho, fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas e permitindo o cálculo do tamanho destas através das relações empíricas adequadas. Todas as microemulsões apresentaram diâmetro inferior a 150 nm, o que está de acordo com a literatura que caracteriza as microemulsões (87-89).

O índice de polidispersidade (Pdl) é utilizado como parâmetro que revela a qualidade da dispersão, variando de 0,1 a 1; quanto mais próximo de um, mais heterogênea e polidispersa é a distribuição das partículas, ora que valores até 0,25 geralmente indicam uma distribuição homogênea dos glóbulos (87, 88).

Tabela 3- Tamanho e Pdl das microemulsões selecionadas.

Microemulsão	Tamanho (d.nm)		Pdl
	Pico 1	Pico 2	
<b>ME-TGPS</b>	32,16	6,007	0,305
<b>ME-SPAN</b>	146,90	0,000	0,147
<b>ME-MO</b>	30,29	5,718	0,297



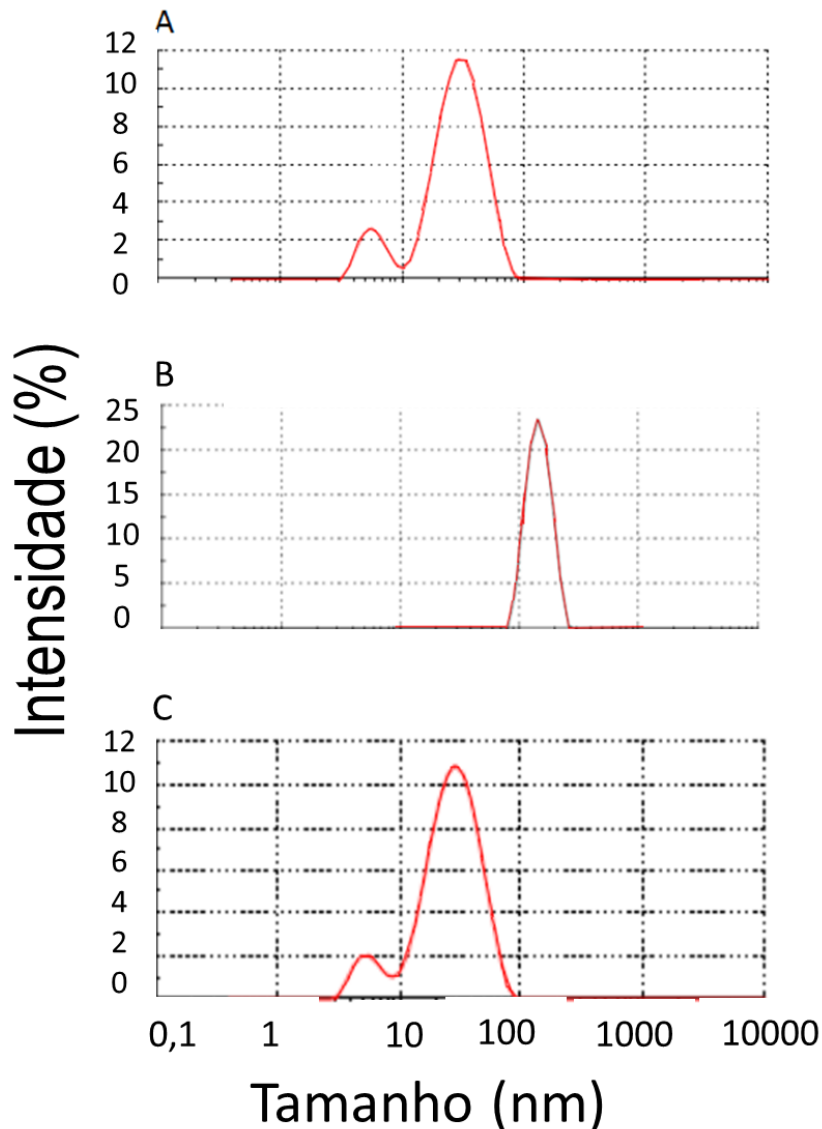


Figura 14- Gráficos representativos da distribuição de tamanho de partículas das formulações selecionadas. (A) ME-TPGS. (B) ME-Span e (C) ME-MO.

Observando estes dados, o tamanho das partículas e o Pdl encontram-se em conformidade com dados da literatura. Para a microemulsão de TPGS, nota-se o maior Pdl já para a ME-Span o menor. O maior Pdl de ME-TPGS e ME-MO reflete a presença de duas populações: como podemos ver nos gráficos de distribuição de tamanho da figura 14, há pequenos picos de diâmetro inferior a 10 nm. Esses pequenos têm intensidade bem menor comparado ao picos principais, mas sua presença sugere que ME-TPGS e ME-MO são mais heterogêneas que ME-span.

#### 4.1.4 Incorporação de Fármaco

Tendo em vista as três formulações escolhidas, os fármacos foram incorporados. A quantidade máxima de naltrexona incorporado nas microemulsões ME-TPGS e ME-MO foi 5% (m/m), sendo essa concentração elevada para 10% mediante sonicação em banho por 5 minutos. Entretanto, não foi possível incorporar concentrações acima de 1,3% na microemulsão ME-Span, devido também à formação de precipitados. Como pode ser observado na Figura 15, a adição do fármaco não impediu a formação da fase hexagonal e lamelar.

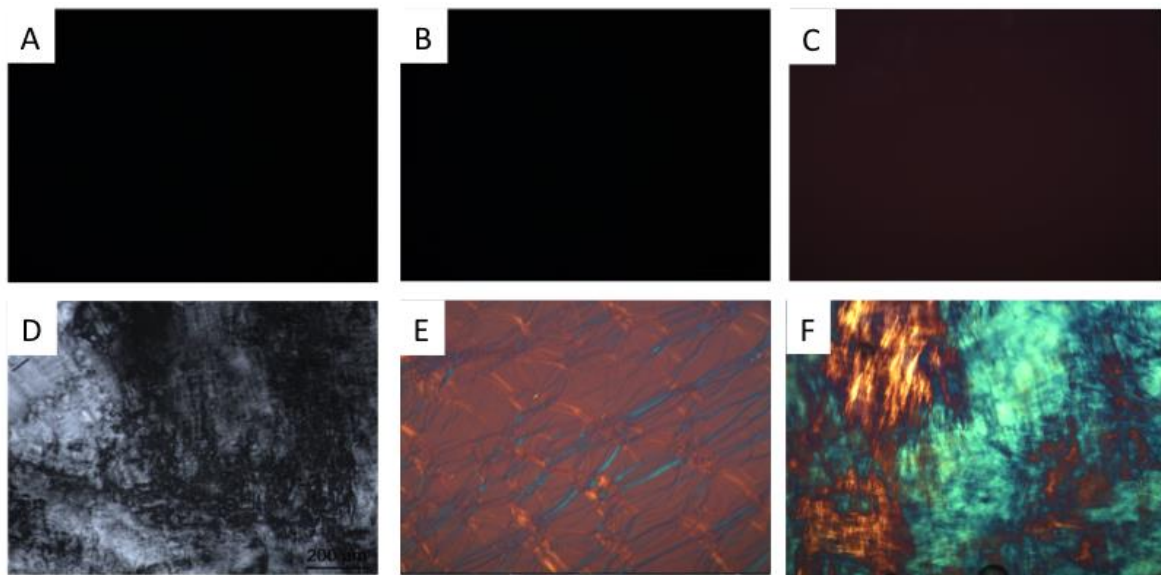


Figura 15- Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada (A) 5% de naltrexona na microemulsão ME-TPGS; (B) 1,3% de naltrexona na ME-Span; (C) 5% naltrexona em ME-MO; (D) ME-TPGS com 5% de naltrexona adicionado de 40% de água; (E) ME-Span com naltrexona a 1,3% acrescido de 30% de água; (F) ME-MO com naltrexona a 5% contendo 40% de água.

#### 4.1.5 Avaliação do intumescimento

A taxa de intumescimento afeta o tempo de formação da fase líquido-cristalina e conseqüentemente, a liberação. Aqui determinamos o tempo necessário para formação da fase hexagonal e da fase lamelar e a taxa de absorção de água. Para acompanhar a taxa de absorção de água e determinação da cinética de intumescimento, os géis formados foram pesados em intervalos regulares entre 2 e 24 horas. Paralelamente, foi determinado

o tempo necessário para transformação da microemulsão no gel de fase líquido-cristalina; para isso, amostras da formulação foram coletadas entre 2 e 24 horas para visualização ao microscópio de luz polarizada e acompanhamento da formação do gel.

Como pode ser observado na Figura 16, a formulação ME-MO é capaz de absorver mais água. A quantidade máxima absorvida, com a qual há formação de platô (16%, sendo a quantidade inicial de água 20%) é coerente com o diagrama de fases representado na Figura 10, que mostra a formação de fase hexagonal (com excesso de água) com uma concentração final de água de 40%.

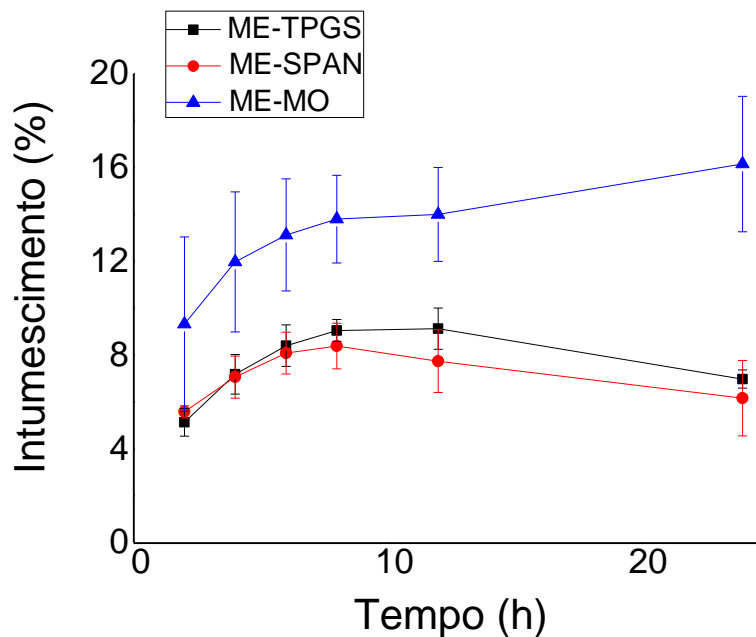


Figura 16- Perfis de intumescimento de sistemas líquido-cristalinos das microemulsões selecionadas em meio a imersão de água e temperatura de 37°C.

As formulações ME-TPGS e ME-Span foram capazes de absorver menores quantidades de água, o que também é coerente com os digramas de fases que mostram a formação de sistemas líquido-cristalinos com 20-25% de água (sendo o teor inicial 15%). Também pode ser observada uma leve redução do intumescimento de ME-TPGS e ME-Span após 10 horas. Uma possível explicação para o fenômeno se relaciona ao fato do tensoativo estrutural não formar sistemas resistentes à diluição. Dessa forma, um pouco do tensoativo pode se dissolver na água e conseqüentemente, ser eliminado juntamente com o excesso de água no processo de pesagem.

Os dados obtidos no estudo do intumescimento foram avaliados segundo Schott (1992), utilizando modelos de primeira ordem e segunda ordem, e os coeficientes das regressões lineares estão representados na Tabela 4. A análise desses coeficientes de correlação sugere que o intumescimento das matrizes segue cinética de Segunda Ordem.

Tabela 4- Coeficiente de correlação linear obtido utilizando diversos modelos para linearização do intumescimento dos sistemas.

<b>Formulação</b>	<b>Ordem zero</b>	<b>Primeira Ordem</b>	<b>Segunda Ordem</b>
ME-MO	0,510	0,868	<u>0,998</u>
ME-TPGS	0,701	0,705	<u>0,994</u>
ME-Span	0,135	0,107	<u>0,981</u>

Dependendo do fator de empacotamento do lipídio, diferentes estruturas líquido-cristalinas podem ser formadas. A formação das diferentes estruturas também é influenciada por fatores como pH, força iônica, temperatura, pressão e a presença de aditivos ou fármacos que podem ocasionar diferentes transições de fases (51). Por isso, foi importante determinar que durante o intumescimento formava-se realmente a fase líquido-cristalina de interesse. É possível observar na figura 17 que as fases lamelar e hexagonal foram formadas após 4 horas (formulações com TPGS) ou 8 horas (formulações com monoleína) de contato com excesso de água.

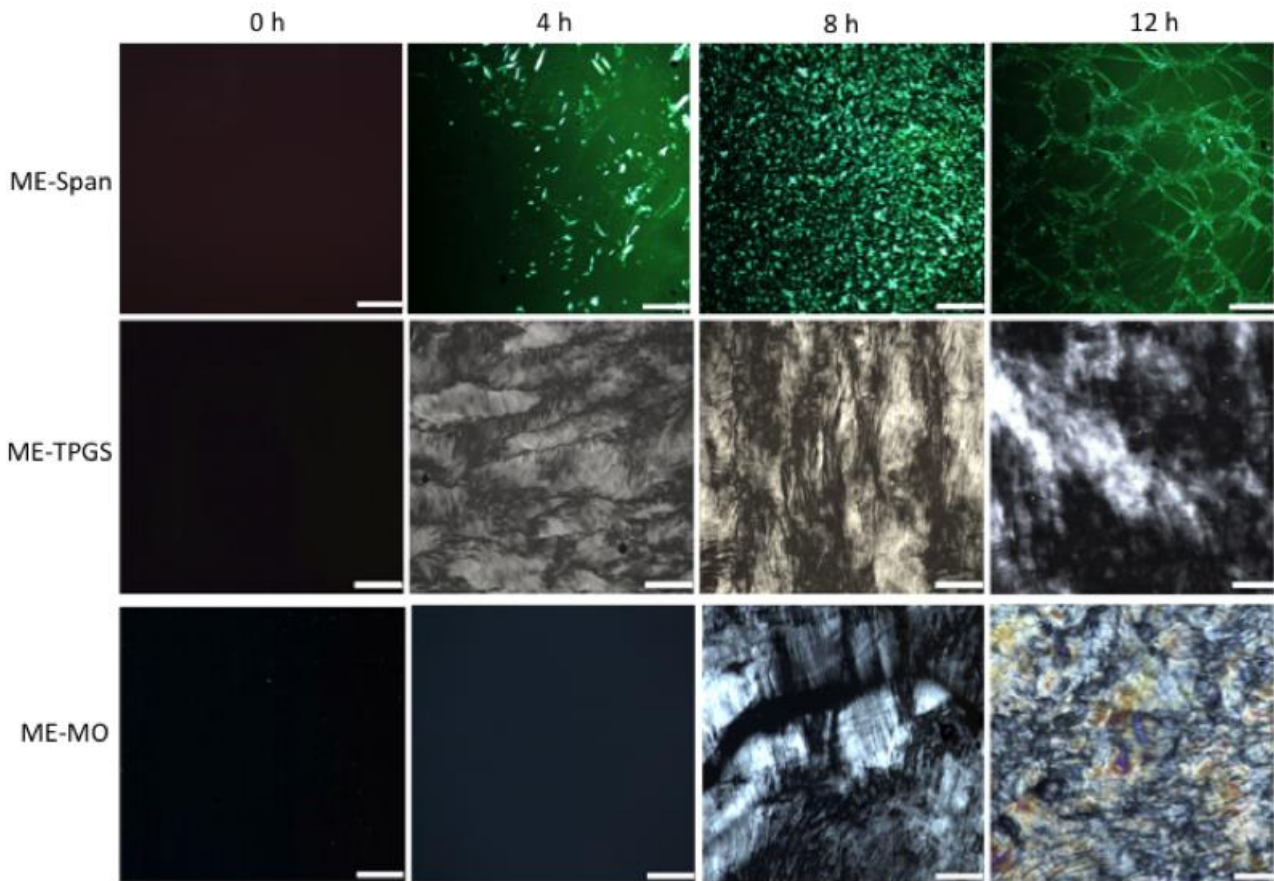


Figura 17-Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada demonstrando a relação entre tempo e formação de fases líquido-cristalinas. No painel superior é possível observar que a microemulsão ME-Span em contato com excesso de água, forma fase lamelar. As outras microemulsões, quando em contato com o excesso de água, originaram fase líquido cristalina hexagonal.

#### 4.1.6 Teste de liberação *in vitro*

A liberação da naltrexona a partir das microemulsões selecionadas em função do tempo está representada na figura 18. Quando foi utilizada a solução do fármaco em propilenoglicol (5%, m/m), conseguimos observar que em 24 horas quase 90% foi encontrado na fase receptora, indicando que a membrana utilizada não restringe a passagem do fármaco.

Quando o fármaco foi incorporado em ME-Span, houve um pequeno retardo na liberação, sendo mais de 60% do fármaco liberado em 96 horas. Por outro lado, ME-MO e ME-TPGS promoveram reduções mais pronunciadas na liberação, demonstrando seu potencial para prolongá-la. Mais especificamente, a liberação de naltrexona a partir de ME-

MO foi de aproximadamente 31% em 96 horas, enquanto que apenas 15% do fármaco foi liberado quando utilizada a formulação ME-TPGS. Vale ressaltar que a quantidade de fármaco incorporado em ME-Span é menor, de forma que muito embora a porcentagem de liberação seja maior, a quantidade absoluta não é (ver Discussão). A quantidade liberada mostrou independente da concentração de fármaco adicionada no sistema (Figure 19).

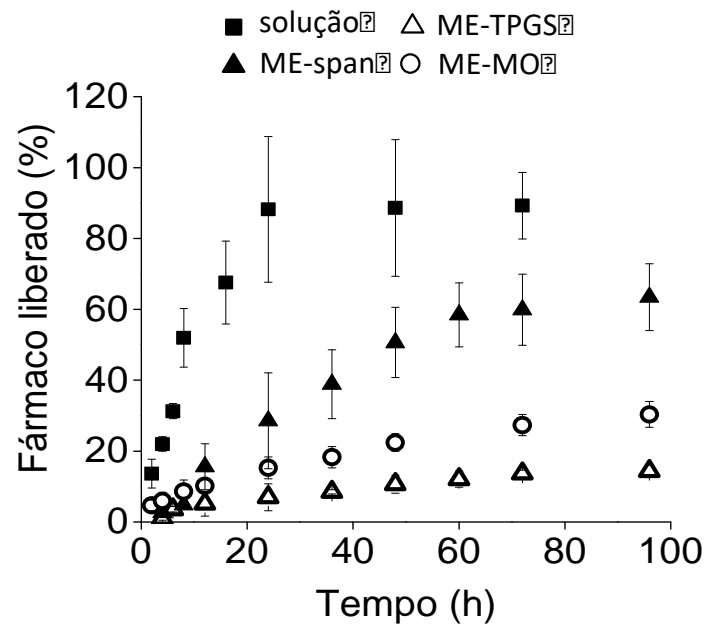


Figura 18- Liberação da naltrexona em função do tempo quando do uso da solução de fármaco em propilenoglicol, ou das formulações selecionadas (ME-Span, ME-TPGS, ME-MO).

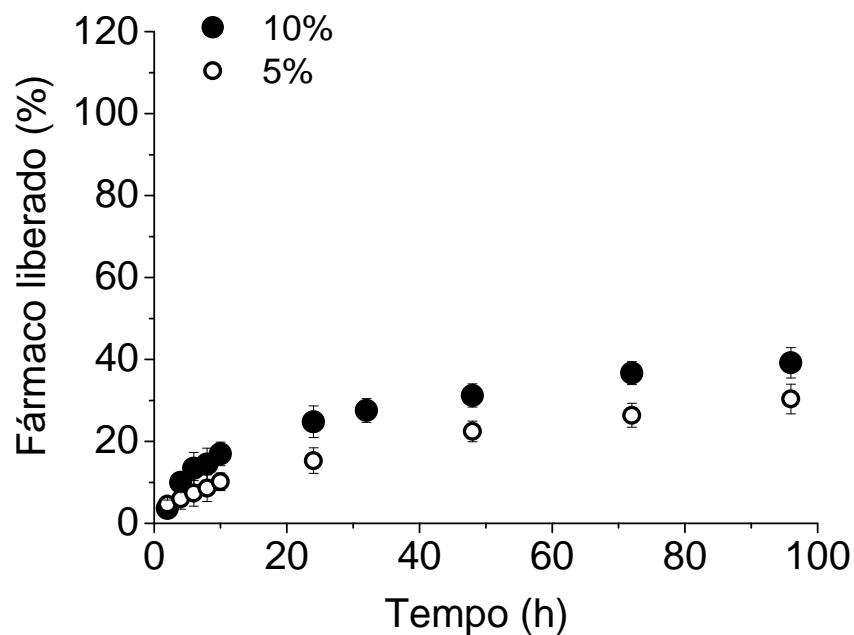


Figura 19- Comparação da liberação do fármaco naltrexona a partir de ME-MO quando utilizado na concentração de 5% e 10%

Em seguida, estudamos a cinética de liberação utilizando modelos de ordem zero, pseudo-primeira e primeira ordem. Em cinética de ordem zero, a porcentagem liberada é linear em função do tempo; em cinética de pseudo-primeira ordem (ou Higuchi), a porcentagem liberada é linear em função a raiz quadrada do tempo, enquanto que em cinética de primeira ordem, o log da quantidade de fármaco remanescente na formulação é linear em função do tempo. Após obtidos os gráficos para cada modelo, foram determinados os coeficientes de correlação, que encontram-se listados na tabela 5.

Tabela 5- Coeficiente de correlação linear obtido utilizando diversos modelos para linearização da liberação de naltrexona.

<b>Formulação</b>	<b>Ordem zero</b>	<b>Pseudo Primeira Ordem</b>	<b>Primeira Ordem</b>
ME-TPGS	0,945	<u>0,980</u>	0,969
ME-Span	0,919	<u>0,979</u>	0,960
ME-MO (5%)	0,957	<u>0,995</u>	0,968
ME-MO (10%)	0.848	<u>0.960</u>	0.849

Com base neste coeficiente, podemos afirmar que a liberação das matrizes estudadas seguem cinética de pseudo-primeira ordem, ou seja a porcentagem de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do tempo. Por causa da menor quantidade de fármaco incorporada, a formulação ME-Span foi excluída. Entre ME-MO e ME-TPGS (ambas capazes de prolongar a liberação de naltrexona), optamos por estudar *in vivo* a formulação ME-MO por que a quantidade máxima de fármaco liberada por essa formulação foi um pouco maior (~ 31%). A cinética de liberação manteve-se a mesma quando a naltrexona foi adicionada na concentração final de 10%, sugerindo que ela independe da concentração de fármaco.

#### 4.2 Avaliação da formação do gel *in vivo* e sua capacidade de sustentar a liberação de um marcador fluorescente

A administração subcutânea de 100 uL da formulação ME-MO resultou na formação de depósito que pôde ser observado por mais 30 dias no animal. A sequência de fotos demonstrada na Figura 20, tem por finalidade demonstrar o aspecto no local da administração e o tipo de sistema formado (através de análise por microscopia). Podemos observar uma diminuição centrípeta no local do injeto, tempo dependente, já mediante a palpação do mesmo nota-se um aumento da consistência local. Após 2, 10 e 20 dias os animais foram sacrificados, o gel retirado e analisado por microscopia de luz polarizada para verificar a formação da fase hexagonal. Como pode ser observado, em 2 dias a fase hexagonal foi formada *in vivo*, persistindo por mais de 20 dias. Vale ressaltar que em experimentos subsequentes, o gel foi observado no local por até 34 dias após a administração.

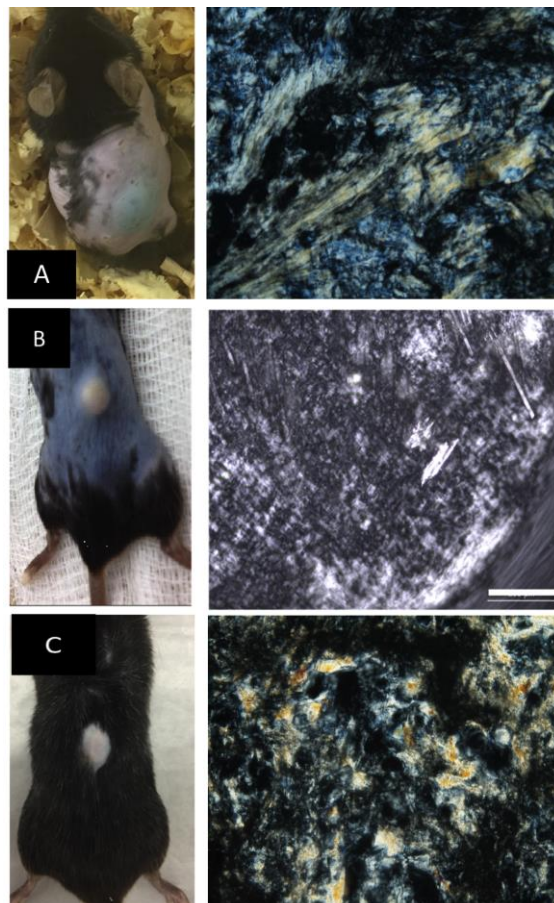


Figura 20- Formação do gel de fase hexagonal *in vivo* após 2 (A), 10 (B) e 20 dias (C) da administração de ME-MO. A estrutura hexagonal foi confirmada por microscopia de luz polarizada como pode ser observado nos painéis à direita. Barra: 200 um.



Havendo demonstrado a formação do gel *in vivo*, a etapa subsequente do trabalho envolveu avaliar a liberação de um marcador, ou seja, avaliar em um mesmo animal se o marcador era liberado de forma rápida ou mais prolongada ao longo de dias em comparação com uma solução do marcador em propilenoglicol. Como pode ser observado na Figura 21, a presença de fluorescência foi observada no local da aplicação da microemulsão ME-MO por mais de 30 dias. É possível observar também que quando solução de propilenoglicol foi administrada, houve espalhamento maior da formulação, atingindo uma região maior em alguns animais comparado com a microemulsão. Por outro lado, a fluorescência no local de administração desapareceu em menos de 20 dias após a aplicação. Esses resultados indicam a habilidade do gel de reter o marcador no local de aplicação por período de tempo superior comparado à solução, e portanto, prolongar sua liberação.

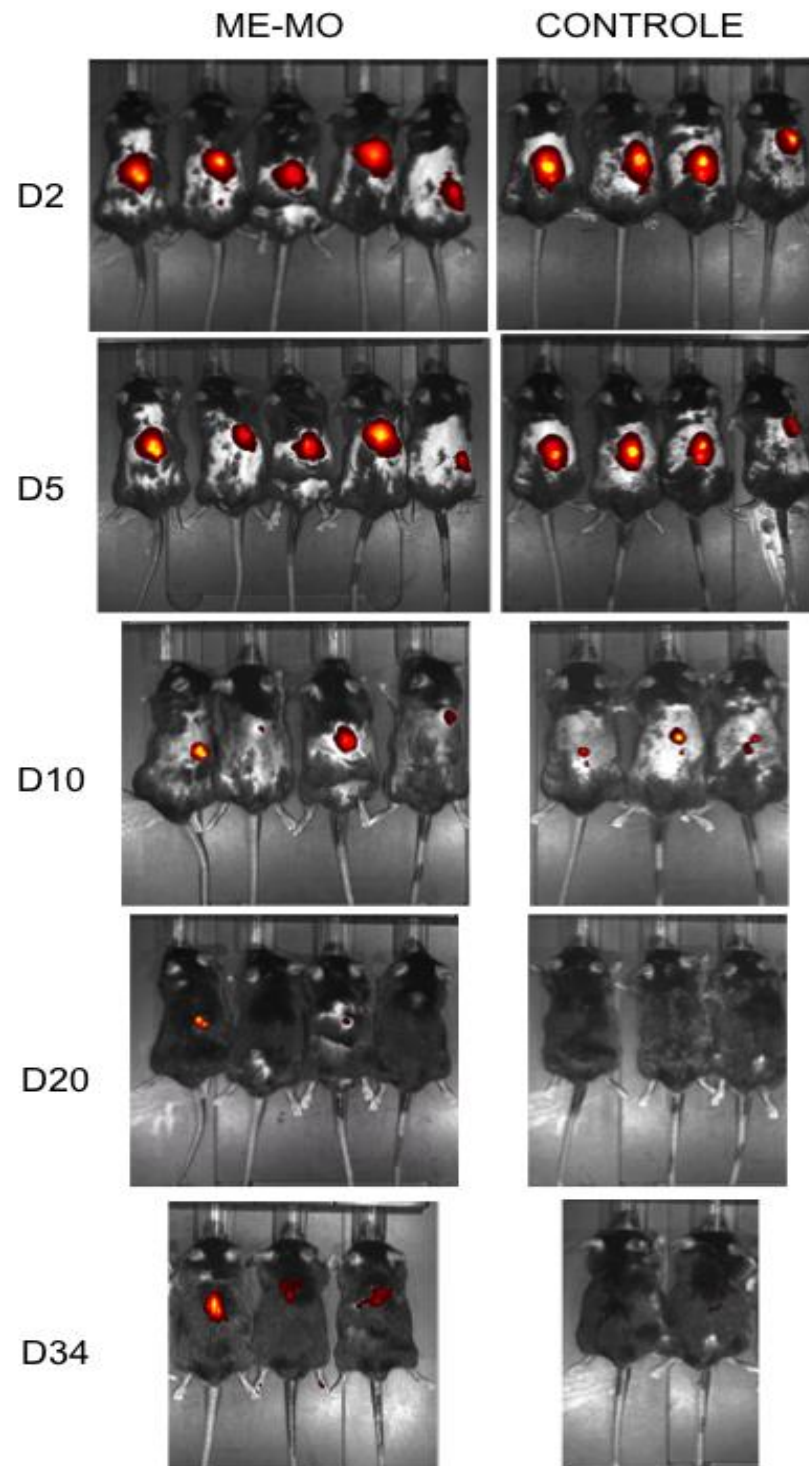


Figura 21- Acompanhamento do processo de liberação do marcador Alexa 647 em função do tempo a partir do gel de ME-MO comparado à solução controle em propilenoglicol.

Um fato interessante observado foi a permanência da fluorescência resultante da administração da solução do marcador em propilenoglicol por tempo de 10 dias. Esse efeito parece ter sido ocasionado pela adsorção do marcador no tecido cutâneo, que promoveu a

coloração do tecido mesmo após a solução ter sido absorvida, como pode ser observado na Figura 22. Aos 20 dias, a coloração da pele (bem como a fluorescência) desapareceu. Isso não ocorreu quando foi administrada a microemulsão ME-MO. Essa diferença pode ser atribuída à liberação de menores quantidades (por unidade de tempo) do marcador à partir do gel, evitando sua adsorção no tecido ao redor da formulação e sua coloração.

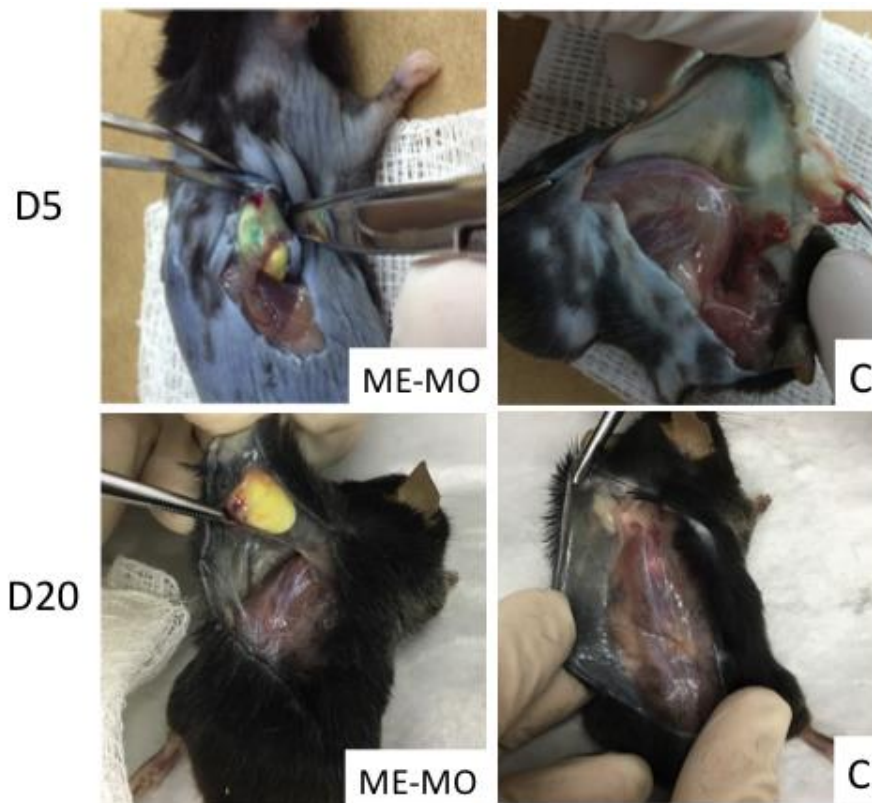


Figura 22- Formação do gel de fase hexagonal com retenção do marcador no gel após 5 (D5) ou 20 (D20) dias da administração de ME-MO, comparado à solução do marcador (controle, C). Notar que alguns animais controle apresentaram coloração azulada na pele mesmo na ausência da formulação após 5 dias, o que indica uma possível adsorção cutânea do marcador e pode justificar a presença de fluorescência em alguns animais controle em períodos de tempo superiores a 5 dias.

Foi possível quantificar as médias da radiância (através do software do equipamento *IVIS*) no local de administração em função do tempo, e a relação entre esses parâmetros é representada na figura 23. Como pode ser observado, os valores de radiância no local de administração diminuem mais lentamente quando da administração de ME-MO comparado à solução controle em propilenoglicol, o que indica mais uma vez a habilidade da formulação desenvolvida em prolongar a liberação de compostos.

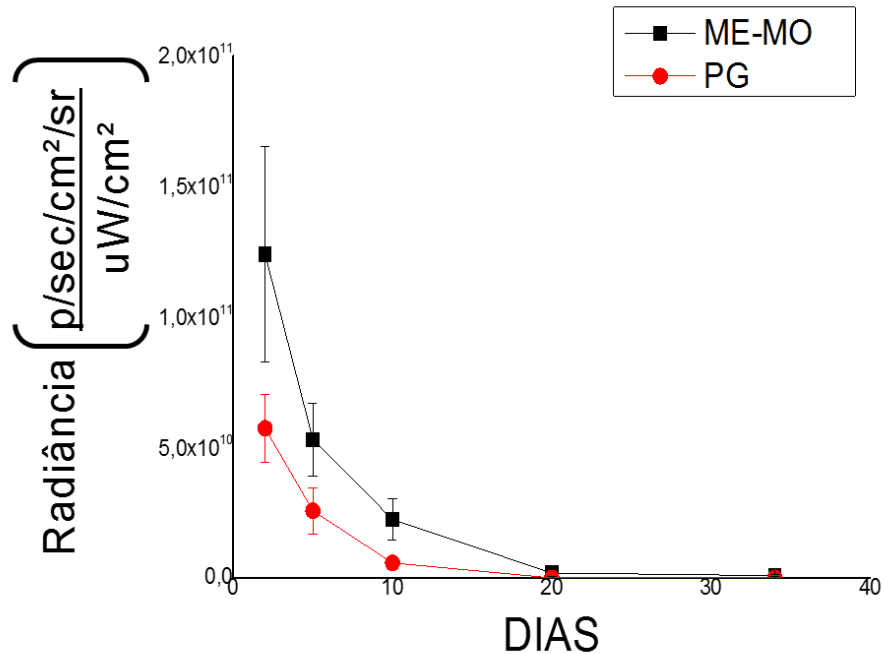


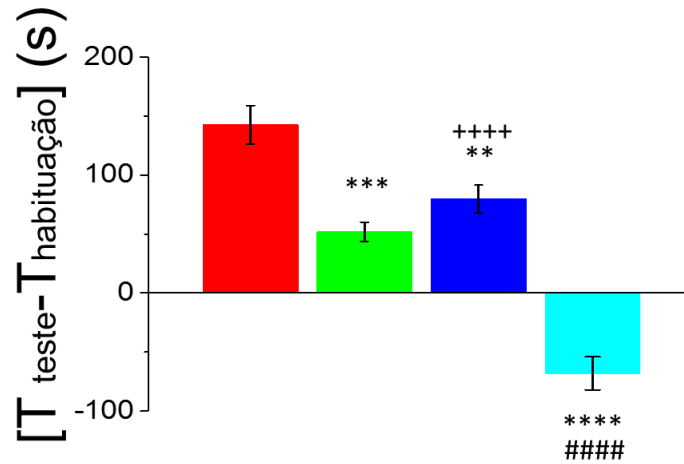
Figura 23- Decaimento da radiação no local de administração em função do tempo após administração de ME-MO e solução do marcador em propilenoglicol.

#### 4.3 Avaliação da influência da formulação sobre os efeitos reforçadores positivos induzidos por etanol em modelo de preferência condicionada por lugar

Havendo demonstrado o potencial de ME-MO como um sistema de liberação para a naltrexona, avaliamos então a eficácia do sistema sobre os efeitos reforçadores induzidos por etanol em modelo de preferência condicionada por lugar. Esta avaliação foi realizada com a variação ( $\Delta$ ) do tempo de permanência de cada animal no dia do teste no compartimento pareado de etanol em relação ao da habituação. O programa estatístico utilizado foi o Origin 9.0 e o poder da análise do teste estatístico calculado pelo programa utilizado para a análise da amostra contendo de 26 amostragens foi 1.

Na figura 24, foi plotada a média de variação dos tempos. No grupo CT-SF foi 142,57 segundos, no grupo controle com naltrexona usado diariamente por via subcutânea foi de 52 segundos, para o grupo tratado com microemulsão com 5% de naltrexona foi de 79 segundos e para o último grupo a variação foi de menos 68 segundos. Para estabelecer a comparação entre os grupos foi usado o teste de *post hoc* Tukey (conforme ilustrado na figura 25) e usado  $p < 0,05$  como probabilidade de significância. Observou-se diferença estatisticamente significativa em todos os grupos exceto na comparação entre o grupo CT-NTX e a microemulsão com naltrexona 5%. Ou seja, todos os animais tratados com

naltrexona apresentaram menor preferência condicionada ao etanol comparados com o grupo controle CT-SF, sugerindo redução dos efeitos recompensadores da droga. Não observou-se diferença estatisticamente significativa entre a solução de naltrexona e ME-MO 5%, mas o grupo ME-MO 10% diferiu estatisticamente da solução naltrexona diária e ME-MO 5%.



\*\*P < 0.01 vs CT-SF

\*\*\* p < 0.001 vs CT-SF

\*\*\*\* p < 0.0001 vs CT-SF

##### p < 0.0001 vs CT-NTX

++++ p < 0.0001 vs ME – MO 10%

Figura 24- Representação gráfica da média e erro padrão dos grupos estudados na PCL. Os dados mostram a diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com a droga no dia do teste e o tempo gasto no mesmo compartimento no dia da habituação. Em vermelho o grupo CT-SF, em verde o grupo CT-NTX, em azul o grupo ME-MO5%, em ciano o grupo ME-MO 10%.

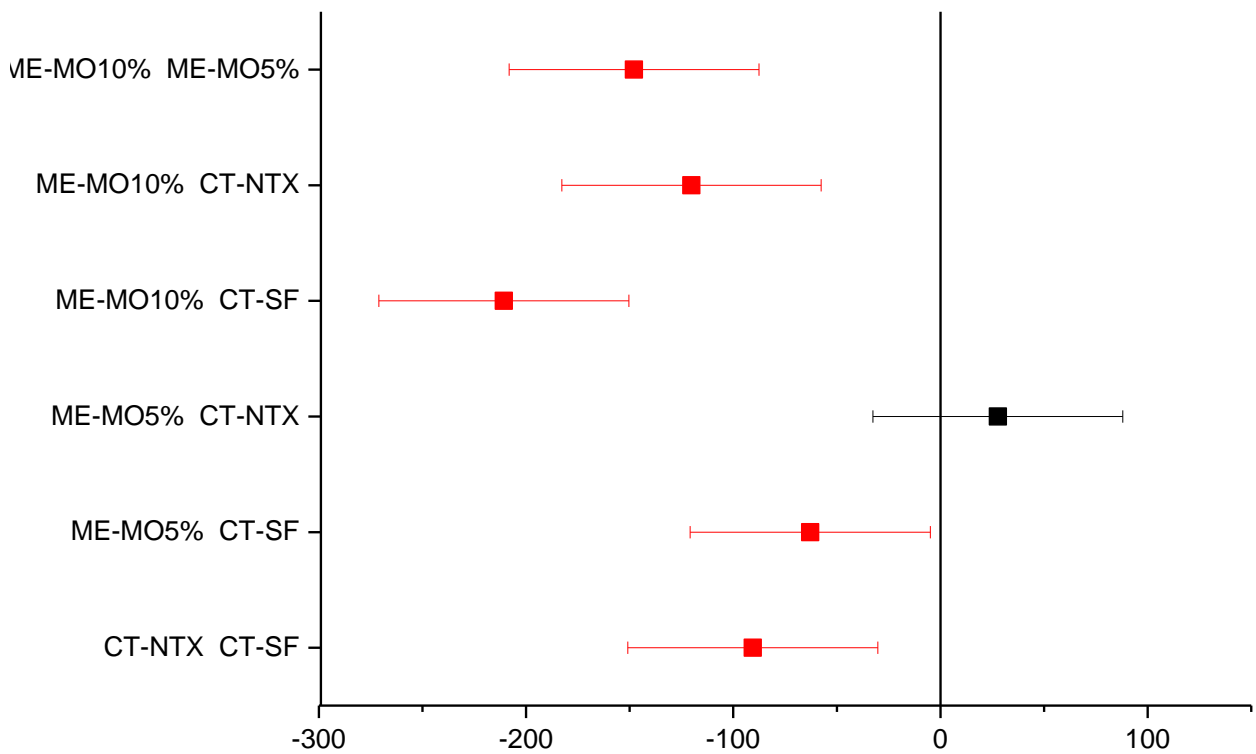


Figura 25- Análise das diferenças das médias utilizando o *post hoc de Tukey*. A barra em vermelho indica diferença estatística significativa. A barra em preto não houve diferença estatística significativa.

## 5 DISCUSSÃO

A habilidade de líquidos isotrópicos de formarem sistemas líquido-cristalinos após contato com excesso de água dos fluidos corporais está descrita na literatura (49-53, 61, 71, 74, 90). Estes sistemas podem ser formados a partir de lipídios anfifílicos que intumescem na presença de água e formam vários tipos de cristais líquidos. Os sistemas líquido-cristalinos são muito promissores para administração sustentada de fármacos, mas por serem na sua maioria viscosos, sua formação *in situ* é necessária (48, 53, 76, 77).

O tipo de fase líquido-cristalina formada é determinada pelo tipo de composto formador (tensoativo ou lipídio em sua maioria), sua concentração no sistema, bem como a incorporação de outros aditivos como fármacos, solventes e outros tensoativos e/ou co-tensoativos (91). Lipídios como a monoleína, fosfatidilcolina, fitantriol, monolinoleína, monoelaidina e oleil glicerato, bem como tensoativos como polisorbato 80 e vitamina E TPGS são exemplos de compostos utilizados para formação de fases líquido-cristalinas liotrópicas (52, 92-94). Dentre eles, o mais conhecido formador de fase líquido-cristalina é o gliceril monoleato (ou monoleína). Quando colocado em contato com água, ele reorganiza-se em bicamadas lipídicas formando uma fase micelar reversa ( $L_2$ ) e três tipos de fases líquido-cristalinas (lamelar, hexagonal reversa e fase cúbica) dependendo da temperatura e da quantidade de água. A fase lamelar estruturalmente apresenta-se em arranjo linear alternado por bicamadas lipídicas e canais de água. A fase hexagonal reversa ( $H_{II}$ ) consiste em infinitas hastes de água separadas pela bicamada lipídica. A fase cúbica é a mais complexa e usualmente observada entre a fase lamelar e a fase reversa hexagonal (91).

Nesse trabalho, além da capacidade de formação da fase líquido-cristalina, foi necessário observar a capacidade de formação das microemulsões. Assim, avaliar a influência do tipo de tensoativo e da razão entre eles é fundamental para assegurar a formação dos sistemas e a capacidade de absorção de água para a transformação de fases *in vivo* (95, 96). Os tensoativos usados neste projeto foram TPGS, Span e monoleína. A escolha foi baseada em estudos da literatura mostrando que além de fase líquido-cristalina, esses compostos eram também capazes de formar microemulsões com estruturas internas variadas dependendo do teor de água (61, 97, 98).

A incorporação de outros compostos aos sistemas líquido-cristalinos pode resultar em completa mudança de fase (91) daí a importância de avaliarmos a influência da incorporação da naltrexona no sistema. Embora a incorporação da naltrexona não tenha

alterado a formação da fase líquido cristalina, sua solubilidade no sistema foi um fator determinante para a quantidade a ser incorporada: em sistemas formados por TPGS: Span, quantidades maiores que 1,3% não puderam ser dissolvidas, o que pode ser justificado pela ausência de propilenoglicol na formulação uma vez que o fármaco é bastante solúvel neste solvente.

Ao avaliarmos as características das formulações isotrópicas, que caracterizamos como microemulsões, observamos que todas as formulações eram isotrópicas ao microscópio de luz polarizada e apresentaram diâmetro nanométrico, inferior a 150 nm. Essas características são compatíveis com sistemas microemulsionados (42).

O comportamento reológico das microemulsões (ME-TPGS e ME-MO) é do tipo Newtoniano, no qual a tensão é diretamente proporcional à taxa de deformação. Esse tipo de comportamento tem sido descrito para microemulsões do tipo água -em- óleo (A/O), óleo -em- água (O/A) ou bicontínua, embora o comportamento não Newtoniano também já tenha sido descrito para microemulsões mais viscosas, principalmente as bicontínuas (46, 99). Embora não tenham sido realizados estudos para identificação da estrutura interna das microemulsões, elas são provavelmente do tipo A/O já que a quantidade de água é bem inferior a quantidade de óleo utilizada. O comportamento Newtoniano implica que as microemulsões apresentam viscosidade constante à mesma temperatura para diferentes taxas de cisalhamento, de modo que durante a injeção no tecido subcutâneo não deverá ocorrer alteração da viscosidade. Embora a composição do sistema e tipo de composto formador (TPGS ou monoleína) não influenciem o comportamento reológico das microemulsões, esses fatores influenciam a viscosidade das formulações: ME-TPGS apresentou viscosidade de  $0,420 \pm 0,010$  Pa.s, ou seja 4,9 vezes superior à viscosidade de ME-MO ( $0,085 \pm 0,03$  Pa.s).

Os géis de fase hexagonal obtidos mediante adição de água na concentração final de 30% (para o sistema formado por TPGS) ou 40% (para o sistema formado por monoleína) apresentaram comportamento reológico compatível com sistemas pseudoplásticos. Tal comportamento é caracterizado pela relação não linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, e redução da viscosidade com aumentos da taxa de deformação (Figura 12 B e D). Esses dados sugerem novamente que o tipo de composto formador, ou seja, monoleína ou TPGS, não influencia o tipo de comportamento reológico. O comportamento pseudoplástico é consistente com estudos prévios da literatura e pode ser decorrente da formação de vesículas multilamelares em altas taxas de cisalhamento (100-102). Por outro lado, a fase hexagonal formada por monoleína exibiu menor



viscosidade, o que foi evidenciado pela necessidade de maiores tensões de cisalhamento no gel formado por ME-TPGS para obtenção de deformações semelhantes ao gel da ME-MO. Essa diferença pode ser decorrente da menor proporção do composto formador de fase no gel formado por ME-MO (aproximadamente 34%) comparado ao gel de ME-TPGS (45%) associado à maior quantidade do aditivo hidrofílico propilenoglicol, o que pode aumentar a desordem e mobilidade do tensoativo formador de fase (103). Já o oposto foi observado para ME-Span, uma vez que sistema líquido-cristalino formado foi a fase lamelar e não a hexagonal; a fase lamelar é visivelmente menos viscosa.

Os dados obtidos no estudo do intumescimento foram avaliados segundo Schott 1992, utilizando modelos de primeira ordem e segunda ordem. Os coeficientes de correlação (Tabela 4) demonstram que o intumescimento das matrizes ME-MO e ME-TPGS segue cinética de Segunda Ordem. De acordo com Schott, em um sistema que sofre intumescimento de segunda ordem, o processo é controlado pela relaxação que ocorre no sistema durante a captação de água. Neste caso, a velocidade de intumescimento diminuiu de maneira diretamente proporcional à área interna dos sítios que ainda não interagiram com a água em determinado tempo. Muitas matrizes poliméricas usadas como sistemas de liberação de fármacos apresentam intumescimento de acordo com a cinética de primeira ordem (51). Estudos anteriores demonstraram que além da monoleína, o BRIJ e fitantriol também absorvem água de acordo com cinética de segunda ordem (76, 104, 105). Por outro lado, o tensoativo hidrofílico óleo de castor etoxilado parece sofrer intumescimento de acordo com cinética de pseudo-primeira ordem (76, 104, 105). Essa diferença pode ser decorrente do tempo utilizado para avaliar o intumescimento, que foi de apenas 2 horas no caso do óleo de castor etoxilado, não sendo atingido o equilíbrio.

Uma das mais importantes e desafiadoras áreas no estudo de dispensação dos fármacos é prever a liberação em função do tempo usando modelos matemáticos simples ou até mesmo sofisticados (106-108). Existe um grande número de revisões que tem como assunto a liberação de fármacos. O mecanismo de liberação de fármaco oferece uma maneira de categorizar em difusão controlada, intumescimento controlado e quimicamente controlado (106).

A liberação de fármacos *in vitro* a partir de sistemas líquido-cristalinos tem sido investigado em diversos estudos. O mecanismo de liberação não é completamente entendido. Diferentes tipos de transporte de massa podem estar envolvidos no controle de liberação do fármaco. Pode estar intuído a difusão de água no sistema, dissolução, efeitos osmóticos, erosão da matriz formada. A vasta maioria dos modelos teóricos é baseado

nas equações de difusão. O fenômeno de difusão é intimamente conectado com a estrutura do material. Diversos fatores parecem estar envolvidos, como por exemplo propriedades como a concentração de fármaco solubilizada e sua afinidade pelos canais de água da estrutura líquido-cristalina, composição e estrutura dos cristais líquidos (que estão relacionados com o conteúdo de água inicial, com a taxa de absorção de água e com o tamanho dos canais hidrofílicos) e viscosidade, além das condições experimentais usadas para realizar o ensaio de liberação *in vitro* (71, 109, 110). Em geral, acredita-se que a liberação de fármacos desses sistemas seguem três etapas: dissolução do fármaco suspenso na matriz, seguido da difusão através do sistema e a transferência da matriz para a fase receptora (111).

O tamanho dos canais das estruturas líquido-cristalinas pode influenciar na liberação do fármaco. Por exemplo, foi descrito que a liberação de compostos hidrofílicos de fase hexagonal reversa é menor do que na fase bicontínua cúbica, provavelmente devido ao menor tamanho dos canais hidrofílicos da fase hexagonal (76). Além do diâmetro, a tortuosidade dos canais de água também parece ser importante (91, 109).

A quantidade de naltrexona liberada difere entre as formulações estudadas. Comparando à quantidade de liberação nas primeiras 24 horas e nas horas subsequentes, observou-se que o sistema ME-Span liberou uma quantidade maior de fármaco, em um tempo menor, enquanto que com ME-TPGS e ME-MO obteve-se uma liberação mais sustentada. De acordo com as observações das Figura 15-18, ME-Span liberou cerca de 65% em 96 horas o que em valores absolutos representaria cerca de aproximadamente 0,85 mg. Entretanto, ME-MO liberou cerca de 31% do fármaco, o que representaria 1,5 mg e ME-TPGS liberou cerca de 15% no mesmo período (cerca de 0,75 mg). As diferenças de liberação podem estar relacionadas ao tipo de fase líquido-cristalina formada e sua viscosidade. A fase lamelar formada por ME-Span é menos viscosa, e por isso, impõe menor resistência à difusão do fármaco. Embora tanto ME-MO quanto ME-TPGS formem fase hexagonal, o sistema formado por ME-TPGS é mais viscoso, impondo maior resistência à difusão e liberação da naltrexona (91, 112). Esses resultados sugerem que, mesmo considerando a maior porcentagem liberada por ME-Span, uma menor quantidade absoluta de fármaco estaria disponível para seu efeito em decorrência de menor quantidade de fármaco incorporado no sistema. Por isso o sistema ME-Span foi descartado.

De acordo com os dados apresentado na tabela 5, podemos afirmar que ME-MO, ME-Span e ME-TPGS apresentam liberação seguindo cinética de pseudo-primeira ordem, ou seja a porcentagem de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do

tempo. Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick (lei quantitativa na forma de equação diferencial que descreve diversos casos de difusão de matéria ou energia em um meio no qual inicialmente não existe equilíbrio), estando dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, uma vez que a ausência de intumescimento é um dos requisitos para uso deste modelo (113). Assim, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada desses sistemas. No entanto, é o mais realista dos vários mecanismos que ocorrem nos sistemas matriciais que o modelo de ordem zero (114).

O aumento da quantidade de naltrexona para 10% em ME-MO não alterou a cinética de liberação, o que corrobora resultados anteriores que demonstraram que a liberação independe da concentração de fármaco incorporada inicialmente (105). Com base nos resultados obtidos, a formulação ME-MO foi selecionada para experimentos *in vivo*.

A formulação ME-MO contendo 0.05% do marcador fluorescente Alexa fluor 647 (m/m) foi administrada na região dorsal de camundongos sem pelo anestesiados com isoflurano, e a retenção do marcador no local de injeção foi monitorada 2, 5, 10, 20 e 34 dias após a administração utilizando o equipamento IVIS com filtro para absorção em 650-700 nm. O IVIS Spectrum é um equipamento que permite a captação de fluorescência e bioluminescência *in vivo*. Possui um conjunto otimizado de filtros de alta eficiência e algoritmos espectrais que permite tirar o proveito de marcadores fluorescentes em todo o comprimento de onda azul até próximo da região do infravermelho. Foi observado que a transformação da microemulsão em gel de fase hexagonal ocorre *in vivo* em dois dias, e o gel persiste por mais de 30 dias no local assim como a fluorescência do marcador incorporado na formulação. Isso demonstra sua capacidade de promover uma liberação mais lenta do composto incorporado comparado à solução controle em propilenoglicol.

A potência da naltrexona de reduzir o consumo de álcool varia dramaticamente de acordo com a literatura. Por exemplo alguns estudos em roedores sugerem que doses menores que 0,1 mg/kg reduziria o consumo de álcool e o reforço positivo por ele induzido. Outros estudos mostram que injeções por via intraperitoneal com doses entre 3 ou 30mg/kg de naltrexona fracassaram em reduzir o consumo de álcool e o reforço positivo por ele induzido (60). A via de administração do antagonista opióide pode ter um impacto substancial em experimentos pré-clínicos, raramente enfatizado na literatura quanto aos efeitos da administração do etanol afirmam as autoras Keith L. Williams, Carissa L. Broadbridge. Elas demonstraram que 0,1 mg/kg de naltrexona quando usado via

subcutânea reduz o reforço positivo do álcool. Entretanto, quando a via intraperitoneal foi estudada foi necessária uma dose 10 vezes maior (60). Sabe-se que é aprovada a administração intramuscular de 380 mg de naltrexona incorporada em micropartículas a cada 30 dias para tratamento de dependência ao álcool. Considerando que o volume máximo considerado passível de administração subcutânea varia até 4 mL (mais comumente até 2 mL) e que a concentração do fármaco na microemulsão é 5% (m/m), seria possível administrar até 200 mg de fármaco, o que comparativamente à quantidade de fármaco administrada com as micropartículas, seria suficiente para cerca de 15 dias de tratamento. Na tentativa de aumentar a quantidade de fármaco administrado, conseguimos, após sonicação da fase aquosa da formulação contendo propilenoglicol e água, dissolver 10% de naltrexona mediante sonicação em banho por 5 minutos. Sendo a naltrexona administrada na forma de cloridrato, ela poderia atuar como um agente osmoticamente ativo, podendo ocorrer a formação de necrose no tecido celular. Não foi observado nenhum tipo de lesão na pele e tecido de camundongos após administração da formulação contendo 5 ou 10% de naltrexona.

O aparato de preferência condicionado por lugar é utilizado para estudar os efeitos recompensadores positivos e aversivos (negativos). O objetivo do teste de Preferência Condicionada por Lugar é caracterizar o potencial gratificante de uma droga ou outra condição experimental. Em 1976, os autores Rossi e Reid publicaram um relato no qual o tempo gasto no compartimento pareado com a morfina em relação ao tempo da solução controle foi utilizado (115). O protocolo usado neste experimento foi descrito em 2006 pelos autores Cunningham, Gremel e Groblewski estes descrevem no artigo o protocolo de PCL ao etanol (116). A associação do ambiente com a injeção, por si, promove uma resposta motivacional. Esse tipo de associação permite ao animal associar o evento com base na experiência prévia. Quando o estímulo é recompensador, os camundongos tendem a aproximar-se do compartimento em contato com o estímulo positivo (nesses estudos foi usado a dose de 2,0 g/kg, intraperitoneal de etanol, que espera-se produzir uma preferência condicionada por lugar. Em um estudo inicial que examina os efeitos do etanol no paradigma da PCL, descobriu-se que baixas doses (<0,8 g/kg) não tiveram efeito (117). Entretanto os roedores tendem a evitar contato com aquele ambiente que causa aversão. Sabido que o álcool é uma droga de abuso, e certamente promove efeitos recompensadores é portanto, esperado que o animal permaneça mais tempo no compartimento que foi oferecido a injeção de etanol intraperitoneal ao invés do compartimento que recebeu a solução salina. O efeito reforçador positivo do etanol no

grupo CT-SF foi observado por uma média positiva na diferença entre o tempo gasto no compartimento pareado com etanol no dia do teste menos o tempo que o animal passou neste compartimento no dia da habituação (Figura 23).

Vale ressaltar que o etanol tem um efeito bifásico, onde o efeito reforçador positivo, expresso por uma estimulação locomotora inicial, predomina durante a curva ascendente de absorção. Cunningham et al. (116) observaram que uma exposição relativamente curta (5 minutos) durante a fase de condicionamento era mais eficaz na indução da PCL. Como anteriormente justificado, a sensação de recompensa está ligada a um complexo sistema em “cascata”, envolvendo diversas estruturas e vários neurotransmissores. O resultado final do processo consiste na ativação de uma via dopaminérgica mesolímbica. O processo se inicia no hipotálamo, com atividade excitatória de neurônios serotoninérgicos, isto leva a liberação de meta-enkefalina na área tegmentar ventral, o qual inibe a ação inibitória do GABA sobre os neurônios secretores de dopamina. Desinibidas as células dopaminérgicas “disparam” no feixe mesolímbico e a dopamina termina por se acoplar com seus receptores D<sub>2</sub>, no hipocampo (via amígdala) e no *nucleo accumbens* onde, mais uma vez, a encefalina neutraliza a ação inibitória do GABA. Promove-se, assim, a despolarização dos neurônios dopaminérgicos (pós-sinápticos) nestas duas áreas, o que completa a “cascata” e gera a sensação de recompensa. O bloqueio de receptores opióides no córtex cingulado anterior (região atribuída ao incentivo motivacional) reduz a PCL (118).

Os efeitos de fármacos para o tratamento da dependência do álcool foram testados em 1998 por Cunningham et al. (25). Nesse estudo levantaram a hipótese de que a naltrexona poderia interferir no processo de aprendizado associativo. Logo poderia extinguir tanto o condicionamento quanto a aversão, porém o fármaco aumentou a expressão da aversão. Apesar de não interferir no aprendizado associativo, o fármaco contribuiu na aversão ao álcool (119).

O procedimento envolve o condicionamento operante de uma predileção por um compartimento particular que tem sido pareado com um estado induzido pela substância ou condição testada. Se um fármaco apresenta propriedades gratificantes, o animal passará mais tempo no compartimento com o qual foi pareado. O procedimento de preferência condicionada por lugar é classicamente usado desde 1940 (120).

Como pudemos evidenciar pela comparação do teste *post hoc* houve diferença estatisticamente significativa para  $p \leq 0,05$  entre todos os grupos, exceto CT-NTX e ME-MO 5% (Figura 24). Estas diferenças podem ser justificadas pelo fato de no grupo ME-MO 10% haver liberação de maiores quantidades da naltrexona, Com ME-MO com 10% de

naltrexona espera-se obter uma concentração sérica maior quando comparada com a microemulsão ME-MO 5%.

Quando se compara estes dois outros grupos (CT-NTX *versus* ME-MO 5%) apesar de não ter tido diferença estatisticamente significativa  $p > 0,05\%$ , o próprio fato de não necessitar administração diária da naltrexona torna-se por si uma grande vantagem, visto que uma única administração de uma formulação subcutânea pode evitar a administração diária, subcutânea da naltrexona.

Todavia, pensando na comodidade da posologia ao paciente, espera-se aumento da adesão ao tratamento. Por isso, a via de administração é de suma importância. Numa comparação sistemática da eficácia e tolerabilidade de administração oral *versus* injetável (via intramuscular) de naltrexona, o autor Roozen et al. (59, 121) verificou que a formulação injetável demonstrou benefícios iguais ou maiores que a naltrexona oral na promoção da abstinência total, tempo para a primeira bebida, e uma redução na taxa de eventos de dias de consumo em relação ao placebo (122). Estes mecanismos considerados pela ação da naltrexona incluem a redução do “*craving*”. A maioria dos indivíduos quando expostos aos seus hábitos alcoólicos observa-se o aumento da necessidade de beber, o que é acompanhado de reatividade psicofisiológica, como aumento da frequência cardíaca, pressão arterial e rubor da pele. Medicamentos que controlam a urgência de beber podem promover a abstinência e consumo do álcool. Pela redução dos efeitos estimulantes do álcool, potencialização dos efeitos sedativos (estudos têm mostrado que a naltrexona causa aumento do auto-relato de fadiga, tensão e confusão) e aumento do controle cognitivo (dados pré-clínicos recentes sugerem que as farmacoterapias, incluindo a naltrexona, podem funcionar aumentando o controle cognitivo e diminuindo a tomada de decisão impulsiva (121). Além disso, é possível propor o uso da formulação com menor quantidade de naltrexona em outras patologias conforme descrição *off-label* na literatura. A administração de baixa dose de naltrexona (4,5mg/dia) tem sido investigada com resultados promissores na Doença de Crohn; fibromialgia; esclerose múltipla; obesidade (em associação com bupropiona); câncer; AIDS e doenças autoimunes (123-126).

## 6 CONCLUSÕES

Microemulsões com diâmetro da fase dispersa inferior a 150nm foram obtidas com êxito utilizando diferentes tensoativos e co-tensoativos. As microemulsões ME-TPGS e ME-MO originaram fase hexagonal mediante absorção de água, enquanto que ME-Span originou fase lamelar.

As microemulsões apresentam comportamento reológico tipo newtoniano e as fases hexagonal e lamelar compartilham-se como fluido pseudoplástico. Todas as microemulsões foram capazes de incorporar o fármaco, embora em diferentes concentrações: a formulação ME-Span incorporou 1,3 %, enquanto que ME-TPGS e ME-MO incorporaram até 5%. Independentemente da quantidade incorporada e do tipo de fase, a liberação pode ser melhor descrita de acordo com cinética de pseudo-primeira ordem. Essas formulações sustentaram a liberação do fármaco por tempo superior a 80 horas.

A microemulsão ME-MO formou gel de estrutura hexagonal após 48 h, que se manteve por mais de 30 dias. Através da experimentação *IVIS*, observou-se fluorescência do marcador no local da aplicação por até 34 dias com a administração do gel, o que implica em liberação lenta, ao contrário do que foi observada quando da administração da solução do marcador.

A microemulsão ME-MO com 5% de naltrexona reduziu os efeitos recompensadores do etanol.

A microemulsão ME-MO com 10% de naltrexona antagonizou a preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol.

## REFERÊNCIAS\*

1. Gigliotti A, Bessa MA. [Alcohol Dependence Syndrome: diagnostic criteria]. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26 Suppl 1:S11-3.
2. Haighton C, Wilson G, Ling J, McCabe K, Crosland A, Kaner E. A Qualitative Study of Service Provision for Alcohol Related Health Issues in Mid to Later Life. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148601.
3. Valencia JG, Méndez Villanueva MP. [Factors Associated With the Temporary Abandonment of Treatment for Disorders Due to Substance Abuse in an Institution in Medellin, Colombia]. *Rev Colomb Psiquiatr.* 2014;43(1):7-17.
4. Dupuy M, Chanraud S. Imaging the Addicted Brain: Alcohol. *Int Rev Neurobiol.* 2016;129:1-31.
5. Costin BN, Miles MF. Molecular and neurologic responses to chronic alcohol use. *Handb Clin Neurol.* 2014;125:157-71.
6. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, NSDUH Series H-46, HHS Publication No. (SMA) 13-4795. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration. [Internet]. 2013.
7. Afshar M, Richards S, Mann D, Cross A, Smith GB, Netzer G, et al. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. *Alcohol.* 2015;49(1):57-64.
8. Dubowski KM. Absorption, distribution and elimination of alcohol: highway safety aspects. *J Stud Alcohol Suppl.* 1985;10:98-108.
9. Goldstein MS, Surber M, Wilner DM. Outcome evaluations in substance abuse: a comparison of alcoholism, drug abuse, and other mental health interventions. *Int J Addict.* 1984;19(5):479-502.
10. Peoples RW, Li C, Weight FF. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:185-201.
11. Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):299-315.
12. Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med.* 2016;374(4):363-71.

---

\* De acordo com

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. [2011 jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).



13. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760-73.
14. Spanagel R, Zieglgänsberger W. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18(2):54-9.
15. Katner SN, Magalong JG, Weiss F. Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20(5):471-9.
16. Spagnolo PA, Ramchandani VA, Schwandt ML, Zhang L, Blaine SK, Usala JM, et al. Effects of naltrexone on neural and subjective response to alcohol in treatment-seeking alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(12):3024-32.
17. Acquas E, Meloni M, Di Chiara G. Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol*. 1993;230(2):239-41.
18. Mitchell JM, Tavares VC, Fields HL, D'Esposito M, Boettiger CA. Endogenous opioid blockade and impulsive responding in alcoholics and healthy controls. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(2):439-49.
19. Mitchell JM, Bergren LJ, Chen KS, Rowbotham MC, Fields HL. Naltrexone aversion and treatment efficacy are greatest in humans and rats that actively consume high levels of alcohol. *Neurobiol Dis*. 2009;33(1):72-80.
20. Brett J, Ivers R, Doyle M, Lawrence L, Conigrave K. Should naltrexone be the first-line medicine to treat alcohol dependence in Aboriginal and Torres Strait Islander populations? An Australian perspective. *Aust Fam Physician*. 2015;44(11):815-9.
21. Ulm RR, Volpicelli JR, Volpicelli LA. Opiates and alcohol self-administration in animals. *J Clin Psychiatry*. 1995;56 Suppl 7:5-14.
22. Koob GF. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(2):232-43.
23. Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*. 2007;12(3-4):227-462.
24. Lucke-Wold B. The Varied Uses of Conditioned Place Preference in Behavioral Neuroscience Research: An Investigation of Alcohol Administration in Model Organisms. *Impulse (Columbia)*. 2011;2011.

25. Cunningham CL, Henderson CM, Bormann NM. Extinction of ethanol-induced conditioned place preference and conditioned place aversion: effects of naloxone. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;139(1-2):62-70.
26. Johnson BA, Ait-Daoud N, Prihoda TJ. Combining ondansetron and naltrexone effectively treats biologically predisposed alcoholics: from hypotheses to preliminary clinical evidence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(5):737-42.
27. Egli M. Can experimental paradigms and animal models be used to discover clinically effective medications for alcoholism? *Addict Biol*. 2005;10(4):309-19.
28. Heilig M, Egli M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):855-76.
29. Johnson BA. Naltrexone long-acting formulation in the treatment of alcohol dependence. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(5):741-9.
30. Anton RF, Kranzler HR, Meyer RE. Neurobehavioral aspects of the pharmacotherapy of alcohol dependence. *Clin Neurosci*. 1995;3(3):145-54.
31. Lobmaier PP, Kunoe N, Gossop M, Waal H. Naltrexone depot formulations for opioid and alcohol dependence: a systematic review. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2011;17(6):629-36.
32. Anton RF, Moak DH, Waid LR, Latham PK, Malcolm RJ, Dias JK. Naltrexone and cognitive behavioral therapy for the treatment of outpatient alcoholics: results of a placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry*. 1999;156(11):1758-64.
33. Yin W, Akala EO, Taylor RE. Design of naltrexone-loaded hydrolyzable crosslinked nanoparticles. *Int J Pharm*. 2002;244(1-2):9-19.
34. Ngo HT, Arnold-Reed DE, Hansson RC, Tait RJ, Hulse GK. Blood naltrexone levels over time following naltrexone implant. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(1):23-8.
35. Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Tripodo C, Florena AM, et al. Release of naltrexone on buccal mucosa: permeation studies, histological aspects and matrix system design. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;67(2):425-33.
36. Milewski M, Stinchcomb AL. Vehicle composition influence on the microneedle-enhanced transdermal flux of naltrexone hydrochloride. *Pharm Res*. 2011;28(1):124-34.
37. Kjoniksen AL, Calejo MT, Zhu K, Cardoso AM, de Lima MC, Jurado AS, et al. Sustained release of naltrexone from poly(n-isopropylacrylamide) microgels. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):227-34.

38. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Ujoodha R, Jhugroo A, Hulse GK, Jhurry D. Naltrexone: A review of existing sustained drug delivery systems and emerging nano-based systems. *J Control Release*. 2014;183C:154-66.
39. Hulse GK. Improving clinical outcomes for naltrexone as a management of problem alcohol use. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(5):632-41.
40. Krupitsky EM, Blokhina EA. Long-acting depot formulations of naltrexone for heroin dependence: a review. *Current opinion in psychiatry*. 2010;23(3):210-4.
41. Hulse GK, Stalenberg V, McCallum D, Smit W, O'Neil G, Morris N, et al. Histological changes over time around the site of sustained release naltrexone-poly(DL-lactide) implants in humans. *J Control Release*. 2005;108(1):43-55.
42. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45(1):89-121.
43. Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):52-77.
44. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54 Suppl 1:S77-98.
45. Singh AN, Srivastava S, Jainar AK. Pharmacotherapy of chronic alcoholism: a review. *Drugs Today (Barc)*. 1999;35(1):27-33.
46. Kogan A, Shalev DE, Raviv U, Aserin A, Garti N. Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions. *J Phys Chem B*. 2009;113(31):10669-78.
47. Lopes LB, Brophy CM, Furnish E, Flynn CR, Sparks O, Komalavilas P, et al. Comparative study of the skin penetration of protein transduction domains and a conjugated peptide. *Pharm Res*. 2005;22(5):750-7.
48. Phelps J, Bentley MV, Lopes LB. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;87(2):391-8.
49. Milak S, Zimmer A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2015;478(2):569-87.
50. Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2010;15(23–24):1032-40.
51. Cremones CP, Bentley MVLB, Lara MG. Caracterização do intumescimento de sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar de monoleína e água contendo polihexametilenobiguanida. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2013;34(4):545-553.

52. Boyd BJ, Whittaker DV, Khoo S-M, Davey G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;309(1–2):218-26.
53. Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci*. 2011;100(4):1444-55.
54. Kiefer F, Jahn H, Otte C, Demiralay C, Wolf K, Wiedemann K. Increasing leptin precedes craving and relapse during pharmacological abstinence maintenance treatment of alcoholism. *J Psychiatr Res*. 2005;39(5):545-51.
55. Otte A, Báez-Santos YM, Mun EA, Soh BK, Lee YN, Park K. The in vivo transformation and pharmacokinetic properties of a liquid crystalline drug delivery system. *Int J Pharm*. 2017.
56. Aboofazeli R, Barlow DJ, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions I. Total intensity light scattering. *AAPS PharmSci*. 2000;2(2):E13.
57. Kulkarni CV. Nanostructural studies on monoelaidin-water systems at low temperatures. *Langmuir*. 2011;27(19):11790-800.
58. Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2013;49(2):175-86.
59. Roozen HG, de Waart R, van den Brink W. Efficacy and tolerability of naltrexone in the treatment of alcohol dependence: oral versus injectable delivery. *Eur Addict Res*. 2007;13(4):201-6.
60. Williams KL, Broadbridge CL. Potency of naltrexone to reduce ethanol self-administration in rats is greater for subcutaneous versus intraperitoneal injection. *Alcohol*. 2009;43(2):119-26.
61. Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of Paclitaxel: impact of the monoglyceride. *Pharm Res*. 2013;30(3):694-706.
62. Pepe D, McCall M, Zheng H, Lopes LB. Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent. *J Pharm Sci*. 2013;102(5):1476-87.
63. Pepe D, Phelps J, Lewis K, Dujack J, Scarlett K, Jahan S, et al. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. *Int J Pharm*. 2012;434(1-2):420-8.

64. Vicentini FT, Vaz MM, Fonseca YM, Bentley MV, Fonseca MJ. Characterization and stability study of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(1):47-55.
65. Rosenholm JB. Phase equilibriums, self-assembly and interactions in two-, three- and four medium-chain length component systems. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;205:9-47.
66. Garti N, Yaghmur A, Leser ME, Clement V, Watzke HJ. Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. *J Agric Food Chem.* 2001;49(5):2552-62.
67. Moghimipour E, Salimi A, Eftekhari S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(1):63-71.
68. Moghimipour E, Salimi A, Leis F. Preparation and evaluation of tretinoin microemulsion based on pseudo-ternary phase diagram. *Adv Pharm Bull.* 2012;2(2):141-7.
69. Moghimipour E, Salimi A, Karami M, Isazadeh S. Preparation and characterization of dexamethasone microemulsion based on pseudoternary phase diagram. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2013;8(3):105-12.
70. Kawakami K, Yoshikawa T, Hayashi T, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. II. In vivo study. *J Control Release.* 2002;81(1-2):75-82.
71. Yaghmur A, Rappolt M, Østergaard J, Larsen C, Larsen SW. Characterization of bupivacaine-loaded formulations based on liquid crystalline phases and microemulsions: the effect of lipid composition. *Langmuir.* 2012;28(5):2881-9.
72. Khodaverdi E, Tekie FS, Mohajeri SA, Ganji F, Zohuri G, Hadizadeh F. Preparation and investigation of sustained drug delivery systems using an injectable, thermosensitive, in situ forming hydrogel composed of PLGA-PEG-PLGA. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(2):590-600.
73. Zhang R, Wood AL, Enfield CG, Jeong SW. Stochastic analysis of surfactant-enhanced remediation of denser-than-water nonaqueous phase liquid (DNAPL)-contaminated soils. *J Environ Qual.* 2003;32(3):957-65.
74. Dubey R, Martini LG, Christie M. Dual-acting subcutaneous microemulsion formulation for improved migraine treatment with zolmitriptan and diclofenac: formulation and in vitro-in vivo characterization. *AAPS J.* 2014;16(2):214-20.
75. Aboofazeli R, Barlow D, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS PharmSci.* 2000;2(3):E19.

76. Fong WK, Hanley T, Boyd BJ. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo. *J Control Release*. 2009;135(3):218-26.
77. Lee KW, Nguyen TH, Hanley T, Boyd BJ. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. *Int J Pharm*. 2009;365(1-2):190-9.
78. Zeng Z, Zhou G, Wang X, Huang EZ, Zhan X, Liu J, et al. Preparation, characterization and relative bioavailability of oral elemene o/w microemulsion. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:567-72.
79. Wall ME, Perez-Reyes M, Brine DR, Cook CE. Naltrexone disposition in man after subcutaneous administration. *Drug Metab Dispos*. 1984;12(6):677-82.
80. Xiao Q, Xiao C. Preparation and Characterization of Silica-Coated Magnetic-Fluorescent Bifunctional Microspheres. *Nanoscale Res Lett*. 2009;4(9):1078-84.
81. Patel D, Sawant KK. Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs. *Curr Drug Deliv*. 2009;6(4):419-24.
82. Ornelas M, Azenha M, Pereira C, Silva AF. Naproxen-imprinted xerogels in the micro- and nanospherical forms by emulsion technique. *J Chromatogr A*. 2015;1422:43-52.
83. Araújo LM, Thomazine JA, Lopez RF. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;75(1):48-55.
84. Andrióli, Tatiana Costa. Marcourakis, Tania (orient). Pacheco, Larissa Helena Lôbo Tôrres (orient). *Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal : predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência*. São Paulo, 2016. 116 p.
85. Niczinger NA, Hajdú M, Budai L, Dredán J, Antal I. [Importance of the HLB-value in drug technology]. *Acta Pharm Hung*. 2011;81(4):151-63.
86. Chorilli M, Prestes, Paula Souza, Rigon, Roberta Balansin,, Leonardi GR, Chiavacci, Leila Aparecida, & Scarpa,, (2009). MV. *Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano*. 2009.
87. Ali KA, Mukherjee B, Bandyopadhyay AK. Formulation development and in vitro evaluation of solidified self-microemulsion in the form of tablet containing atorvastatin calcium. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(11):1742-9.
88. Alkrad JA, Mrestani Y, Neubert RH. Development and characterization of microemulsions containing hyaluronic acid. *Eur J Pharm Sci*. 2016.

89. Krauel K, Girvan L, Hook S, Rades T. Characterisation of colloidal drug delivery systems from the naked eye to Cryo-FESEM. *Micron*. 2007;38(8):796-803.
90. Dubey R, Martini LG. Prolonged-release injectable microemulsions: Opportunities for pain treatment. *Drug Development and Delivery*. 2014;14(5):44-9.
91. Drummond CJ, Fong C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1999;4(6):449-56.
92. Caboi F, Amico GS, Pitzalis P, Monduzzi M, Nylander T, Larsson K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. *Chem Phys Lipids*. 2001;109(1):47-62.
93. Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D, Buri P. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000;26(8):809-20.
94. Lopes LB, Ferreira DA, de Paula D, Garcia MT, Thomazini JA, Fantini MC, et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. *Pharm Res*. 2006;23(6):1332-42.
95. Bouchemal K, Briançon S, Couenne F, Fessi H, Tayakout M. Stability studies on colloidal suspensions of polyurethane nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6(9-10):3187-92.
96. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm*. 2004;280(1-2):241-51.
97. Ke WT, Lin SY, Ho HO, Sheu MT. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *J Control Release*. 2005;102(2):489-507.
98. Cichewicz A, Pacleb C, Connors A, Hass MA, Lopes LB. Cutaneous delivery of  $\alpha$ -tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(6):817-26.
99. Todosijević MN, Savić MM, Batinić BB, Marković BD, Gašperlin M, Ranđelović DV, et al. Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance. *Int J Pharm*. 2015;496(2):931-41.
100. Carvalho F, Sarmiento, VH, Chiavacci, LA, Barbi, MS G, MP. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for, style="mso-bidi-font-style: crozJPSi, 2010 n, 2367-2374.

101. Diat O, Roux, D, Nallet, F. Effect of shear on a lyotropic lamellar phase, *J Phys II* 1993, 3(1427-1452).
102. de Silva, JP P, AS, Pansu, B, Davidson, P, Kasmi, B, Petermann, D, Asnacios, S, Meneau F, Imperor, M. Rheological behaviour of polyoxometalate-doped lyotropic lamellar phases. *Eur Phys J E Soft Matter*, 2011 34 (1): 1-9.
103. Amar-Yuli I, Wachtel E, Shalev DE, Aserin A, Garti N. Low viscosity reversed hexagonal mesophases induced by hydrophilic additives. *J Phys Chem B*. 2008;112(13):3971-82.
104. Feher A, Urban E, Eros I, Szabo-Revesz P, Csanyi E. Lyotropic liquid crystal preconcentrates for the treatment of periodontal disease. *Int J Pharm*. 2008;358(1-2):23-6.
105. Lara MG, Bentley MV, Collett JH. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. *Int J Pharm*. 2005;293(1-2):241-50.
106. Siepmann J, Peppas NA. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *Int J Pharm*. 2011;418(1):6-12.
107. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug release from lipid dosage forms. *Int J Pharm*. 2011;418(1):42-53.
108. Siepmann J, Siepmann F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release*. 2012;161(2):351-62.
109. Yaghmur A, Glatter O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;147-148:333-42.
110. Nilsson C, Edwards K, Eriksson J, Larsen SW, Østergaard J, Larsen C, et al. Characterization of oil-free and oil-loaded liquid-crystalline particles stabilized by negatively charged stabilizer citrem. *Langmuir*. 2012;28(32):11755-66.
111. Helledi LS, Schubert L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001;27(10):1073-81.
112. Fong W-K, Hanley T, Boyd BJ. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*. 2009;135(3):218-26.
113. Patel N, Lalwani D, Gollmer S, Injeti E, Sari Y, Nesamony J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Prog Biomater*. 2016;5:117-33.
114. Lopes CM, Lobo JMS, Costa PF, farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev. Bras. Cienc. Farm. SP*, v. 41, n. 2, p. 143-154,2005. J.



115. Rossi NA, Reid,L.D. Affective states associated with morphine injections. *Physiol.Pshicol.v4.p.269-276.1976.*
116. Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc. 2006;1(4):1662-70.*
117. van der Kooy D, O'Shaughnessy M, Mucha RF, Kalant H. Motivational properties of ethanol in naive rats as studied by place conditioning. *Pharmacol Biochem Behav. 1983;19(3):441-5.*
118. Castro, LA, Baltieri, DA. The pharmacologic treatment of the alcohol dependence. *Rev. Bras. Psiquiatr. São Paulo , v. 26, supl. 1, p. 43-46, May 2004.*
119. Nascimento, Priscila Fernandes Carrara do. Efeitos da exposição ao etanol em camundongos adolescentes e adultos:comportamentos relacionados à recompensa, sensibilização comportamentale o papel dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico. 2011. Tese(Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. doi:10.11606/T.42.2011.tde-09022012-144606. Acesso em: 2017-07-3
120. Spragg, S.D.S. Morphine addiction in chimpanzees. *Comp.Psychol.Monogr. v.15, p.132,1940.*
121. Ray LA, Hutchison KE. Effects of naltrexone on alcohol sensitivity and genetic moderators of medication response: a double-blind placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry. 2007;64(9):1069-77.*
122. Ray LA, Chin PF, Miotto K. Naltrexone for the treatment of alcoholism: clinical findings, mechanisms of action, and pharmacogenetics. *CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010;9(1):13-22.*
123. Younger, J. & Mackey, S. Fibromyalgia Symptoms Are Reduced by Low-Dose Naltrexone: A Pilot Study. *Pain Medicine. Vol 10.N.4 (2009).*
124. Simith, J.P. et al. Low-Dose Naltrexone Therapy Improves Active Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol 2007102:820–828.*
125. Greenway, F.J. et al. Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *www.thelancet.com Vol376 August 21, 2010. p.595-605.*
126. Bruce A. C. Cree, Elena Kornyeveva, and Douglas S. Goodin, Pilot trial of low-dose naltrexone and quality of life in multiple sclerosis. *Ann Neurol.2010 Aug68(2):145-50.*