

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FÁRMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

FABIANA VAZ TOSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS CONTENDO PACLITAXEL: ESTUDOS DE
PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Goiânia
2014

FABIANA VAZ TOSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS CONTENDO PACLITAXEL: ESTUDOS DE
PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte do requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Stephânia Fleury Taveira.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima.

Goiânia
2014

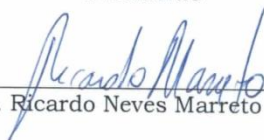
Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 29 de janeiro de 2014, pela mestranda Fabiana Vaz Tosta.

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Stephânia Fleury Taveira (FF/UFG)
Presidente



Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto (FF/UFG)



Prof. Dr. Flávio Marques Lopes (FF/UFG)

AGRADECIMENTO

Á Deus pela proteção em todos os momentos por permitir a realização de mais um projeto.

A minha mamãe pelo incentivo incondicional por me ensinar que para vencer na vida é preciso ousar.

A minha irmã, cunhado e sobrinhos pela atenção e carinho que sempre tiveram comigo, apesar do 'debito' de atenção para com vocês.

A Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima pela confiança e oportunidade na realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Stephânia Fleury Taveira pela atenção, dedicação e ensinamentos. Suas críticas e sugestões foram de grande valia. Obrigada por toda ajuda.

A Lígia pela amizade, paciência e grande ajuda, sua colaboração sem dúvida foi vital no decorrer da elaboração deste trabalho.

A Priscila pela amizade e ajuda incondicional.

A Fernanda pela atenção, dedicação, esclarecimento das dúvidas e auxílio na parte burocrática, enfim, por toda ajuda.

A Edna pela espera e paciência além do horário.

Aos estimados colegas do FARMATEC, a convivência com vocês foi uma experiência inesquecível.

A FAPEG pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

O paclitaxel (PTX) é um produto natural extraído da casca do Teixo do Pacífico e possui inúmeras ações antitumorais, inclusive em neoplasias cutâneas. O tratamento tópico do câncer de pele e de lesões pré-cancerígenas é almejado, visto que o tratamento sistêmico possui diversos efeitos colaterais. Entretanto, o PTX precisa ser incorporado em formulações adequadas para que o mesmo penetre no estrato córneo e atinja os tumores cutâneos. As nanopartículas lipídicas apresentam potencial para aumentar a retenção de fármacos no estrato córneo, proporcionando uma liberação controlada e um aumento na absorção percutânea. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo o antineoplásico PTX e avaliar sua permeação cutânea em pele de orelha de suíno em células de difusão vertical tipo “Franz”. A quantificação do paclitaxel PTX foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. As NLS e CLN foram obtidas pelo método de diluição da microemulsão contendo cloreto de cetilpiridínio, behenato de glicerila, triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico, polissorbato 80 e trioleato de sorbitano 85. As partículas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, Pdl, potencial zeta, eficiência de encapsulação, carga de fármaco e recuperação. Os estudos de estabilidade foram realizados por um período de 30 dias com armazenamento a 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Os estudos de permeação cutânea do PTX nas nanopartículas foram realizados em células de difusão tipo “Franz” em pele de orelha de suíno. As NLS obtidas apresentaram tamanho médio entre $314,1 \pm 10,9$ a $335,9 \pm 0,9\text{nm}$. Os CLN obtidos com mais óleo na matriz lipídica (CLN100), apresentaram tamanho médio $270,6 \pm 13,5\text{nm}$. A eficiência de encapsulação dos sistemas obtidos foi superior a 90% quando 3,75% de PTX foi adicionado as formulações. Nos estudos de estabilidade observou-se uma tendência no aumento do tamanho e Pdl das partículas ao longo do período de armazenamento, porém estas diferenças não são estatisticamente significativas. Os CLN100 aumentaram aproximadamente 3 vezes a quantidade de fármaco no estrato córneo (EC) quando comparados com a administração do fármaco não encapsulado e, ainda, aumentaram 1,5 vezes a quantidade de PTX no EC em relação à aplicação tópica das demais partículas lipídicas. Desta forma, as partículas lipídicas parecem ser sistemas promissores para aplicação tópica do PTX.

Palavras chaves: Nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, câncer de pele, paclitaxel.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is a natural product extracted from the bark of the Pacific Yew and has numerous antitumor actions, including skin cancers. The topical treatment of skin and pre-cancerous lesions cancer is desired, since the systemic treatment has many side effects. However, PTX to be incorporated into formulations suitable for it to penetrate the stratum corneum and skin tumors reached. Lipid nanoparticles have potential to increase drug retention in the stratum corneum, thus providing controlled release and great percutaneous absorption. Within this context, the aim of this study was to develop and characterize solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) containing the antineoplastic PTX and evaluate its permeation into the pig ear skin in vertical diffusion cells type "Franz". Quantification of PTX paclitaxel was performed by high performance liquid chromatography. The NLS and CLNs were obtained by the method of dilution of the microemulsion containing cetylpyridinium chloride, glyceryl behenate, triglycerides of caprylic / capric acid, polysorbate 80 and sorbitan trioleate 85. The particles were characterized by medium size, Pdl, zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and recovery. Stability studies were carried out for a period of 30 days with storage at 4 °C (± 2 °C). The skin permeation studies of the PTX nanoparticles were conducted in "Franz" type diffusion cells in pig ear skin. The NLS obtained showed average size of 314.1 ± 10.9 to 335.9 ± 0.9 nm. The CLN obtained with more oil in the lipid matrix (CLN100) showed average size 270.6 ± 13.5 nm. The encapsulation efficiency of the systems obtained was above 90% when 3.75% was added PTX formulations. The stability studies revealed a trend in increasing the size of the particles Pdl along the storage period, but these differences are not statistically significant. The CLN100 increased about 3 times the amount of drug in the stratum corneum (SC) as compared to the administration of unencapsulated drug and also increased by 1.5 times the amount of PTX in the SC in relation to the topical application of other lipid particles. Thus, the lipid particles appear to be promising systems for topical application of PTX.

Keywords: Solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, skin cancer, paclitaxel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação ilustrativa da estrutura da pele.....	14
Figura 2- Esquema representativo de estágios de diferenciação celular da epiderme.....	15
Figura 3- Estrutura química do paclitaxel.....	17
Figura 4- Representação esquemática das nanopartículas lipídicas.....	19
Figura 5- Representação esquemática da organização e acomodação do fármaco em nanopartículas lipídicas.....	20
Figura 6- Representação esquemática do processo de obtenção dos nanossistemas.....	22
Figura 7- Vias de permeação do fármaco através do estrato córneo (via transcelular, via intercelular) e dos apêndices cutâneos.....	23
Figura 8- Representação dos mecanismos de interação das nanopartículas com a pele.....	25
Figura 9- Representação esquemática da aplicação da técnica de “ <i>tape stripping</i> ” para determinação da quantidade de fármaco penetrado na pele.....	28
Figura 10- Representação esquemática do processo de obtenção das PTX-NLS e PTX-CLN pelo método de diluição da microemulsão.....	31
Figura 11- Célula de difusão vertical passiva tipo “Franz” utilizada para estudos de permeação cutânea.....	34
Figura 12- Perfil cromatográfico do PTX gerado a partir da análise do fármaco em metanol na concentração 100µg/mL.....	36
Figura 13- Curva analítica do PTX em metanol na concentração de 1 a 80µg/mL e coeficiente de variação.....	37
Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir do estudo das diferentes camadas da pele (EC e PR) sem fármaco comparado como o tempo de retenção do PTX em solução metanólica.....	38
Figura 15- Cromatogramas obtidos a partir da análise das NLS e CLN sem fármaco e solução de PTX nas mesmas condições experimentais.....	38
Figura 16- Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100 recém preparadas (dia 0) e após 7, 15 e 30 dias de armazenamento a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	44

Figura 17- Eficiência de encapsulação em % do PTX das formulações PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100 recém-preparadas e após 7, 15 e 30 dias de armazenamento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 46

Figura 18- Quantidade de PTX retida no EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 horas do ensaio de permeação do fármaco não encapsulado (fármaco livre – FL) e encapsulado nas partículas lipídicas (PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100)..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade dos componentes utilizados na obtenção das nanopartículas.....	30
Tabela 2- Recuperação do PTX nas diferentes camadas da pele.....	39
Tabela 3- Caracterização das nanopartículas lipídicas sem fármaco quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta.....	40
Tabela 4- Caracterização das PTX-NLS quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, recuperação (REC%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%).....	41
Tabela 5- Caracterização das nanopartículas lipídicas contendo 3,75% de PTX quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, recuperação (REC%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%).....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

PTX	Paclitaxel
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
FDA	Food and Drug Administration
5-FU	5 Fluoracil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
EC	Estrato Córneo
PR	Pele Remanescente
Pdl	Índice de Polidispersividade
EE%	Eficiência de Encapsulação
REC%	Recuperação
CF%	Carga de Fármaco
TFA	Ácido Triflúor Acético
CPC	Cloreto de Cetilpiridínio
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PVDF	Membrana de Difluoreto de Polivinilideno
FT	Fármaco Total
FA	Fármaco Adicionado
FL	Fármaco Livre
ML	Massa de Lipídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 ESTRUTURA DA PELE, TUMORES CUTÂNEOS E OS TRATAMENTOS USUAIS	13
2.2 PACLITAXEL	17
2.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	19
2.4 PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS	26
4.1.1 Substâncias e reagentes.....	26
4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos.....	27
4.2 MÉTODO	27
4.2.1 Metodologia analítica para quantificação do PTX por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	27
4.2.2 Seletividade do método analítico – análise dos possíveis interferentes da matriz biológica e dos componentes das nanopartículas	28
4.2.3 Estudos de recuperação do PTX nas camadas da pele.....	29
4.3 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	29
4.3.1 Obtenção dos sistemas lipídicos nanoestruturados	29
4.3.2 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreador lipídico nanoestruturado (CLN).....	31
4.3.2.1 Avaliação do diâmetro médio e distribuição do tamanho	31
4.3.2.2 Avaliação do potencial zeta.....	32
4.3.2.3 Recuperação do fármaco das nanopartículas desenvolvidas	32
4.3.2.4 Eficiência de encapsulação das NLS e CLN contendo PTX	32
4.3.2.5 Carga de fármaco.....	33
4.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DA NLS CONTENDO PACLITAXEL	33
4.5 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	34

4.5.1 A pele utilizada nos experimentos <i>in vitro</i>	34
4.5.2 Permeação cutânea	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 QUANTIFICAÇÃO DO PTX POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	35
5.1.1 Linearidade	36
5.1.2 Seletividade- Análise dos possíveis interferente da matriz biológica e dos componentes das nanopartículas	37
5.2 RECUPERAÇÃO DO PTX NAS DIFERENTES CAMADAS DA PELE	39
5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS ...	39
5.3.1 Obtenção das NLS e CLN sem fármaco	39
5.3.2 Obtenção das NLS e diferentes CLN com PTX	41
5.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS NLS E CLN CONTENDO PACLITAXEL.....	43
5.5 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DO PTX EM DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	46
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O paclitaxel (PTX) é um produto natural extraído da casca do teixo do Pacífico, com comprovada ação antitumoral em diferentes linhagens celulares, inclusive em neoplasias cutâneas (ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; SINGLA; GARG; AGGARWAL, 2002), como melanoma (WIERNIK et al., 1987; ROWINSKY; DONEHOWER, 1995; SHIM et al., 2007) e melanomas metastáticos (JAGETIA; NAYAK, 1996). Para o tratamento do câncer de pele o PTX é administrado pela via endovenosa e tem causado vários efeitos colaterais como neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hipersensibilidade (TRICKLER; NAGVEKAR; DASH, 2008).

Uma estratégia para contornar estes inconvenientes é o tratamento tópico e localizado do câncer de pele, que diminuiria ou até evitaria efeitos colaterais observados com a sua administração sistêmica. Todavia, o principal desafio do tratamento tópico é a penetração do fármaco através do estrato córneo (EC), principal barreira à permeação de substâncias na pele (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; KUMAR; RANDHAWA, 2013).

O EC representa uma barreira à penetração de substância na pele (MOSER et al., 2001; BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002). Fatores como idade, fluxo sanguíneo, metabolismo podem influenciar as suas propriedades (BUCK, 2004). Além disso, características dos fármacos como tamanho molecular e coeficiente de difusão interferem na sua absorção percutânea (TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

Assim, é necessário que o fármaco esteja em formulação que favoreça sua penetração cutânea para as camadas mais profundas da pele, onde os tumores se localizam. O desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados pode representar uma opção às formas farmacêuticas tradicionais (MEHNERT; MÄDER, 2001; TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Os nanocarreadores são sistemas de liberação promissores, utilizados para administração de fármacos por várias vias de administração, inclusive tópica (NSEREKO; AMIJI, 2002).

Dentre os sistemas lipídicos estudados, podemos citar as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Ambos os sistemas são carreadores de tamanho nanométrico, cuja matriz sólida pode

promover proteção dos fármacos encapsulados, além de possibilitar o controle de liberação dos mesmos (ÜNER, 2006; OBEIDAT et al., 2010).

As NLS são formadas por lipídeo sólido a temperatura ambiente (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Os CLN são formados por misturas de lipídeos sólidos e líquidos a temperatura ambiente apresentando uma matriz lipídica mais desorganizada com capacidade de acomodar maior quantidade de fármaco (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; OBEIDAT et al., 2010). As partículas lipídicas são sistemas promissores para aplicação tópica, visto que sua constituição lipídica favorece a interação com o EC e a permeação do fármaco para as camadas mais profundas da pele (BORGIA et al., 2005; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; KÜCHLER et al., 2010). Além disso, pode-se modular a superfície das partículas para favorecer maior interação entre o nanossistema e a pele. Por exemplo, partículas com carga positiva podem interagir com as cargas negativas da pele, aumentando a retenção dos fármacos na pele (EL-SHABOURI, 2002; PEIRA et al., 2008; TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

Portanto, a encapsulação do PTX em nanopartículas lipídicas para administração tópica parece ser uma alternativa para inúmeros tratamentos tópicos, como de lesões pré-cancerígenas e tumores cutâneos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a permeação cutânea das NLS e CLN contendo PTX.

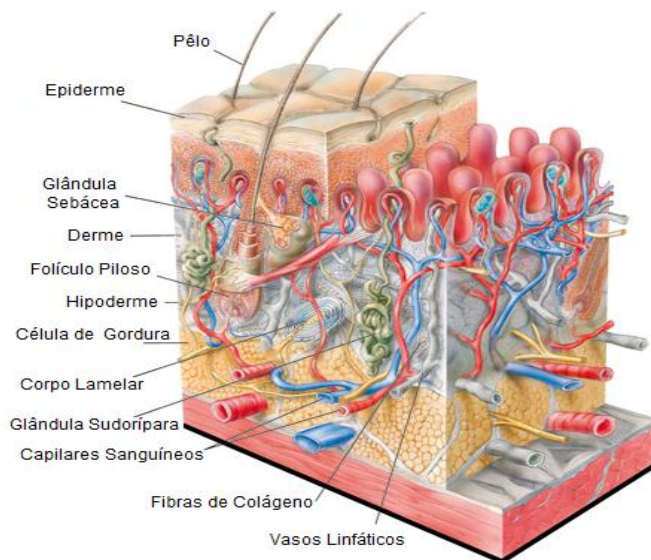
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DA PELE, TUMORES CUTÂNEOS E OS TRATAMENTOS USUAIS

A pele é um órgão vital, representando 15% do peso corpóreo, possuindo funções específicas tais como: proteção contra ação de agentes externos, barreira a perda de água, funções sensoriais e imunológicas (KOHEN; GATI, 2000; BAROLI, 2010; PROW et al., 2011; ALEXANDER et al., 2012; INCA, 2013). Sua estrutura é composta pela epiderme (camada superior), derme (camada intermediária) e

hipoderme ou camada gordurosa subcutânea (SKIN CARE FÓRUM, 2003; BAROLI, 2010; BOLZINGER et al., 2012; GORDON, 2013) (Figura 1).

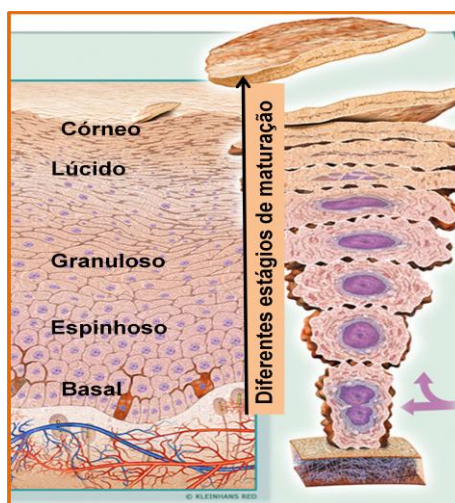
Figura 1- Representação ilustrativa da estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de Skin Care Forum, 2011.

A hipoderme é constituída por tecido adiposo e conjuntivo, tendo como função a proteção contra choques mecânicos e reserva de gordura (BAROLI, 2010; GORDON, 2013). A derme é constituída por tecido conjuntivo, possuindo diversidade de vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (MARJUKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999; MOSER et al., 2001; BAROLI, 2010). A epiderme é a camada mais externa, avascular, sendo constituída de diferentes camadas ou estratos em estágios de diferenciação celular, denominados de estrato basal ou germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (PROW et al., 2011; GORDON, 2013) (Figura 2). À medida que estas células migram para a superfície tornam-se queratinizadas, sendo denominadas de corneócitos, que funcionam como uma barreira à penetração de substâncias na pele (MARJUKKA SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999; MENON, 2002; BAROLI, 2010).

Figura 2- Esquema representativo de estágios de diferenciação celular da epiderme.



Fonte: Adaptado de Skin Care Forum, 2011.

Dentre as doenças que acometem a pele, está o câncer de pele que afeta principalmente a população caucasiana (DE CASTRO, 2007; TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Os tumores cutâneos apresentam basicamente três formas: melanoma maligno, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (DE CASTRO, 2007; GORDON, 2013), sendo que, o basocelular e espinocelular são classificados como não-melanômicos, e o basocelular é o mais incidente (75% dos casos) (TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

Existem tratamentos bem definidos para estes tumores, como curetagem, cirurgias, crioterapia e quimioterapia (MIDENA et al., 2000; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Todavia, estes tratamentos podem acarretar em inflamações, dores e cicatrizes (FESTA NETO, 2002). Quando possível, o tratamento tópico localizado é preferido.

O tratamento tópico e localizado com fármacos antineoplásicos pode ser uma alternativa terapêutica, visto que reduzem ou até evitam os efeitos colaterais, melhoram aderência do paciente ao tratamento e evitam cirurgias e cicatrizes, assim, o desafio é fazer com que o fármaco penetre na pele em quantidade significativa para eliminar as células tumorais (TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

As terapias atuais utilizadas para o tratamento tópico do câncer de pele não melanômico, aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) são o 5- fluoracil (5-FU) e imiquimod.

Desde 1970 aprovado pelo FDA o 5-FU e tem sido considerado o tratamento tópico de escolha para o tratamento da queratose actínica (TAVEIRA; LOPEZ, 2011). O 5-FU é um antimetabolito antineoplásico que interrompe a síntese de DNA, inibindo a enzima timidilato sintetase, impedindo a síntese da pirimidina conseqüentemente a síntese do DNA (MIDENA et al., 2000; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010), dentre as formas farmacêuticas disponíveis para veiculação tópica estão os cremes (0,5%, 1% e 5%) e soluções (1%, 2% e 5%) (TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Este medicamento tem demonstrado alguns efeitos colaterais como intensa inflamação local, eritema, descamação, o que resulta na desistência do tratamento por parte dos pacientes (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

O imiquimod é um imunomodulador (modificador da resposta imune), devido a ativação da função imune (FESTA NETO, 2002; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010). O mecanismo exato de sua atividade antitumoral é ainda desconhecido, mas acredita-se na indução de citocinas e intensificação da atividade citolítica mediada por células (FESTA NETO, 2002). Sua forma farmacêutica aprovada pelo FDA é em creme (5%) para tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular superficial (TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Reações cutâneas locais, tais como dores, descamação, dermatite, edema, irritação, ressecamento, ardor, e ulceração estão relacionadas a aplicação deste fármaco (LOVE; BERNHARD; BORDEAUX, 2009; GALICZYNSKI; VIDIMOS, 2011; BAHNER; BORDEAUX, 2013).

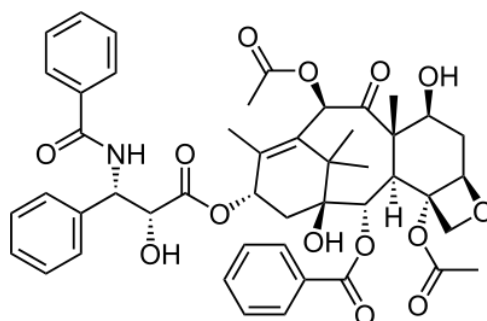
Dentro deste contexto, é notório que os tratamentos tópicos locais ainda são poucos e, novos tratamentos precisam ser estudados e avaliados, na tentativa de fornecer terapias tópicas eficazes, seguras e confortáveis para o paciente.

Atualmente, alguns estudos têm focado também no tratamento de lesões malignas, pré-cancerígenas, que estão associadas ao risco de mutações para cânceres não-melanômicos. Nestes casos, o tratamento tópico pode ser mais eficiente, evitando que a lesão se transforme em uma neoplasia invasiva. Para tanto, os taxanos, como o paclitaxel, tem sido estudados para tratamentos destas lesões cutâneas pré-cancerígenas (PAOLINO et al., 2012) e, resultados satisfatórios têm sido obtidos.

2.2 PACLITAXEL

O paclitaxel (PTX) é um antineoplásico, diterpenoide obtido da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), apresenta fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e peso molecular de 853Da. Sua estrutura química está representada na Figura 3 (WIERNIK et al., 1987; CORRÊA, 1995; KINGSTON, 2001; NSEREKO; AMIJI, 2002; PELTIER et al., 2006; YANG et al., 2013).

Figura 3- Estrutura química do paclitaxel.



Fonte: Knox et al., 2011.

Trata-se de um fármaco altamente lipofílico, insolúvel em água, apresenta logP igual a 3, e em condições alcalina forte seu pKa é -1, já em condições ácido forte pKa é 10,36 (KNOX et al., 2011).

O PTX é utilizado no tratamento de tumores como melanoma (WIERNIK et al., 1987; CORRÊA, 1995; KINGSTON, 2001; NSEREKO; AMIJI, 2002), pulmão, ovário e mama (WIERNIK et al., 1987; CORRÊA, 1995; NSEREKO; AMIJI, 2002; SINGLA; GARG; AGGARWAL, 2002; FENG et al., 2007; YANG et al., 2013; YARDLEY, 2013).

É um fármaco inibidor mitótico, ou seja, age inibindo o crescimento celular por estabilização dos microtúbulos. Sendo assim, o PTX liga-se a tubulina (ligação não covalente), impedindo a despolarização necessária à replicação celular, bloqueando, desta forma, o processo de divisão celular (WIERNIK et al., 1987; RAO et al., 1994; CORRÊA, 1995; NSEREKO; AMIJI, 2002; SOUZA, 2004; FENG et al., 2007; KINGSTON, 2007; YARDLEY, 2013). Alguns estudos têm demonstrado que a

administração tópica de taxanos e seus derivados possuem efetividade no tratamento da queratose actínica e do carcinoma espino-celular (PAOLINO et al., 2012).

O PTX, devido as suas propriedades de inibição da divisão celular, tem sido indicado para tratamento de doenças cutâneas hiperqueratóticas, como é o caso da psoríase (KILFOYLE et al., 2012). Entretanto, sua baixa solubilidade em água (logP igual a 3) e alto peso molecular 853Da limitam o seu uso na clínica (KILFOYLE et al., 2012). Isto porque o PTX se acumula preferencialmente no estrato córneo (EC), não atingindo as demais camadas da pele (PAOLINO et al., 2012). Sua lipofilicidade também dificulta sua administração por outras vias. No caso da administração pela via endovenosa, o PTX (Taxol[®]) é administrado com uma mistura de óleo de rícino polioxietilado e álcool desidratado (Cremophor[®]) que pode provocar algumas reações como hipersensibilidade, letargia, dificuldade para respirar, nefrotoxicidade, entre outros (PELTIER et al., 2006; YANG et al., 2013; YARDLEY, 2013).

O Abraxane[®] é uma nova forma de apresentação do PTX, na qual o fármaco se encontra ligado à partícula de albumina com tamanho médio de aproximadamente 130nm. O pó desta partícula pode ser suspenso em soro fisiológico, evitando o uso do Cremophor[®], reduzindo os efeitos relacionados à toxicidade do fármaco (GREEN et al., 2006; YARDLEY, 2013).

Na tentativa de solucionar os problemas de solubilidade e toxicidade, novas alternativas estão sendo buscadas para a administração deste fármaco, principalmente para sua veiculação tópica. Até o presente momento, alguns poucos nanossistemas foram propostos para administração tópica do PTX. Um dos trabalhos encapsulou o fármaco em etossomas, vesículas lipídicas ultraflexíveis, visando o tratamento tópico da queratose actínica (PAOLINO et al., 2012). O outro estudo propõe o desenvolvimento de tirosferas de PTX (nanosferas de tirosina) para o tratamento tópico de doenças hiperqueratósicas, como a psoríase (KILFOYLE et al., 2012).

Existem, atualmente, inúmeros sistemas coloidais que favorecem a penetração de fármacos nas camadas da pele. Dentre eles, as nanopartículas lipídicas podem ser sistemas muito promissores para este fim (YANG et al., 2013).

2.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

As nanopartículas lipídicas são sistemas que apresentam diâmetro nanométrico, são compostas por uma matriz constituída de lipídeos que estão sólidos a temperatura ambiente e corporal, envoltos por agentes tensoativos e/ou co-tensoativos (MAIA; MEHNERT; SCHAFER-K, 2000; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012). Este núcleo sólido é que confere menor mobilidade do fármaco incorporado, promovendo proteção do componente ativo contra possíveis degradações (OLBRISH et al., 2001; WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012; KUMAR; RANDHAWA, 2013). Além disso, esta matriz sólida pode controlar a velocidade de liberação do fármaco (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2012) (Figura 4).

Figura 4- Representação esquemática das nanopartículas lipídicas.



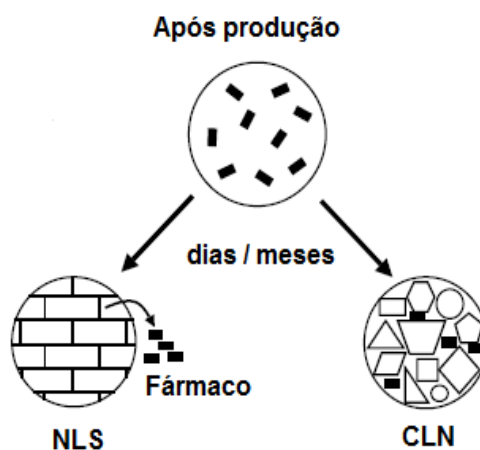
Fonte: Maione-Silva, 2011.

As nanopartículas mais comumente encontradas são as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). A diferença básica entre estes sistemas é que as NLS são constituídas por lipídeos sólidos e os CLN são constituídos por mistura de diferentes lipídeos, normalmente lipídeos sólidos e líquidos (óleos) (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; ÜNER, 2006; BAROLI, 2010). A utilização de lipídeos sólidos com tamanho de cadeias variadas ou mistura de lipídeos sólidos e líquidos promove a formação de matrizes lipídicas mais desorganizadas (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; ÜNER, 2006). Os CLN possuem a matriz mais desorganizada, podendo acomodar mais fármaco, e

mantê-lo encapsulado por mais tempo ao longo do período de estocagem (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; HU et al., 2005; BAROLI, 2010).

Dependendo do tipo de lipídeo utilizado na produção das nanopartículas lipídicas, pode-se observar a formação de matrizes mais organizadas, o que ocasionaria a acomodação de uma quantidade menor de fármaco nesta matriz. Segundo alguns autores, o aumento na organização da matriz também pode ocorrer durante o período de estocagem em que, os lipídeos se organizam e expulsa o fármaco incorporado como demonstrado na Figura 5, por isso a necessidade do uso de lipídeos que não formem matrizes altamente organizadas (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004). Apesar destas generalizações serem amplamente utilizados na literatura, ainda existem muitas divergências sobre a estabilidade destes sistemas ao longo do tempo, por exemplo, SOUZA et al., 2011, não encontraram diferenças na eficiência de encapsulação entre as NLS e os CLN armazenadas a 4°C por um curto período de estocagem. Sendo assim, muito ainda tem que ser estudado sobre a obtenção e estabilidade destes sistemas.

Figura 5- Representação esquemática da organização e acomodação do fármaco em nanopartículas lipídicas: As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) formam matrizes lipídicas semelhantes a uma parede de tijolos (compacta e organizada) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) possuem uma matriz lipídica mais imperfeita (evitando/ diminuindo a expulsão do fármaco durante o período de estocagem).



Fonte: Adaptado de Muller; Radtke; Wissing, 2002, p. 123.

As NLS e CLN são sistemas muito vantajosos em relação a outros nanocarreadores, podem ser produzidos sem utilização de solventes orgânicos e com facilidade em escala industrial, pois sua composição lipídica torna este sistema biocompatível e biodegradável (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2001; OLBRISH et al., 2001; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; HU et al., 2005).

Para o preparo das nanopartículas lipídicas, diversas técnicas podem ser empregadas. O método de produção pode interferir nas características das partículas, como por exemplo, na morfologia. Dentre os métodos de preparo, pode-se citar a emulsificação/evaporação de solvente, homogeneização sob alta pressão (a quente ou a frio) e a diluição da microemulsão, sendo que este último método foi escolhido para a obtenção das nanopartículas lipídicas no presente trabalho (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA 2012; MEHNERT; MÄDER, 2012).

A técnica da diluição de microemulsão é bastante versátil e, uma de suas vantagens é a produção de pequenos volumes de formulação. Sendo assim, é uma técnica ideal para a etapa de desenvolvimento em laboratório.

Gasco e Antonelli (1993) foram os primeiros a desenvolver e descrever a técnica da diluição da microemulsão. Nesta técnica o passo inicial é a obtenção da microemulsão (sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, translúcido, estabilizada por mistura de tensoativos e co-tensoativos) (FORMARIZ et al., 2005; NEUBERT, 2011). Em seguida, esta microemulsão é gotejada em água gelada (2-5°C) sob agitação. Os lipídeos utilizados na obtenção das nanopartículas encontram-se fundidos e, quando em contato com a água gelada, solidificam-se formando as nanopartículas lipídicas. A proporção entre a microemulsão quente e água gelada é de forma geral de 1:20 a 1:50 (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; ÜNER, 2006; MEHNERT; MÄDER, 2012). Os parâmetros de obtenção das partículas (temperatura da microemulsão, velocidade de agitação e transferência da microemulsão em água gelada) devem ser minuciosamente controlados para garantir a reprodutibilidade do processo de produção (WISSING; KAYSER; MÜLLER 2004, MEHNERT; MÄDER, 2001).

Durante o processo de obtenção dos nanossistemas, o fármaco pode ficar distribuído na partícula de várias formas, uniformemente distribuído na matriz

lipídica, predominantemente no centro da matriz lipídica (liberação lenta), ou ainda, na superfície da nanopartícula (liberação rápida) (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000) (Figura 6).

Figura 6- Representação esquemática do processo de obtenção dos nanossistemas. O número 1 indica o fármaco uniformemente distribuído na matriz lipídica, número 2 fármaco predominantemente no centro da matriz lipídica e número 3 fármaco na superfície da nanopartícula.



Fonte: Adaptado de Müller, Mäder; Gohla, 2000, p.167.

Estas partículas podem encapsular inúmeros fármacos (tanto lipofílicos quanto hidrofílicos) e podem ser administradas por diferentes vias (oral, pulmonar, parenteral - via intramuscular, intravenosa ou subcutânea, tópica e transdérmica) (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; ÜNER; YENER, 2007; MEHNERT; MÄDER, 2012), sendo que, a aplicação tópica e transdérmica têm sido umas das vias mais estudadas.

2.4 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

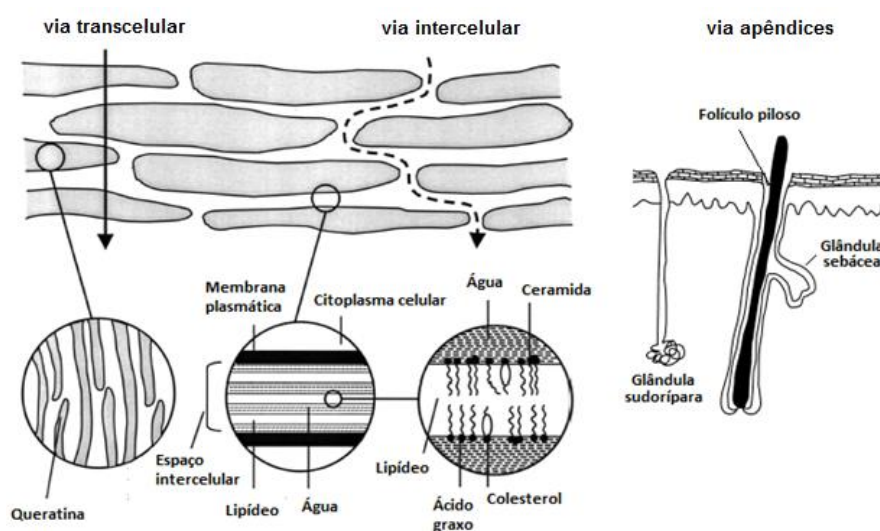
A penetração de substâncias na pele é um desafio. Para que ocorra uma absorção percutânea é necessário que a substância penetre na pele através da camada mais externa o estrato córneo (EC) (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). O mesmo é constituído por queratinócitos e matriz lipídica (TAVEIRA; LOPEZ, 2011). Os corneócitos (queratinócitos) são células mortas

constituídas por queratina embebida em uma matriz lipídica. A matriz lipídica é organizada em bicamadas lamelares, constituída principalmente de triacilgliceróis, ácidos graxos livres, ceramidas, e esteróis (HADGRAFT 1999; ASBIL, MICHNIAK, 2000; TAVEIRA; LOPEZ, 2011).

Assim, a dificuldade do fármaco em penetrar o estrato córneo (estrutura organizada) é devido às bicamadas lipídicas e queratinócitos (BONTÉ et al., 1997; ALEXANDER, 2012), esta estrutura é que permitira o EC apresentar uma característica forte hidrofóbica, fazendo da pele uma barreira física a penetração de substâncias pela a pele (MOSER et al., 2001; BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

O fármaco para penetrar na pele, pode atravessar o EC por duas vias diferentes (via transcelular - através dos corneócitos e da matriz lipídica e pela via intercelular - entre os corneócitos e matriz lipídica), ou ainda atravessar a pele através dos apêndices cutâneos (MOSER et al., 2001; BARRY, 2002; BOLZINGER et al., 2012) (Figura 7).

Figura 7- Vias de permeação do fármaco através do estrato córneo (via transcelular, via intercelular) e dos apêndices cutâneos.

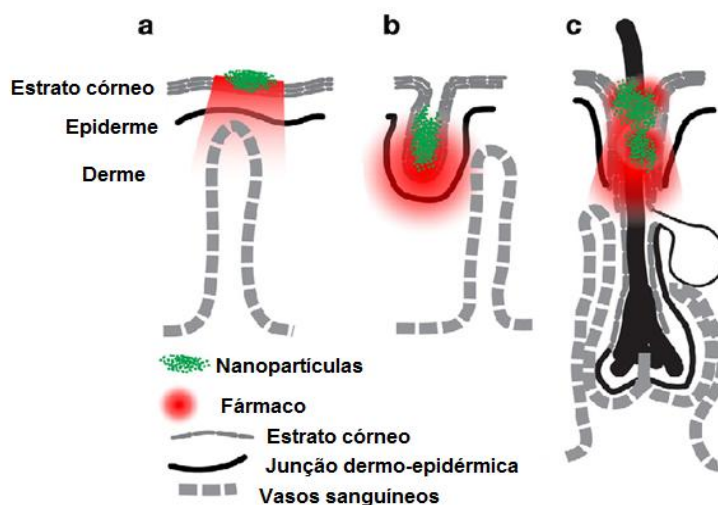


Fonte: Adaptado de Moser et al., 2001.

A absorção de fármacos pela via cutânea depende da natureza química do composto. A substância deve apresentar peso molecular inferior a 0,6KDa, coeficiente de partição de 1 a 3 (adequada solubilidade em água e óleo) e não estar na forma ionizada (NAIK; KALIA; GUY, 2000; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). Poucos fármacos possuem estas características e, por isso, não conseguem penetrar na pele em grandes quantidades se não forem incorporados em formulações tópicas adequadas. Desta forma, as nanopartículas lipídicas têm sido bastante empregadas na veiculação de fármacos para via tópica (LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2001; JOSHI; PATRAVALE, 2008; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

Até o presente momento, acredita-se que estas partículas não transponham o EC íntegras, pois os corneócitos estão muito justapostos e, estas partículas teriam que ter tamanho inferior a 30nm (PROW et al., 2011). Normalmente, as partículas lipídicas possuem tamanhos que variam de 100 a 500nm, dependendo da sua composição e método de produção. Entretanto, inúmeros trabalhos têm relatado o aumento da penetração cutânea de fármacos quando encapsulados nestas partículas. Possivelmente, o tamanho nanométrico permite o seu acúmulo em determinadas regiões da pele, como folículos pilosos e glândulas sebáceas (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; PROW et al., 2011) (Figura 8), favorecendo a liberação gradativa do fármaco encapsulado. Além disso, as partículas lipídicas, em especial, possuem uma composição semelhante à matriz lipídica do EC, o que permite maior interação das mesmas com esta membrana, favorecendo o acúmulo do fármaco nesta camada (Figura 8). Por fim, as partículas lipídicas também podem formar um filme oclusivo na superfície da pele, promovendo a hidratação do EC, resultando em uma estrutura mais fluida que pode proporcionar maior entrada de fármaco na pele (BAROLI, 2010; PROW et al., 2011).

Figura 8- Representação dos mecanismos de interação das nanopartículas com a pele. a) Interação das nanopartículas com o estrato córneo, (b) Acúmulo das nanopartículas nas glândulas e c) Acúmulo das nanopartículas nos folículos pilosos.



Fonte: Adaptado de Prow, et al., 2011, p. 471.

Desta forma, as partículas lipídicas parecem ser sistemas promissores para encapsulação de fármacos, como o PTX, pois podem favorecer a permeação do fármaco na pele até o seu local de ação (MÜLLER, MÄDER, GOHLA, 2000; PROW et al., 2011). Acredita-se que a encapsulação deste fármaco nessas partículas possa aumentar a biodisponibilidade cutânea do mesmo e favorecer os tratamentos tópicos, de lesões pré-cancerígenas (queratose actínica) e tumores cutâneos (carcinoma espinocelular).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo o antineoplásico paclitaxel e avaliar sua permeação cutânea em pele de orelha de suíno em células de difusão vertical tipo “Franz”.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter sistemas nanoestruturados (NLS e CLN) com e sem PTX;
- Obter NLS e CLN com diferentes quantidades de óleo (CLN50 e CLN100) com e sem PTX;
- Caracterizar os sistemas obtidos quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE%), recuperação (REC%) e carga de fármaco (CF%);
- Avaliar a estabilidade dos nanossistemas obtidos contendo fármaco por 7, 15 e 30 dias sob armazenamento a 4°C;
- Avaliar *in vitro* a permeação cutânea do PTX não encapsulado (fármaco livre);
- Avaliar *in vitro* a permeação cutânea do PTX encapsulado nas partículas desenvolvidas (NLS e CLN com diferentes quantidades de óleo).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

- Acetonitrila HPLC- JT Backer, EUA.
- Ácido Trifluor Acético (TFA) - JT Baker, EUA.
- Água Ultra-Pura Mili-Q - Millipore, EUA.
- Cloreto de Cetilpiridínio - Sigma Aldrich, EUA.
- Behenato de Glicerila - Brasquim, Brasil.
- Triglicerídeos do Ácido Cáprico/Caprílico- Sasol, Brasil.
- Trioleato de Sorbitano 85- Sigma, EUA.
- Polissorbato 80 - Sigma, EUA.
- Metanol Grau HPLC - JT Baker, EUA.
- Paclitaxel - LC Laboratories, EUA.
- Lauril Sulfato de Sódio - Vetec, Brasil.

4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos

- Ultra- Turrax[®] T25 Digital-IKA, Alemanha.
- Balança Analítica Adventure[®]- Ohaus, México.
- Chapa Aquecedora com Agitação Magnética C – MAGHS7-IKA, Alemanha.
- Ultrassom de Agulha- Misonix, EUA.
- Termômetro de Infravermelho - Incoterm, Brasil.
- ZetaSizer Nano-S - Malven Instruments, Reino Unido.
- Zeta Plus - Malven Instruments, Reino Unido.
- Cromatógrafo Líquido de Alta eficiência (HPLC)- Bomba quaternária (ProSTAR 240), com amostrador automático (Pro Star 410) e detector na região do ultravioleta (ProStar 310) - Varian, EUA.
- Coluna C₁₈ (50 x 3,0mm) 3µm, Varian OmsiSpher, USA.
- Sistema de Permeação de Coleta Manual (Modelo Sistema Microette Plus[®] 58-001-801)- Hanson Research, EUA.
- Membrana de Difluoreto de Polivinilideno (PVDF) 0,45 µm- Sartorius Stedim Biotech (GmbH), Germany).
- Banho de Ultrassom USC 2899A – Unique, Brasil.
- Freezer (-80 °C) - Thermo Fisher Scientific, EUA.
- Fita adesiva (Durex[®] Original 500)- 3M, Brasil.
- Minicentrífuga (Minispin plus[®]) - Eppendorf, EUA.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Metodologia analítica para quantificação do PTX por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O método utilizado foi desenvolvido por Mendes (2012) para quantificação do PTX em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Utilizou-se uma coluna Varian OmsiSpher C₁₈ (50 x 3,0mm) 3µm, mantida à temperatura ambiente e detector de UV a 227nm. Como fase móvel empregou-se ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e acetonitrila na proporção 65:35(v/v) nos primeiros 0,5 minutos de análise.

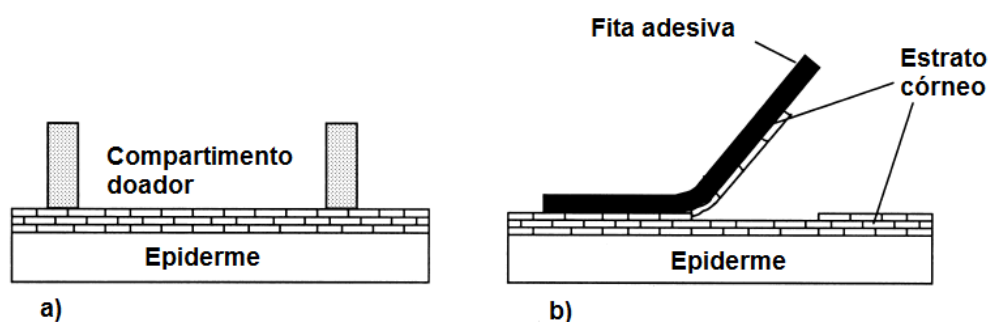
Em seguida esta proporção foi alterada para 20:80(v/v) por mais 0,5 min. Finalmente a condição inicial foi re-estabelecida nos 4 minutos finais da análise. O fluxo foi mantido em 0,5mL/min e volume de injeção 10 μ L. Os dados foram processados usando o Software Galaxie Chromatography Data System.

A cada análise, preparou-se uma curva analítica em triplicata utilizando soluções metanólicas de PTX, nas concentrações entre 1 a 80 μ g/mL. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos e o coeficiente de variação (CV%) da curva foram calculados. Estudos de recuperação do fármaco na matriz biológica também foram realizados (item 4.2.3).

4.2.2 Seletividade do método analítico – análise dos possíveis interferentes da matriz biológica e dos componentes das nanopartículas

Para avaliar os possíveis interferentes da pele de orelha de suíno no método analítico de quantificação do PTX, as camadas da pele foram separadas pela técnica do “*tape stripping*”. Esta técnica consiste em separar o estrato córneo (EC) das demais camadas da pele (pele remanescente – PR) através da aplicação sucessiva de 15 fitas adesivas na superfície da pele (Figura 9).

Figura 9- Representação esquemática da aplicação da técnica de “*tape stripping*” para determinação da quantidade de fármaco penetrado na pele. a) Após a aplicação da formulação no compartimento doador. b) Estrato Córneo removido com o uso de fitas adesivas.



Fonte: Adaptado de Moser et al., 2001.

Estas fitas, contendo o EC foram adicionadas em um tubo com 5mL de metanol (solvente extrator) e foram deixado em repouso por 20 minutos. Após os 20 minutos de contato, o material foi homogeneizado em vórtex (2 minutos) e as amostras foram filtradas e analisadas em HPLC conforme método descrito no item 4.2.1. A PR foi cortada em pequenos pedaços e adicionada em tubos contendo 5 mL de metanol. Esta mistura foi levada a homogeneizador de tecidos (ultra-turrax[®]) por 2 minutos (6.000rpm) e, em seguida, ao banho de ultrassom (20 minutos). As amostras foram filtradas e analisadas em HPLC no mesmo método escolhido para análise do fármaco (item 4.2.1).

As nanopartículas lipídicas sem fármaco foram rompidas com 5mL de metanol, homogeneizadas em vórtex por 2 minutos, filtradas e analisada por HPLC. Os estudos foram realizados em triplicata.

4.2.3 Estudos de recuperação do PTX nas camadas da pele

Este estudo teve o intuito de avaliar se o método proposto era capaz de recuperar todo o fármaco retido na pele. Para tanto, 500µL de uma solução de PTX (500µg/mL) em metanol foram transferidos aos tubos contendo o estrato córneo (EC) e pele remanescente (PR), separados conforme descrito no item anterior. Estas misturas foram submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos e posteriormente a solução com o fármaco foi evaporada sob ar comprimido. Após a etapa de contaminação, adicionou-se o solvente extrator nos tubos contendo o EC e a PR (5mL de metanol). As etapas subsequentes de homogeneização dos tecidos foram realizadas conforme descrito no item 4.2.2 para os estudos dos interferentes da pele. Os estudos foram feitos em duplicata.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

4.3.1 Obtenção dos sistemas lipídicos nanoestruturados

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram obtidos pela técnica de diluição da microemulsão (WISSING; KAYSER; MULLER, 2004). As nanopartículas lipídicas foram obtidas

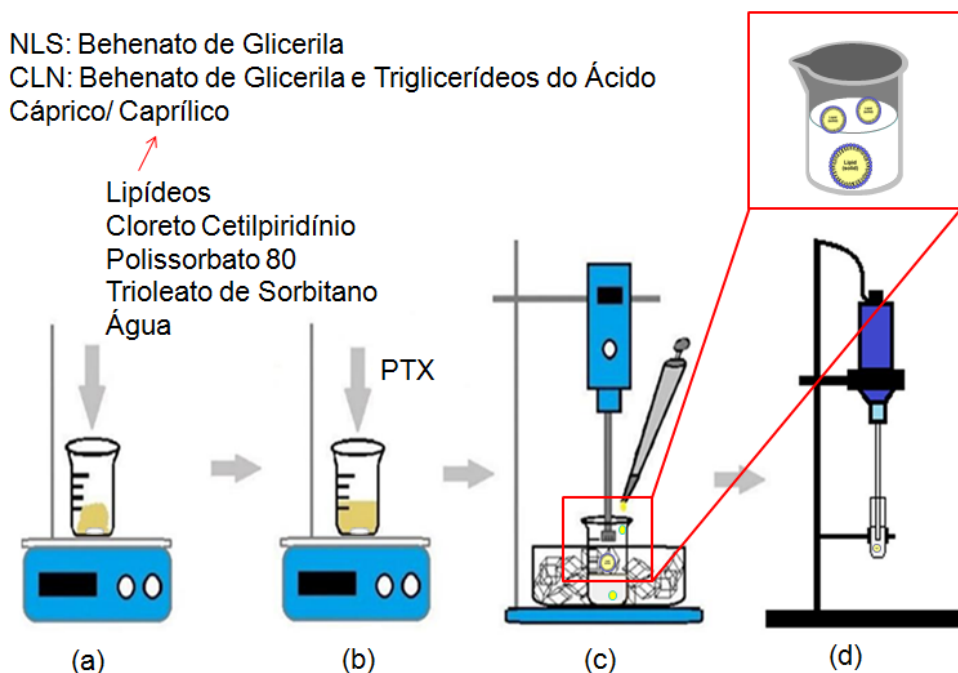
com behenato de glicerila, ou com a mistura de behenato de glicerila e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico. Cloreto de cetilpiridínio (CPC) e 1% de tensoativos (polissorbato 80/ trioleato de sorbitano 85, na proporção 7:3(v/v) respectivamente) foram adicionados aos lipídeos. Os componentes foram aquecidos à 80°C, mantidos sob agitação magnética e 250µL de água purificada quente foram adicionados à mistura fundida de lipídeos e tensoativos para a formação da microemulsão. As quantidades dos componentes utilizados na obtenção das nanopartículas estão apresentadas na Tabela 1. Foram obtidas 3 diferentes formulações de nanopartículas, as NLS (sem adição do lipídeo líquido) e dois tipos de CLN (aqui denominadas de CLN50 as partículas com menor quantidade de óleo e CLN100 as partículas com maior quantidade de óleo). Todas as formulações tiveram a mesma quantidade de lipídeos (sólidos e líquidos), tensoativos, co-tensoativos e água. A quantidade de fármaco a ser adicionada nos sistemas foi variada nas NLS (3,75; 5; 6,25 e 8 % de fármaco) e nos CLN, foi realizada a adição 3,75% de fármaco em ambos sistemas. Formulações sem fármaco também foram obtidas. Após a formação da microemulsão adicionou-se o paclitaxel (PTX) (Tabela 1). A microemulsão contendo fármaco foi gotejada em água gelada (3°C) na proporção 1:20(v/v), sendo homogeneizada a 14.000rpm em (ultra-turrax®) por 14 minutos. Por fim, as formulações foram submetidas a ultrassom de agulha por 10 minutos, (amplitude 25, com pulsos de 30 segundos e intervalos de 1minuto). A obtenção das nanopartículas lipídicas e aplicação de ultrassom de agulha à formulação estão representadas na Figura 10. Os estudos foram realizados no mínimo em duplicata, com e sem a adição do fármaco.

Tabela 1- Quantidade dos componentes utilizados na obtenção das nanopartículas.

Componentes das formulações	Formulações		
	NLS (%, p/v)	CLN50 (%, p/v)	CLN100 (%, p/v)
Behenato de Glicerila	2,00	1,75	1,50
Triglicerídeos Ácido Cáprico/ Caprílico	–	0,25	0,50
Trioleato de Sorbitano 85	0,30	0,30	0,30
Polissorbato 80	0,70	0,70	0,70
Cloreto de Cetilpiridínio (CPC)	0,50	0,50	0,50
Água Ultra– Pura Mili-Q	1,25	1,25	1,25
PTX*	3,75; 5; 6,25 e 8	3,75	3,75

*Quantidade de fármaco adicionado em relação ao total de lipídeos (sólidos e líquidos) da formulação.

Figura 10- Representação esquemática do processo de obtenção das PTX-NLS e PTX-CLN pelo método de diluição da microemulsão. a) Adição de água quente à mistura de lipídeos e tensoativos fundidos. b) Adição do PTX à microemulsão formada. c) Gotejamento da formulação em água gelada e homogeneização em ultra-turrax®. d) Aplicação de ultrassom de agulha à formulação.



Fonte: Adaptado de Maione- Silva, 2011.

4.3.2 Caracterização das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreador lipídico nanoestruturado (CLN)

As partículas obtidas foram avaliadas quanto ao tamanho, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta, recuperação do fármaco (REC%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%). Os estudos foram realizados no mínimo em duplicata.

4.3.2.1 Avaliação do diâmetro médio e distribuição do tamanho

Os sistemas nanoestruturados foram caracterizados em relação ao diâmetro médio e distribuição de tamanho (índice de polidispersividade – PDI) em ZetaSizer

(Nano- S), pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. As análises foram realizadas a partir de diluição de 10µL da formulação em 2mL de água ultrapurificada e agitação em vórtex por 2 minutos.

4.3.2.2 Avaliação do potencial zeta

A avaliação do potencial zeta foi realizada no Zeta Plus pela medida da mobilidade de migração eletroforética das partículas. As leituras foram realizadas a partir da diluição de 20µL da formulação em 1500µL de água ultrapurificada.

4.3.2.3 Recuperação do fármaco a partir das nanopartículas desenvolvidas

Para determinar a quantidade total de fármaco após obtenção das partículas (recuperação total do fármaco - REC%), uma alíquota de 200µL da formulação de nanopartículas lipídicas contendo PTX foi adicionada a 5mL de metanol. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 minutos, para total destruição das partículas e solubilização do PTX na formulação. As amostras foram filtradas e analisadas por HPLC. A recuperação do fármaco foi calculada de acordo com a Equação 1, que estabelece a relação entre fármaco total encontrado (FT) e fármaco adicionado na formulação (FA) (YANG et al., 2013).

$$REC (\%, p/p) = \frac{FT}{FA} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde, FT = Fármaco total encontrado na formulação e FA= quantidade de fármaco adicionado ao sistema.

4.3.2.4 Eficiência de encapsulação das NLS e CLN contendo PTX

Para a avaliação da eficiência de encapsulação EE% (quantidade de fármaco associado aos nanossistemas), primeiramente, separou-se o fármaco encapsulado, do fármaco não encapsulado (fármaco livre) da formulação. Uma alíquota de 1mL da formulação foi submetida a centrifugação por 20 minutos a 2000rpm. O precipitado

encontrado, que representa a quantidade de fármaco que não foi encapsulado (fármaco livre- FL) foi solubilizado em 1mL de metanol, homogeneizado em vórtex por 2 minutos e filtrado. Do filtrado, retirou-se 250µL adicionou-se 750µL de metanol para quantificação por CLAE. A quantidade de fármaco total (FT) na formulação foi determinada como descrito no item 4.3.2.3. O cálculo da eficiência de encapsulação levou em consideração a quantidade de FT e FL encontrados, conforme a Equação 2 (YANG et al., 2013). Os estudos foram feitos em triplicata.

$$EE (\%, p/p) = \frac{FT - FL}{FT} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, FT = quantidade total de fármaco na formulação e FL (fármaco livre) = quantidade de fármaco fora das partículas.

4.3.2.5 Carga de fármaco

A determinação da carga de fármaco (CF%) foi feita através da diferença entre fármaco total (FT) e fármaco livre (FL) em relação à massa de lipídeo (ML) adicionada à formulação conforme demonstrado na Equação 3 (YANG et al., 2013).

$$CF (\%, p/p) = \frac{FT - FL}{ML} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, CF% é a carga de fármaco; FT é o fármaco total e FL é o fármaco livre. ML é a massa de lipídeos (quantidade de lipídeos empregada para a obtenção das partículas que teoricamente estaria presente em 1mL da dispersão) (YANG et al., 2013).

4.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DA NLS E CLN CONTENDO PACLITAXEL

Os estudos de estabilidade das PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100 foram realizados por um período de 30 dias com armazenamento a 4°C (± 2°C). As formulações foram avaliadas (ver item 4.3.2) quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), carga de fármaco (CF%), recuperação do fármaco (REC%) e eficiência de encapsulação (EE%) após o preparo 7, 15 e 30 dias de armazenamento. Os testes de estabilidade foram realizados em triplicata.

4.5 ESTUDOS *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

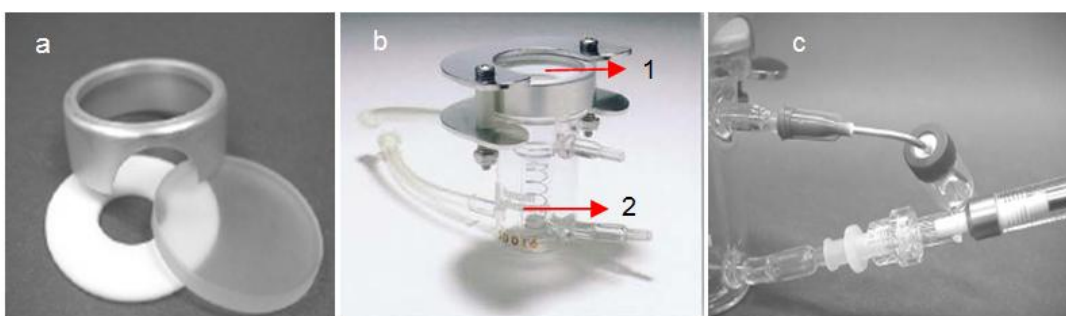
4.5.1 A pele utilizada nos experimentos *in vitro*

As orelhas foram obtidas imediatamente após o abate do animal, no Frigorífico Sol Nascente (CNPJ 73.918.757/0001-31), devidamente regulamentado pela Vigilância Sanitária local. A pele foi retirada da parte dorsal da orelha, com auxílio de um bisturi e armazenada a -80°C por período máximo de 60 dias antes do uso.

4.5.2 Permeação cutânea

Nos estudos de permeação utilizou-se células de difusão vertical tipo “Franz” pertencente ao sistema de permeação da Hanson Research (Hanson Research Corporation) (Figura 11).

Figura 11- Célula de difusão vertical passiva tipo “Franz” utilizada para estudos de permeação cutânea. a) Anel de teflon branco, disco acrílico e anel metálico. b) Célula selada com auxílio da garra metálica: número 1 indica o compartimento doador e o número 2, o compartimento receptor. c) Braço inferior da amostra, seringa, coleta da amostra.



Fonte: Adaptado do manual Microette Plus[®], Hanson Research.

No compartimento doador das células de difusão (área de aproximadamente $1,86\text{cm}^2$), foram adicionados $250\mu\text{L}$ das formulações: (1) solução aquosa de PTX com 2% de lauril sulfato de sódio (LSS), denominado de fármaco livre (FL), (2) PTX

encapsulado nas NLS, denominadas PTX-NLS e (3) PTX encapsulado nos CLN50, denominados PTX-CLN50, e PTX encapsulado nas CLN100, denominados PTX-CLN100. Todas as formulações avaliadas possuíam a mesma quantidade de PTX (3,75%), resultando no total de 187,5µg de fármaco no compartimento doador. Os estudos de permeação foram realizados por um período de 24 horas.

O compartimento receptor foi preenchido por uma solução de LSS 2% sendo o volume deste de 6,666mL. A pele de orelha de suíno foi colocada com o estrato córneo voltado para cima entre os dois compartimentos da célula de “Franz” (doador e receptor). A temperatura do banho foi ajustada a 37°C e agitação constante de 300 rpm.

No final de 24h de experimento, 1mL do meio receptor foi coletado. A pele removida da célula de difusão foi lavada com água ultrapurificada e presa a uma superfície lisa com o estrato córneo (EC) voltado para cima, em seguida esta pele foi submetida à técnica de “*tape stripping*” (ver item 4.2.2) para separar o EC do restante da epiderme e derme (PR), de forma a determinar a quantidade do fármaco que ficou retido nas camadas durante o experimento. Cada experimento foi realizado em pelo menos triplicata.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

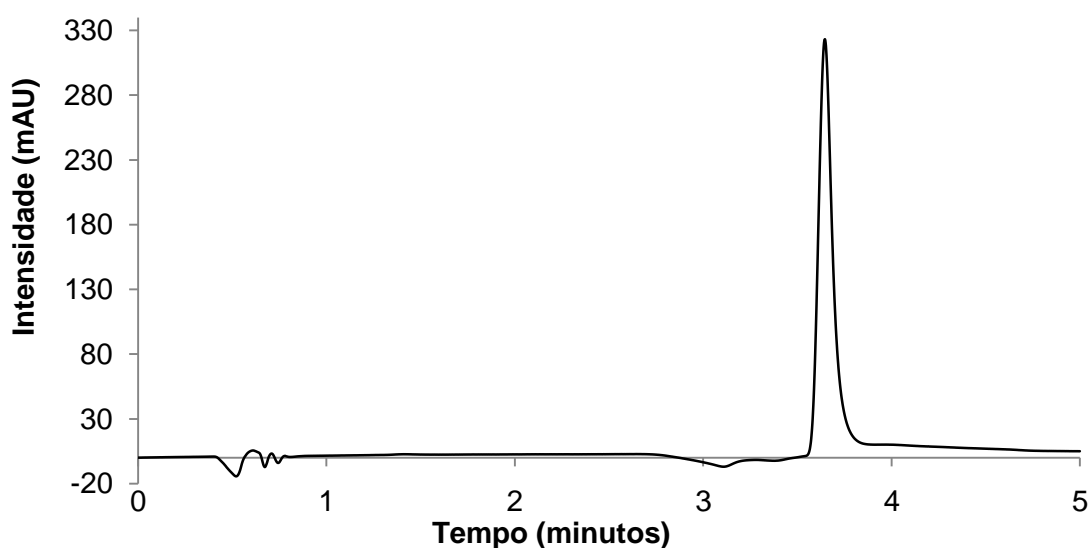
Os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* Graphpad Prisma 5.03 (GraphPad Inc., USA). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey com $p < 0,05$, utilizado como nível mínimo de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUANTIFICAÇÃO DO PTX POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O método apresentou tempo de corrida de 5 minutos, com eluição do paclitaxel em 3,70 minutos como mostra a Figura 12.

Figura 12- Perfil cromatográfico do PTX gerado a partir da análise do fármaco em metanol na concentração 100µg/mL, em HPLC-UV ($\lambda = 227 \text{ nm}$). Coluna C_{18} (50x3mm, 3µm) mantida à temperatura ambiente, fase móvel composta por TFA 0,1% e acetonitrila, com fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 10µL.

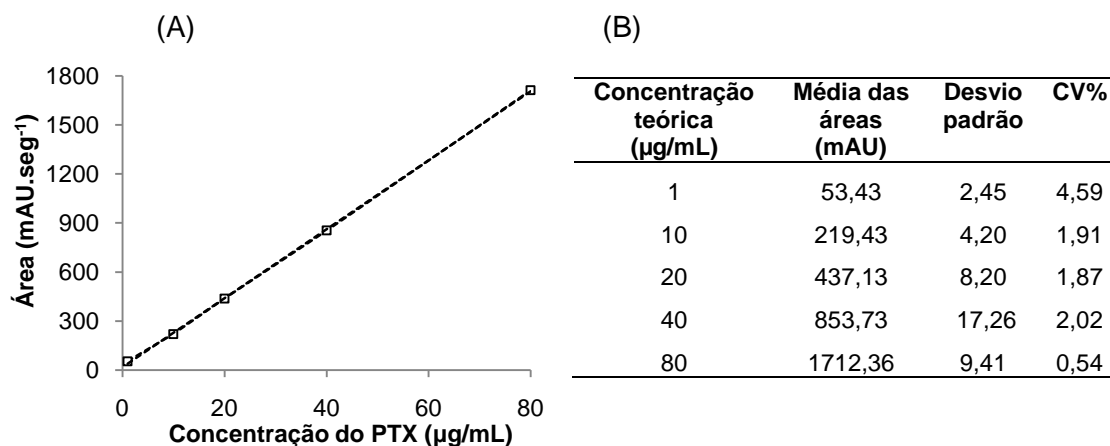


O pico do PTX apresentou valor de simetria de 1 e número de pratos teóricos maior que 2000. As condições aplicadas resultaram um tempo de corrida curto, possibilitando a quantificação do fármaco de forma eficiente.

5.1.1 Linearidade

A Figura 13 (A) apresenta curva de calibração obtida pela plotagem da área do pico versus a concentração do paclitaxel em metanol. Os valores das médias das áreas e coeficientes de variação (CV%) estão a direita Figura 13 (B). A equação da reta obtida foi $y = 21,11x + 17,693$ com coeficiente de correlação ($r = 0,999$). Todas as concentrações analisadas apresentaram CV% menor que 5%. Portanto, o método mostrou-se linear na faixa analisada (1 a 80µg/mL), o coeficiente de correlação foi maior que 0,99, como preconizado pelo FDA (1996).

Figura 13- (A) Curva analítica do PTX em metanol na concentração de 1 a 80 $\mu\text{g/mL}$ obtida por análise em HPLC com fase móvel composta por TFA 0,1% e acetonitrila, com fluxo de 0,5mL/min. (B) Coeficiente de variação (CV%) de todas as concentrações analisadas.

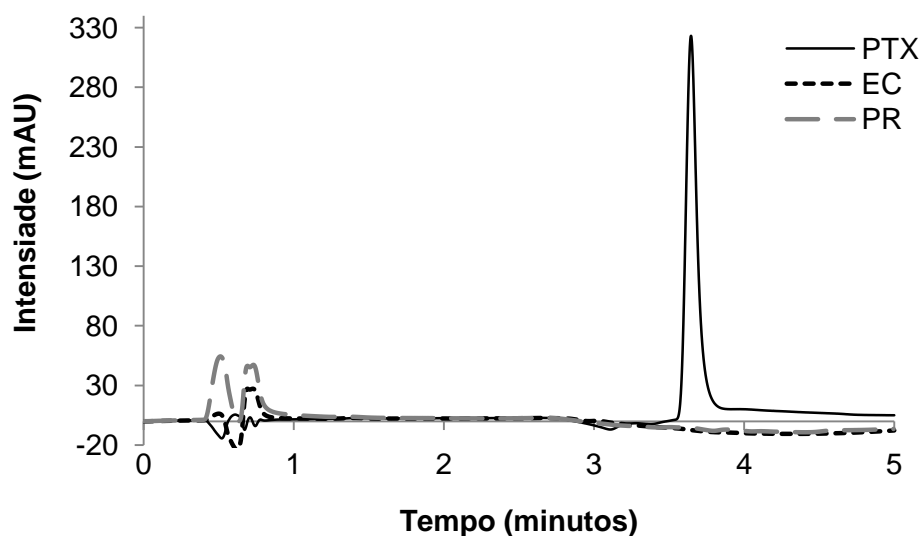


5.1.2 Seletividade- Análise dos possíveis interferente da matriz biológica e dos componentes das nanopartículas

A seletividade do método é a capacidade de analisar um fármaco na presença de outros componentes sem a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do fármaco (FDA, 1996).

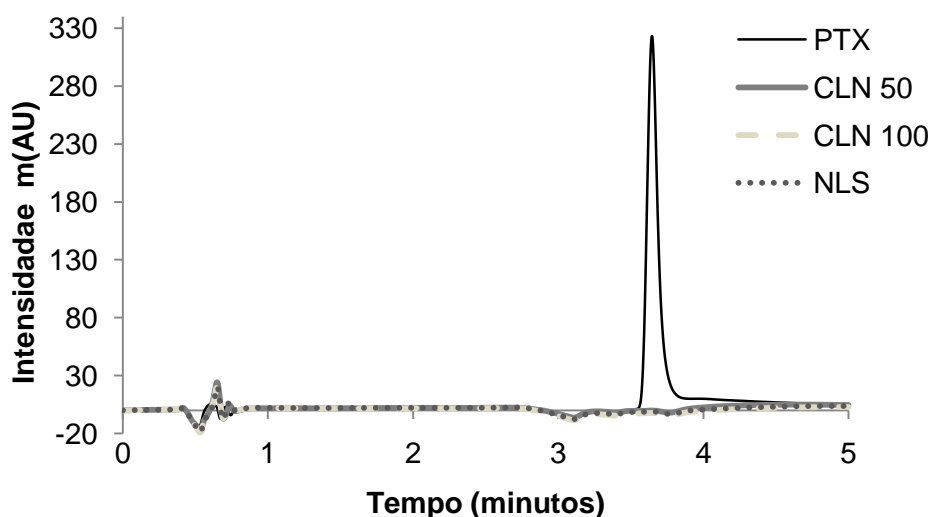
Os cromatogramas obtidos a partir da análise dos produtos de extração das diferentes camadas da pele (estrato córneo - EC e pele remanescente - PR) em HPLC, nas mesmas condições de quantificação do PTX, estão apresentados na Figura 14. Observa-se que, no tempo de retenção do PTX, não existem picos interferentes do EC e da PR, demonstrando a seletividade do método.

Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir do estudo das diferentes camadas da pele (EC e PR) sem fármaco comparado com o tempo de retenção do PTX em solução metanólica.



Os cromatogramas obtidos a partir da análise dos componentes da formulação sem fármaco (Figura 15) não apresentaram interferente no tempo de retenção do PTX, reforçando a seletividade do método para as aplicações propostas.

Figura 15- Cromatogramas obtidos a partir da análise das NLS e CLN sem fármaco e solução de PTX nas mesmas condições experimentais.



5.2 RECUPERAÇÃO DO PTX NAS DIFERENTES CAMADAS DA PELE

Os estudos de recuperação do fármaco em matrizes biológicas complexas como a pele são de fundamental importância. Os componentes da pele, como as proteínas e lipídeos podem interagir com o fármaco em estudo, levando a baixa extração do mesmo a partir da matriz biológica (baixa recuperação). A recuperação do PTX nas diferentes camadas da pele está apresentada na Tabela 2. Como pode ser observado, o método de extração mostrou-se eficiente e foi capaz de recuperar altas concentrações do fármaco nas diferentes camadas da pele.

Tabela 2- Recuperação do PTX nas diferentes camadas da pele.

Camadas da pele	[] Teórica (µg/mL)	[] Quantificada (µg/mL)	Recuperação (%)
EC	50	48,56 ± 2,67	97,12 ± 5,34
PR	50	46,86 ± 2,96	93,96 ± 5,60

5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

5.3.1 Obtenção das NLS e CLN sem fármaco

De início foram desenvolvidas formulações de nanopartículas lipídicas sem fármaco. Estes estudos foram efetuados para avaliar se o fármaco influenciaria nas propriedades físico-químicas da partícula quando adicionado à formulação.

Conforme observado na Tabela 3, as partículas apresentaram tamanho médio de 265 a 300nm, com Pdl de aproximadamente 0,2 e potencial zeta positivo.

Tabela 3- Caracterização das nanopartículas lipídicas sem fármaco quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta.

Formulações sem fármaco	Tamanho Médio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
NLS	298,65 ± 23,78	0,249 ± 0,036	25,85 ± 1,35
CLN50	289,60 ± 20,93	0,255 ± 0,026	24,01 ± 3,96
CLN100	265,85 ± 1,76	0,254 ± 0,011	20,12 ± 2,03

Observa-se que a adição do triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico nas formulações (CLN50 e CLN100), tende a diminuir o tamanho médio das partículas, entretanto, não de modo significativo ($p > 0,05$). De fato, alguns trabalhos relatam que a adição de óleo nas matrizes lipídicas pode diminuir o tamanho das mesmas devido ao aumento da mobilidade molecular da matriz, assim como o uso de tensoativos atuando no EHL (equilíbrio hidrófilo/ lipofílico) (FANG et al., 2008; HUANG et al., 2008; MITRI et al., 2011). Sendo assim, esta tendência também foi observada neste trabalho apesar de não existir diferenças estatísticas entre o tamanho, Pdl e potencial zeta encontrados.

O potencial zeta positivo foi proporcionado pela adição do tensoativo catiônico (cloreto de cetilpiridínio - CPC) à formulação. Este residual de cargas positivas pode favorecer interações da partícula com o EC, visto que esta camada, em pH fisiológico, encontra-se com residual de cargas negativas (TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009). Os demais componentes da formulação (behenato de glicerila, triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico, polissorbato 80 e trioleato de sorbitano) são compostos de característica neutra e, por isso, não influenciam no residual de carga da partícula.

Vale a pena ressaltar que os valores de potencial zeta obtidos na caracterização dos sistemas (maiores que 20mV), pode favorecer a manutenção da estabilidade física do sistema durante o período de estocagem. Segundo Mitri e colaboradores (2011), a carga das partículas é um dos fatores que determina a estabilidade física dos sistemas dispersos. Quanto maior é a repulsão eletrostática entre as partículas, maior é a estabilidade física.

Em suma, o método escolhido para obtenção das partículas, bem como seus componentes, permitiram a obtenção de sistemas de tamanho nanométrico de forma reprodutível, com baixo Pdl e potencial zeta positivo.

5.3.2 Obtenção das NLS e diferentes CLN com PTX

Para a obtenção das partículas com fármaco, primeiramente, adicionou-se diferentes quantidades de PTX nas NLS. As NLS foram escolhidas para esta triagem com base nos estudos da literatura, que relatam a maior capacidade de carga dos CLN em comparação com as NLS (ÜNER, 2006; PARDEIKE et al., 2009). Sendo assim, para obter sistemas similares, como a mesma quantidade de fármaco encapsulado, optou-se por avaliar qual a capacidade máxima de fármaco que as NLS comportam, para então, obter os CLN com aproximadamente a mesma quantidade de PTX.

A Tabela 4 apresenta a caracterização das PTX-NLS contendo 3,75, 5, 6,25 e 8% do fármaco.

Tabela 4- Caracterização das PTX-NLS quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, recuperação (REC%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%).

PTX (%)	Tamanho Médio (nm)	Pdl	REC%	EE%	CF%
3,75	314,1 ± 10,9	0,26 ± 0,02	80,85 ± 9,10	91,12 ± 9,38 ^a	2,84 ± 0,12
5,00	331,5 ± 7,5	0,32 ± 0,01	71,88 ± 0,46	55,45 ± 7,95	2,02 ± 0,30
6,25	344,5 ± 0,9	0,34 ± 0,05	81,73 ± 13,01	58,15 ± 2,18	2,99 ± 0,58
8,00	335,9 ± 0,9	0,32 ± 0,06	72,86 ± 1,00	69,83 ± 0,94	4,12 ± 0,11

^a Eficiência de encapsulação da PTX-NLS com 3,75% de fármaco é significativamente maior que as demais partículas ($p < 0,05$).

A eficiência de encapsulação diminui significativamente com o aumento de PTX de 3,75 para 5% ($p < 0,05$). Observa-se também na Tabela 4 que, o aumento da quantidade de fármaco não alterou significativamente o Pdl e recuperação do PTX ($p > 0,05$).

O behenato de glicerila, escolhido para composição da NLS, possui uma mistura de três componentes diferentes (monobehenato 12–18%, dibehenato 52–54%, e tribehenato 28–32%). Sendo assim, a matriz lipídica composta pelo mesmo pode apresentar alta eficiência de encapsulação, devido a sua estrutura mais desorganizada, com mais espaço para acomodação do fármaco (YUAN et al., 2008, SHARMA et al., 2009).

O PTX, fármaco lipofílico ($\log P=3$), pode solubilizar-se na matriz lipídica, possibilitando maior interação com a matriz lipídica, permitindo uma melhor incorporação na partícula, resultando em uma maior eficiência de encapsulação (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Os dados de recuperação do PTX expressam a perda do fármaco durante as etapas de produção das nanopartículas. A literatura relata que a obtenção de partículas lipídicas por este método de preparo resulta em perdas de aproximadamente 5 a 30% de fármaco (EL-SHABOURI, 2002; ZHANG; SMITH, 2011). Sendo assim, as perdas encontradas no método proposto, não foram significativamente altas, levando em consideração as múltiplas etapas que este método apresenta. A solidificação da formulação em parte no béquer e ponteira durante a etapa de transferência da microemulsão para a água gelada, pode ser considerada a etapa mais crítica deste processo de obtenção das nanopartículas.

Tendo em vista que a maior eficiência de encapsulação foi obtida com 3,75% de PTX (em relação ao total de lipídeos da formulação), esta também foi a quantidade de fármaco escolhida para incorporação nos CLN.

A Tabela 5 demonstra a caracterização de todas as partículas desenvolvidas contendo 3,75% de PTX.

Tabela 5- Caracterização das nanopartículas lipídicas contendo 3,75% de PTX quanto ao tamanho médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, recuperação (REC%), eficiência de encapsulação (EE%) e carga de fármaco (CF%).

Formulações	Tamanho Médio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	REC%	EE%	CF%
NLS	314,1 ± 10,9	0,26 ± 0,02	22,1 ± 2,8	80,85 ± 9,10	91,12 ± 9,38	2,84 ± 0,12
CLN50	315,2 ± 22,2	0,31 ± 0,06	20,8 ± 0,1	83,00 ± 7,60	98,24 ± 0,96	3,10 ± 0,31
CLN100	270,6 ± 13,5 ^a	0,26 ± 0,08	21,9 ± 5,6	87,98 ± 7,62	98,79 ± 0,09	3,29 ± 0,27

^a CLN100 O tamanho médio é menor que as NLS e dos CLN 50 ($p<0,05$).

Observa-se, na Tabela 5, que o aumento de lipídeo líquido na formulação proporcionou a redução do tamanho das mesmas ($p < 0,05$), assim como observado para as partículas sem fármaco. Como já mencionado, outros autores também constataram o mesmo resultado aqui evidenciado (HUANG et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

O potencial zeta das partículas foi positivo para todas as formulações, conforme observado também para as partículas sem fármaco. O PTX não influenciou significativamente os valores do potencial zeta, possivelmente devido a ausência de carga do fármaco no pH da formulação.

Não há diferença estatística entre a eficiência de encapsulação e a carga de fármaco das NLS em comparação com os CLN ($p > 0,05$). Entretanto, observa-se uma tendência dos CLN encapsularem mais fármaco do que as NLS.

Segundo Pardeike et al (2009) ao criar uma matriz lipídica menos ordenada, através da mistura de lipídeo sólido com lipídeo líquido, é possível incorporar mais fármaco e, a estabilidade ao longo prazo pode ser aumentada pois o sistema pode evitar ou minimizar a expulsão do fármaco durante o período de armazenamento. De fato, foi possível incorporar quantidades maiores de PTX nos CLN desenvolvidos (aproximadamente 7,5%). Provavelmente, a estrutura mais desorganizada, bem como a solubilidade do PTX no lipídeo líquido, justifique estes resultados. Portanto, a título de comparação, foram utilizadas nestes estudos as partículas com a mesma quantidade de fármaco encapsulado nas NLS.

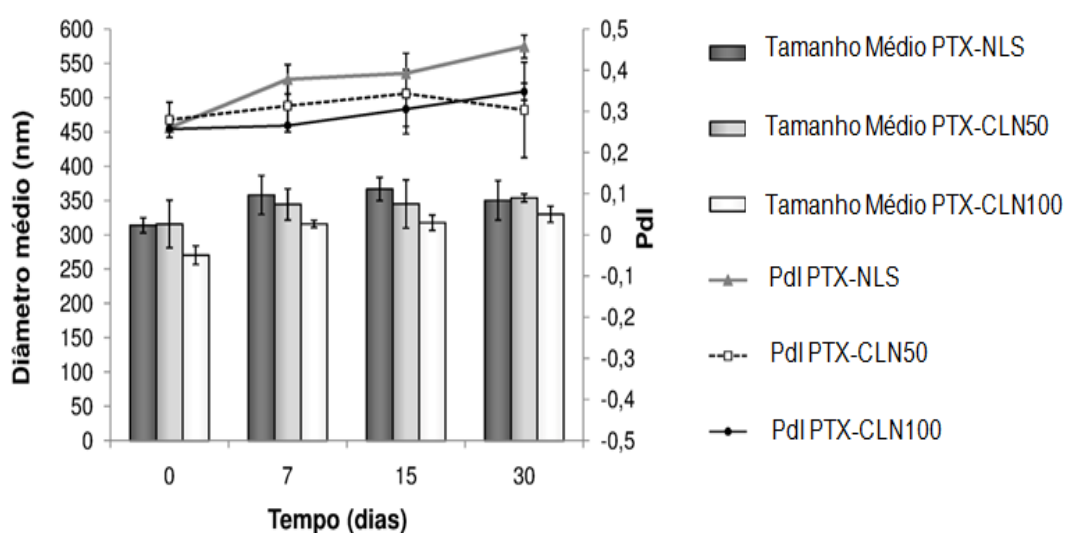
5.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS NLS E CLN CONTENDO PACLITAXEL

Na Figura 16, é possível observar uma tendência no aumento do tamanho e Pdl das partículas ao longo do período de armazenamento, porém estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

O potencial zeta variou de $22,1 \pm 2,8$ a $23,7 \pm 1,2$ mV para PTX-NLS, $20,8 \pm 1,1$ a $25,2 \pm 1,7$ mV para PTX-CLN50 e de $21,9 \pm 5,6$ a $25,3 \pm 1,7$ mV para PTX-CLN100 e, também, não houve mudanças significativas durante o período de estocagem ($p > 0,05$). O potencial zeta é um dos parâmetros que podem dar indícios sobre a estabilidade da dispersão coloidal, ou seja, quanto maior a tendência de repulsão

entre as partículas (altos valores de potencial zeta) maior a estabilidade (ÜNER, 2006; MEHNERT; MÄDER, 2012). Segundo Mitri et al (2011) partículas com potencial zeta superior a 30mV (em módulo) são consideradas fisicamente estáveis. Em suma, o potencial zeta obtido (próximo de 20mV), provavelmente garante a estabilidade da partícula por um período mais curto de tempo, e por isso, a tendência de aumento do Pdl e do tamanho ao longo do tempo.

Figura 16- Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100 recém-preparadas (dia 0) e após 7, 15 e 30 dias de armazenamento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.



A recuperação do PTX das partículas foi realizada antes de todas as análises dos estudos de estabilidade para monitorar a quantidade total de fármaco nas formulações. A recuperação foi superior a 80% para todas as formulações, como já esperado (veja Tabela 5). Desta forma, foi garantido que a concentração final de PTX (encapsulado ou não) permaneceu igual às partículas recém-preparadas. Isso demonstra que não houve perdas de fármaco, seja por possíveis degradações químicas ou perdas de processo durante os estudos de estabilidade.

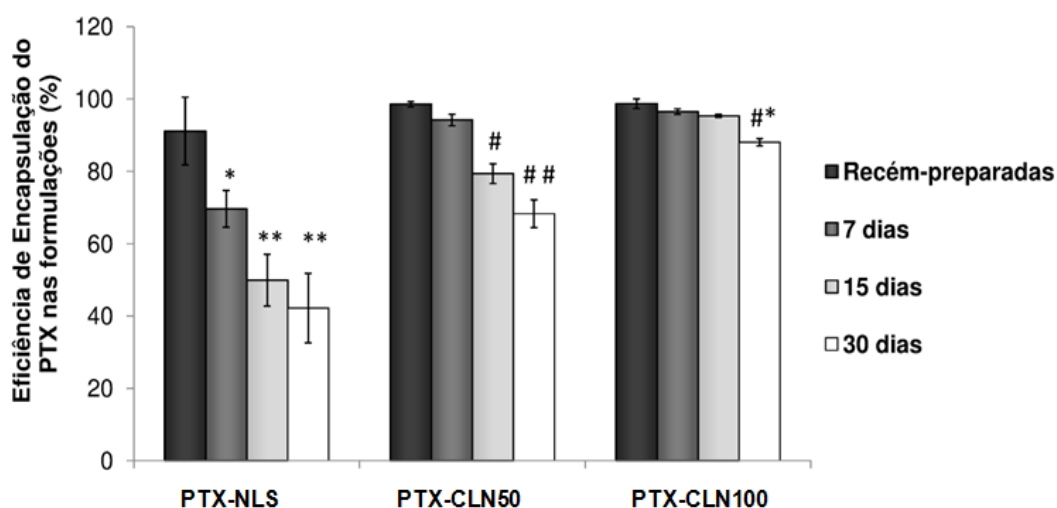
A Figura 17 representa os resultados de eficiência de encapsulação do PTX em nanopartículas durante 30 dias de estudo das diferentes formulações desenvolvidas. A EE% das PTX-NLS reduziu de 91,12% ($\pm 9,38$) para 42,15% ($\pm 9,59$) durante os 30 dias de armazenamento. Ao contrário, os CLN mantiveram a

mesma eficiência de encapsulação nos primeiros 7 dias de armazenamento. Ainda, o aumento do óleo na matriz lipídica (PTX-CLN100) evitou a expulsão do fármaco por 15 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Uma pequena quantidade de fármaco foi liberada desta formulação nos últimos 15 dias de armazenamento (aproximadamente 7%), indicando a maior estabilidade deste sistema em comparação com as outras formulações.

Sendo assim, a Figura 17 demonstra que os CLN são muito mais estáveis do que as NLS. Mesmo quando as partículas estão dispersas em água, o PTX permanece encapsulado nos CLN, demonstrando a grande afinidade do fármaco com o óleo da matriz lipídica. Segundo Mitri et al (2011) fármacos lipofílicos possuem alta solubilidade em lipídios líquidos, mas apresentam solubilidade limitada em lipídios sólidos. Assim, o aumento do lipídeo líquido nos carreadores pode permitir maior encapsulação de fármaco (como mencionado no item 5.3.2), mas principalmente, pode evitar ou diminuir a saída do fármaco da partícula durante a armazenagem.

A redução da EE% ao longo do tempo provavelmente é devido à organização das cadeias lipídicas, ou seja, o fármaco que se localiza nas imperfeições das cadeias tende a ser expulso para melhor acomodação das mesmas (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Figura 17- Eficiência de encapsulação em % do PTX das formulações PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100 recém-preparadas e após 7, 15 e 30 dias de armazenamento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Os valores representam a média de três replicatas. Os símbolos representam os valores com diferenças significativas ($p < 0,05$) na eficiência de encapsulação do PTX das formulações desenvolvidas.

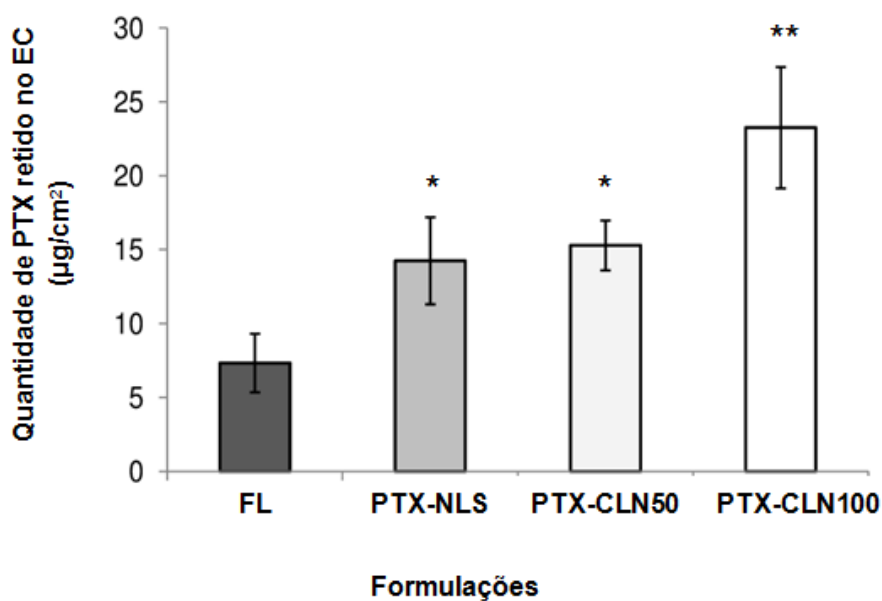


5.5 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO PTX EM DIFERENTES FORMULAÇÕES

A pele da orelha de suíno é um modelo de membrana bem aceito para substituir a pele humana. Sua semelhança histológica com a humana tem tornado este modelo um dos mais utilizados para estudos de permeação *in vitro* (JACOBI et al., 2007; GEORGETTI et al., 2008; LOPES; REED, 2009).

A Figura 18 apresenta a quantidade do PTX no EC após 24 horas de permeação do fármaco não encapsulado (fármaco livre – FL) e do fármaco encapsulado nas nanopartículas lipídicas (PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100).

Figura 18- Quantidade de PTX retido no EC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 horas do ensaio de permeação do fármaco não encapsulado (fármaco livre – FL) e encapsulado nas partículas lipídicas (PTX-NLS, PTX-CLN50 e PTX-CLN100). Os valores representam a média de pelo menos seis replicatas. Os símbolos significam os valores que apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na quantidade de PTX presente no estrato córneo (EC).



Observa-se na Figura 18 que a encapsulação do PTX nas nanopartículas aumentou significativamente a quantidade de fármaco no EC ($p < 0,05$). Aproximadamente 2 vezes mais fármaco ficou retido no EC quando encapsulado nas NLS em comparação com o FL. Ainda, não houve diferença significativa entre a quantidade de fármaco que ficou retido no EC quando as NLS e os CLN50 foram avaliados. Entretanto, a adição de mais óleo na matriz lipídica, como no caso dos CLN100, favoreceu significativamente a penetração do PTX no EC ($p < 0,05$). Os CLN100 aumentaram aproximadamente 3 vezes a quantidade de fármaco nesta camada quando comparados com a administração do fármaco não encapsulado. Adicionalmente, a incorporação do PTX nos CLN100 aumentou 1,5 vezes a quantidade de fármaco no EC quando comparado com as demais partículas lipídicas.

A quantidade permeada de PTX nos estudos de Paolino e colaboradores (2012) foi significativamente maior (aproximadamente $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ quando o fármaco

encontra-se encapsulado em etossomas) do que a quantidade permeada de fármaco no presente trabalho (aproximadamente $25\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Entretanto, vale à pena ressaltar que, estes autores utilizaram condições experimentais diferentes e estas condições prejudicam a comparação direta entre os resultados encontrados.

Nos estudos *in vitro* do PTX em tiorosferas, realizados por Kilfoyle e colaboradores (2012), a quantidade permeada de fármaco (aproximadamente $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi inferior a encontrada no presente trabalho. Mais uma vez, as condições experimentais foram diferentes (tempo de experimento de 6h), o que dificulta a comparação com os resultados encontrados neste trabalho.

No entanto, apesar destas divergências, os trabalhos aqui citados têm relatado que o PTX tem grande afinidade pelo EC, ficando retido preferencialmente nesta camada (PAOLINO et al., 2012). De fato, o mesmo pode ser observado nestes experimentos. O acúmulo do fármaco no EC pode funcionar como um “depósito” de PTX e, ao longo do tempo, o fármaco pode difundir-se para as camadas mais profundas da pele (FRESNO CONTRERAS; JIMÉNEZ SORIANO; RAMÍREZ DIÉGUEZ, 2005).

No presente trabalho, determinou-se também a quantidade de PTX retida na PR após 24h de estudo de permeação cutânea. Observou-se que é possível detectar o fármaco na PR quando o mesmo é administrado na forma livre ou encapsulado nas NLS e CLN50. Desta forma, não foi possível quantificar o PTX nesta camada, pois os valores encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método ($0,2\mu\text{g}/\text{mL}$). Entretanto, quando o PTX foi incorporado nos CLN100, a quantidade retida na PR foi de $6,48 \pm 1,39\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Acredita-se, então, que a adição do óleo na matriz tenha favorecido a penetração do fármaco tanto para o EC quanto para as camadas mais profundas da pele.

Os triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico parecem ter um efeito promotor de absorção quando aplicados topicamente na pele (MICHNIAK et al., 1994). Sendo assim, o aumento do óleo na matriz lipídica dos CLN pode ter favorecido a penetração do PTX para o EC e para as camadas mais profundas da pele.

Alguns relatos na literatura discutem o desempenho dos CLN em relação às NLS na penetração cutânea de fármacos. Fang e colaboradores (2008) avaliaram a penetração tópica do psoraleno nos dois tipos de partículas lipídicas (CLN e NLS) e observaram maior penetração do fármaco quando administrado nos CLN. Os

autores justificaram tal fato devido ao tamanho reduzido dos CLN em relação às NLS. O tamanho das partículas pode influenciar na formação do filme lipídico na superfície da pele. Ou seja, partículas com tamanho pequeno podem favorecer a formação de filmes mais coesos e, conseqüentemente, podem influenciar na hidratação cutânea e a penetração do fármaco para as camadas mais profundas da pele (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; FANG et al., 2008). De fato, os CLN100 são significativamente menores do que as demais formulações lipídicas ($p < 0,05$). Assim, o tamanho pode ter influenciado na formação de um filme mais coeso e, conseqüentemente, no aumento da hidratação cutânea e permeação do PTX para as camadas mais profundas da pele (BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011).

Já é bem descrito na literatura que, possivelmente, partículas lipídicas não atravessem o EC, mas o tamanho nanométrico pode permitir um contato mais próximo com as junções superficiais dos corneócitos favorecendo acúmulo nas imperfeições da pele e folículos pilosos (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004, KUNTSCHKE et al., 2008; JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011; PROW et al., 2011). Desta forma, a encapsulação do PTX nas nanopartículas lipídicas favoreceu significativamente a penetração do fármaco para as camadas da pele.

Dentro deste contexto, a encapsulação do PTX nas nanopartículas lipídicas parece ser promissora para o tratamento tópico de lesões neoplásicas ou lesões pré-cancerígenas que possam ser tratadas com o fármaco em questão. Ainda, os CLN100 demonstraram ser sistemas bastante promissores para tratamento de tumores cutâneos, devido ao alto acúmulo do fármaco nas camadas da pele em relação aos outros nanossistemas lipídicos.

6 CONCLUSÕES

- A técnica da diluição da microemulsão mostrou ser eficiente para preparo das NLS e CLN. O diâmetro médio das partículas obtidas foi de $298,65 \pm 23,78$ nm para as NLS, $289,60 \pm 20,93$ nm para CLN50 e $265,85 \pm 10,76$ nm para

CLN100. Os valores do Pdl foram de aproximadamente 0,2 e potencial zeta positivo de aproximadamente +20 mV.

- As nanopartículas obtidas com o fármaco (3,75% de PTX) possuíram eficiência de encapsulação maior que 90% para todas as formulações.
- Os PTX-CLN100 apresentaram maior estabilidade. Apesar do tamanho médio, Pdl e potencial zeta de todas as formulações não ter sido alterado significativamente durante os 30 dias de armazenamento para nenhuma formulação, a eficiência de encapsulação das NLS e dos CLN50 diminuíram durante o período de estocagem.
- A encapsulação do PTX nas nanopartículas lipídicas favoreceu significativamente o acúmulo do fármaco no EC em relação ao fármaco não encapsulado.
- A maior retenção do fármaco no EC e na PR foi proporcionado pelo PTX-CLN100, sugerindo que este sistema apresenta benefícios potenciais para o tratamento tópico do câncer de pele.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A.; DWIVEDI, S.; AJAZUDDIN; GIRI, T. K.; SARAF, S.; SARAF, S.; TRIPATHI, D. k. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164 , n.1-2, p. 26-40, 2012.

ALVAREZ-ROMAN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53-62, 2004.

ASBIL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.3, n.1.p. 36-41, 2000.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 1, p. S31-S40, 2002.

BAHNER, J. D.; BORDEAUX, J. S. Non-melanoma skin cancers: Photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p.792-798, 2013.

BAROLI, B. M. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p.1-30, 2010.

BOLZINGER, M. -A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p.156-165, 2012.

BONTÉ, F.; SAUNOIS, A.; PINGUET, P.; MEYBECK A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. **Archives of Dermatological Research**, v. 289, n. 2, p. 78-82, 1997.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n.1, p. S41–S55, 2002.

BORGIA, S. L.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K. D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 1, p. 151-163, 2005.

BUCK, P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 2, p. 70-76, 2004.

CORRÊA, A. G. Taxol: Da Descoberta ao Uso Terapêutico. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 460- 467, 1995.

DE CASTRO, I. A. **Expressão Da Proteína P53 Em Diferentes Níveis De Fotoenvelhecimento**. 2007. f. 75 Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Medicina – UFRGS, Porto Alegre, 2007.

EL-SHABOURI, M. H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p.101-108, 2002.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: a Review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n.1, p. 80-102, 2012.

FANG, J. -Y.; FANG, C. -L.; LIU, C. -H.; SU, Y. -H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633-640, 2008.

FENG, S. -S.; ZHAO, L.; ZHANG, Z.; BHAKTA, G.; YIN WIN, K.; DONG, Y.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Vitmamin E TPGS- emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h *in vivo*. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 23, p. 6641-6648, 2007.

FESTA NETO, C. Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinomas: study of 10 cases. **An bras Dermatol**, v.77, n.6, p.693-698, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**. United States, 1996.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; DA SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301- 313, 2005.

FRESNO CONTRERAS, M. J.; JIMÉNEZ SORIANO, M. M.; RAMÍREZ DIÉGUEZ, A. *In vitro* percutaneous absorption of all-*trans* retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, n. 1-2, p.134-145, 2005.

GALICZYNSKI, E. M.; VIDIMOS, A. T. Non surgical Treatment of Non melanoma Skin Cancer. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 2, p. 297-309, 2011.

GASCO, M. R.; ANTONELLI, L.P. Method for Producing Solid Lipid Microspheres Having a Narrow Size Distribution, Patent Number: 5,250,236, 1993.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Jr.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n.1-2, p.189-196, 2008.

GORDON, R. SKIN Cancer: an Overview of Epidemiology and Risk Factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160-169, 2013.

GREEN, M. R.; MANIKHAS, G. M.; ORLOV, S.; AFANASYEV, B.; MAKHSON, A. M.; BHAR, P.; HAWKINS, M. J. Abraxane[®], a novel Cremophor[®]-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 8, p. 1263- 1268, 2006.

HADRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 184, n. 1- 5, p. 1-6, 1999.

Hanson Research Corporation. Vertical Diffusion Cell. Set-Up and manual operation.

HUANG, Z. -R.; HUA, S. -C.; YANG, Y. -L. FANG, J. -Y. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 9, p. 1094-1102, 2008.

HU, F. -Q.; JIANG, S. -P.; DU, Y. -Z.; YUAN, H.; YE, Y. -Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion

method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 167-173, 2005.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 1 p. 19- 24, 2007.

JAGETIA, G. C.; NAYAK, V. Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 349, n. 2, p.219-227,1996.

JENSEN L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 68-75, 2011.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1-2, p.124-132, 2008.

KILFOYLE, B.E.; SHEIHET, L.; ZHANG, Z.; LAOHOO, M.; KOHN, J.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 1, p.18- 24, 2012.

KINGSTON, D. G. I. Taxol, a molecule for all seasons. **Chemical Communications**, n. 10, p. 867-880, 2001.

KINGSTON, D. G. I. The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p.1844-1854, 2007.

KNOX, C.; LAW, V.; JEWISON, T.; LIU, P.; LY, S.; FROLKIS, A.; PON, A.; BANCO, K.; MAK, C.; NEVEU, V.; DJOUMBOU, Y.; EISNER, R.; GUO, A. C.; WISHART, D. S. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research*, v. 39. Database issue, p. D1035-41, 2011.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, n. 2-3, p.149-157, 2000.

KÜCHLER, S.; HERRMANN, W.; PANEK-MINKIN, G.; BLASCHKE, T.; ZOSCHKE, C.; KRAMER, K. D.; BITTL, R.; SCHÄFER-KORTING, M. SLN for topical application in skin diseases—characterization of drug–carrier and carrier–target interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 225-233, 2010.

KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1842-1852, 2013.

KUNTSCHKE, J.; BUNJES, H.; FAHR, A.; PAPPINEN, S.; RÖNKKÖ, S.; SUHONEN, M.; URTTI, A. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, n. 1- 2, p. 180-195, 2008.

LA PORTA, C. A.M. SKIN CANCERS – RISK FACTORS, PREVENTION AND THERAPY. In: TAVEIRA, S. F.; LOPEZ, R. F. V. **Topical Administration of Anticancer Drugs for Skin Cancer Treatment**. 1 ed. Croatia: Ed: InTechopen, 2011, p. 247-272.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Preparation of semi solid drug carries for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.124, n.1-2, p.9-12, 2001.

LOPES, L. B.; REED, R. A simple and rapid method to assess lycopene in multiple layers of skin samples. **Biomedical Chromatography**, v.24, n. 2, p.154-159, 2009.

LOVE, W. E.; BERNHARD, J. D.; BORDEAUX, J. S. Topical Imiquimod or Fluorouracil Therapy for Basal and Squamous Cell Carcinoma. **Arch Dermatol**, v. 145, n. 2, p. 1431-1438, 2009.

MAIA, C. S.; MEHNERT, W.; SCHAFER- K, M. Solidi lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n.2, p. 165- 167, 2000.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. -M. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715 , p. 673-685, 2010.

MAIONE-SILVA, L. **Nanopartículas lipídicas sólidas contendo genisteína para uso tópico**. 2011. f. 73 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2012.

MARJUKKA SUHONEN, T.; BOUWSTRA, J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 2, p. 149-161, 1999.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p.165-196, 2001.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 0, p. 83- 101, 2012.

MENDES, L. P. **Sistemas nanoestruturados multicompartimentais para co-encapsulação e liberação controlada de paclitaxel e genisteína: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral in vivo**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2012.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n.1, p. S3-S17, 2002.

MIDENA, M.; ANGELI, C. D.; VALENTI, M.; DE BELVIS, V.; BOCCATO, P. Treatment of conjunctival squamous cell carcinoma with topical 5-fluorouracil. **Ophthalmol**, v. 84, n. 3 p. 268-272, 2000.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n.1- 2, p. 267- 275, 2011.

MICHNIAK, B. B.; PLAYER, M. R.; CHAPMAN JR, J. M.; SOWELL, SR Azone analogues as penetration enhancers: effect of different vehicles on hydrocortisone acetate skin permeation and retention. **Journal of Controlled Release**, v. 32, n. 1, p. 147-154, 1994.

MOSER, K.; KRIWER, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p.103-112, 2001.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 121-128, 2002.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NSEREKO, S.; AMIJI, M. Localized delivery of paclitaxel in solid tumors from biodegradable chitin microparticle formulations. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2723-2731, 2002.

NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1-2, 2011.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 56-67, 2010.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.-M.; MÜLLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 3, p. 345- 355, 2001.

PAOLINO, D.; CELIA, C.; TRAPASSO, E.; CILURZO, F.; FRESTA, M. Paclitaxel-loaded ethosomes[®]: Potential treatment of squamous cell carcinoma, a malignant transformation of actinic keratoses. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 102-112, 2012.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 170-184, 2009.

PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, C.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Positively charged microemulsions for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1-2, p. 119-123, 2008.

PELTIER, S.; OGER, J. -M.; LAGARCE, F.; COUET, W.; BENOÎT, J. -P. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipidic nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1243-1250, 2006.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470- 491, 2011.

RAO, S.; KRAUSS, N. E.; HEERDING, J. M.; SWINDELL, C. S.; RINGELL, I.; ORR, G. A.; HORWITZ, S. B. 3'-(p-Azidobenzamido) taxol Photolabels the N-terminal 31 Amino Acids of α -Tubulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 5, p. 3132-3134, 1994.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (taxol). **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n.15, p.1004-1014, 1995.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. -C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-443, 2007.

SHARMA, P.; GANTA, S.; DENNY, W. A.; GARG, S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2 p.187-194, 2009.

SHIM, W. S.; KIM, J. -H.; KIM, k.; KIM, Y. -S.; PARK, R. -W.; KIM, I. -S.; KWON, I. C.; LEE, D. S. pH- and temperature-sensitive, injectable, biodegradable block copolymer hydrogels as carriers for paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n.1, p.11-18, 2007.

SINGLA, A. K; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1-2, p. 179-192, 2002.

SKIN CARE FORUM BASF. **Poster Skin Care Forum illustrations**, june 2011. Disponível em: <<http://www.skin-care-forum.basf.com/>> Acesso em 17/10/2013.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n.2, p.308- 312, 2004.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n.1, p.189-196, 2011.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 1, p. 35-40, 2009.

TRICKLER, W. J.; NAGVEKAR, A. A.; DASH, A. K. A. Novel Nanoparticle Formulation for Sustained Paclitaxel Delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 2, p. 486-493, 2008.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

ÜNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 289-300, 2007.

WIERNIK, P. H.; SCHWARTZ, E. L.; EINZIG, A.; STRAUMAN, J. J.; LIPTON, R. B.; DUTCHER, J. P. Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 8, p. 1232-1239, 1987.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

YANG, X. -Y.; LI, Y. -X.; LI, M.; ZHANG, L.; FENG, L. -X.; ZHANG, N. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 338-445, 2013.

YARDLEY, D. A. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 365-372, 2013.

YUAN, H.; MIAO, J.; DU, Y-Z.; YOU, J.; HU, F-Q.; ZENG, S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, n. 1-2, p. 137-145, 2008

ZHANG, J.; SMITH, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 896-903, 2011.