

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LIPOSSOMAS DEFORMÁVEIS PARA ENCAPSULAÇÃO DO BEXAROTENO:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO
E AVALIAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DOS FOSFOLIPÍDEOS DA
MEMBRANA

HALANNA CRISTINA BARBOSA SILVA

GOIÂNIA-GO

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação


Nome completo do autor: Halanna Cristina Barbosa Silva

Título do trabalho: Lipossomas deformáveis para encapsulação do bexaroteno: desenvolvimento, caracterização e avaliação da dinâmica molecular dos fosfolipídeos da membrana.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 26 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

HALANNA CRISTINA BARBOSA SILVA

LIPOSSOMAS DEFORMÁVEIS PARA ENCAPSULAÇÃO DO BEXAROTENO:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO
E AVALIAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DOS FOSFOLIPÍDEOS DA
MEMBRANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientadora: Dr^a Eliana Martins Lima.

GOIÂNIA/GO

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Halanna Cristina Barbosa

Lipossomas deformáveis para encapsulação do bexaroteno: desenvolvimento, caracterização e avaliação da dinâmica molecular dos fosfolípídeos da membrana. [manuscrito] / Halanna Cristina Barbosa Silva. - 2016.

0 67 f.: il.

Orientador: Profa. Dr^a Eliana Martins Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. lipossomas deformáveis. 2. bexaroteno. 3. RPE. 4. permeação cutânea. I. Lima, Dr^a Eliana Martins, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (s): Halanna Cristina Barbosa Silva

Orientador (a): Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Título da Dissertação: "Lipossomas deformáveis para encapsulação do bexaroteno: desenvolvimento, caracterização e avaliação da dinâmica molecular dos fosfolípidos da membrana".

Data: 29 de março de 2016

Horário: 08:30 horas

Local: Sala 03 da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/R e-provado	Assinatura
Profa. Dra. Eliana Martins Lima (FF/UFG) - Presidente	Aprovada	
Prof. Dr. Antônio Alonso (IF/UFG)	APROVADA	
Prof. Dr. Danielle Guimarães Almeida Diniz (FF/UFG)	Aprovada	
Dra. Elisandra Gava de Castro (UFG) - Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado	Aprovada
---------------	--------------------	----------

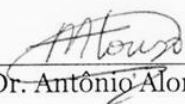
Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 29 de março de 2016, pela mestranda Hallana Cristina Barbosa Silva.

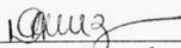
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Eliana Martins Lima (FF/UFG)
Presidente



Prof. Dr. Antônio Alonso (IF/UFG)



Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz (FF/UFG)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por sempre estar comigo e me guiar pelos caminhos da Sua soberana vontade, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais Maria Meneses e Divino Donizete por todo o apoio e amor incondicional.

As minhas irmãs Jordana e Anna Karolina por toda cumplicidade e amizade.

Ao Marcos Paulo por todo amor, carinho e compreensão.

A Prof^a Dr^a Eliana Martins Lima pela oportunidade e confiança na orientação desse trabalho.

A aluna de doutorado Marilisa Gaeti pelo desenvolvimento e validação da metodologia analítica do bexaroteno em HPLC.

Ao Dr^o Rodrigo Molina Martins por auxiliar no desenvolvimento do planejamento fatorial dos lipossomas deformáveis.

Aos professores do Instituto de Física Dr^o Jorge dos Anjos, Dr^o Sebastião Mendanha e Dr^o Antônio Alonso pela realização das análises em RPE e por todo o suporte na composição dos resultados.

A Dr^a Lorena Maione Silva por todo o apoio nos estudos com pele e por todas as demais colaborações.

A Fernanda Bellato, por todo carinho e cuidados.

Aos amigos do FARMATEC Fabiana, Emílio, Iara, Lílian, Wanessa, Kamilla, Priscila e Lígia pela amizade, apoio e convivência inesquecível nesses dois anos.

A todos os estimados colegas do FARMATEC pela companhia e aprendizado técnico que obtive nesses dois anos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de mestrado concedida.

A banca examinadora dedicada a este trabalho.

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

RESUMO

O bexaroteno é um agonista dos receptores retinoides X (RXR) clinicamente utilizado no tratamento de linfoma cutâneo de células T (LCCT). A terapia oral do bexaroteno resulta em efeitos colaterais desagradáveis relacionados ao metabolismo de lipídios, de forma que a via tópica se apresenta como alternativa para administração do bexaroteno, aumentando a concentração de fármaco no sítio alvo. O uso de sistemas nanoestruturados, como por exemplo, os lipossomas deformáveis, pode ser uma alternativa interessante para facilitar ou promover maior permeação cutânea do bexaroteno. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de lipossomas deformáveis de bexaroteno. Para selecionar os componentes da formulação foram avaliados três tensoativos (Span 80, Tween 80 e Span 85) em três concentrações diferentes (5, 10 e 15%). Os lipossomas foram avaliados quanto ao diâmetro médio, PDI e elasticidade. A seguir um planejamento fatorial completo 3^2 com triplicata do ponto central foi aplicado para analisar a influência das variáveis de concentração do etanol e do tensoativo na elasticidade das vesículas. Uma solução global foi proposta mediante análise pelo software Statistica 7.0 aplicando-se a ferramenta desejabilidade e, os lipossomas deformáveis encapsulando bexaroteno foram preparados a partir da resposta obtida. Lipossomas deformáveis foram preparados por hidratação do filme lipídico e extrusão em membrana de policarbonato (200 e 100 nm). A função desejabilidade ofereceu uma solução global com 5,25% (v/v) de etanol e 5% (p/v) de Span 80. Os lipossomas deformáveis obtidos apresentaram eficiência de encapsulação de $99,67 \pm 3,4$ %, diâmetro médio de $93,69 \pm 1,95$ nm e PDI $0,092 \pm 0,02$. Os lipossomas liofilizados indicaram parâmetros de elasticidade superiores as formulações não liofilizadas, com elasticidade de até $215,5 \pm 5,5$ ($\text{mg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) para formulações com sacarose e $22,13 \pm 1,04$ ($\text{mg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) para lipossomas convencionais. Os estudos de RPE demonstraram que as formulações liofilizadas apresentaram maior dinâmica molecular dos lipídios em relação as não liofilizadas em todas as formulações, enquanto nas formulações sem BXT houve maior dinâmica nas formulações em que a sacarose foi utilizada como crioprotetor, nas formulações com BXT ocorre o contrário. Nos estudos de permeação cutânea in vitro, os lipossomas deformáveis de BXT tiveram uma taxa de penetração no EC cerca de 5 vezes superior aos lipossomas convencionais. Dessa forma, os lipossomas deformáveis desenvolvidos se apresentam como potencial promotor de permeação do bexaroteno na pele.

Palavras-chave: lipossomas deformáveis, bexaroteno, RPE, permeação cutânea.

ABSTRACT

Bexarotene is an agonist to retinoid X receptors (RXR) clinically used in cutaneous T cell lymphoma (CTCL). The oral bexarotene therapy results in disagreeable side effects related to lipid metabolism, such that topical administration presents as an alternative to bexarotene use increasing the drug concentration at the target site. Nanostructured systems, such as the deformable liposomes can be an interesting alternative to facilitate or promote increased cutaneous permeation of bexarotene. So, the aim of this study was the development and characterization of deformable bexarotene liposomes. Three surfactants were evaluated for composition of deformable liposomes (Span 80, Tween 80 and Span 85) in different concentrations (5, 10 and 15%). Liposomes were evaluated for average diameter, PDI and elasticity. And then a full factorial design with 3^2 triplicate central point was applied to analyze the influence of variables ethanol concentration and surfactant in the elasticity of the vesicles. A global solution was proposed by analyzing the Statistica 7.0 software applying the desirability tool and the deformable liposomes encapsulating bexarotene were prepared from the obtained response. Deformable liposomes were prepared by lipid film hydration and extrusion polycarbonate membrane (200 and 100 nm). The desirability function provided a global solution with 5.25% (v / v) ethanol and 5% (w / v) Span 80. Deformable liposomes had encapsulation efficiency of $99.67 \pm 3.4\%$, diameter average of 93.69 ± 1.95 nm and PDI 0.092 ± 0.02 . Lyophilized liposomes showed higher elasticity parameters than non-lyophilized formulations, with elasticity up to 215.5 ± 5.5 ($\text{mg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) for formulations with sucrose and 22.13 ± 1.04 ($\text{mg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) for conventional liposomes. EPR studies demonstrated that lyophilized formulations presented higher molecular dynamics of lipids regarding the non lyophilized in all formulations, while the formulations without BXT was most dynamic in formulations in which sucrose was used as cryoprotectant, in formulations with BXT occurs the opposite. In vitro skin permeation studies, BXT deformable liposomes had a penetration rate EC about 5 times greater than the conventional liposomes. Thus, the developed deformable liposomes present as bexarotene the potential permeation enhancer on the skin.

Keywords: deformable liposomes, bexarotene, EPR, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do bexaroteno.....	15
Figura 2- Manifestações cutâneas na MF	18
Figura 3- Apresentações cutâneas na SS	18
Figura 4- Estrutura química do ácido retinóico e bexaroteno	20
Figura 5- Estrutura da pele	21
Figura 6- Representação esquemática dos lipossomas	23
Figura 7- Mecanismos possíveis da permeação de lipossomas na pele	25
Figura 8- Vias de transporte de fármaco através da pele	26
Figura 9- Estrutura química dos marcadores 5-DSA e 16-DSA	35
Figura 10- Disposição das formulações de lipossomas convencionais (LC) e deformáveis (LD) de BXT nas células de difusão de Franz para realização dos estudos de permeação cutânea.....	36
Figura 11- Perfil cromatográfico do bexaroteno gerado a partir da análise do fármaco em etanol na concentração de 100 µg/ml, em HPLC-UV (262 nm)	38
Figura 12- Curva analítica do BXT em etanol nas concentrações de 3-100 µg/ml e coeficiente de variação.....	39
Figura 13- (A) Curva analítica do BXT em etanol na concentração de 0,03-1 µg/ml obtida por análise em HPLC com detecção em fluorescência, usando como fase móvel acetonitrila e TFA 0,1%, 85:15, com fluxo de 0,8 ml/min. (B) Média das concentrações, área sob a curva, desvio padrão e CV.....	39
Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir da análise do EC e PR sem fármaco em relação ao tempo de retenção do BXT em solução etanólica	40
Figura 15- Elasticidade dos lipossomas deformáveis produzidos com Span 80 (S), Span 85 (SP) e Tween 80 (T) nas concentrações de 5, 10 e 15 %	44
Figura 16- Eficiência de encapsulação do BXT em lipossomas deformáveis mantidos a 25 e a 4 °C, durante 30 dias com avaliação nos dias 0, 2, 7, 15 e 30 do estudo	47
Figura 17- Elasticidade dos lipossomas deformáveis de BXT mantidos a 25 e a 4 °C, durante 30 dias com avaliação nos dias 0, 2, 7, 15 e 30 do estudo	48
Figura 18- Espectros experimentais (linha preta) e melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DSA incorporado em lipossomas deformáveis (a e b) e lipossomas convencionais (c e d). Sacarose (parte A) ou trealose (parte B) foram usadas como crioprotetores.....	54

Figura 19- Espectros experimentais (linha preta) e melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DSA incorporado em lipossomas deformáveis (a e b) e lipossomas convencionais (c e d). Com presença de bexaroteno. Sacarose (parte A) ou trealose (parte B) foram usadas como crioprotetores	56
Figura 20- Quantidade de BXT retido no EC e PR ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de exposição da pele a formulações de lipossomas deformáveis e convencionais de BXT	57
Figura 21- Quantidade de BXT difundido para o meio receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) com tempo de coleta em 12 e 24 h de exposição da pele a formulações de lipossomas deformáveis e convencionais de BXT	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estadiamento para a micose fungóide e a Síndrome de Sézary	19
Tabela 2- Planejamento fatorial completo 3 ²	31
Tabela 3- Formulações de lipossomas avaliadas por RPE	34
Tabela 4- Condições estabelecidas nos estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	36
Tabela 5- Recuperação do BXT no EC e PR	40
Tabela 6- Diâmetro médio dos lipossomas obtidos com diferentes proporções de tensoativos e fosfatidilcolina	41
Tabela 7- Valores de PDI dos lipossomas obtidos com diferentes proporções de tensoativos e fosfatidilcolina	42
Tabela 8- Composição e caracterização dos lipossomas deformáveis com Span 80, Tween 80 ou Span 85	43
Tabela 9- Otimização dos lipossomas deformáveis	45
Tabela 10- Resultados da caracterização dos lipossomas deformáveis de bexaroteno	46
Tabela 11- Parâmetros de estabilidade avaliados dos lipossomas deformáveis de bexaroteno mantidos a 25 ou a 4°C, por 30 dias, com avaliação do diâmetro médio, PDI e EE nos dias 0, 2, 7, 15 e 30	47
Tabela 12- Avaliação do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis de BXT antes e após o teste de elasticidade (TE) em membrana de 50 nm	49
Tabela 13- Diâmetro médio e PDI dos lipossomas antes e após a liofilização com uso da sacarose como crioprotetor	50
Tabela 14- Diâmetro médio e PDI dos lipossomas antes e após a liofilização com uso da trealose como crioprotetor	51
Tabela 15- Elasticidade dos lipossomas após a liofilização	52
Tabela 16- Parâmetros de EPR de membranas lipossomais determinados a partir da simulação de melhores ajustes dos espectros obtidos pelos marcadores 5-DSA e 16-DSA em lipossomas não liofilizados, sem crioprotetores, com e sem Span 80	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> – Análise de Variância
BXT	Bexaroteno
CRP	Crioprotetor
CV	Coefficiente de variância
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
EC	Estrato córneo
EE%	Eficiência de Encapsulação
EORTC	Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i> - Balanço Hidrofílico-Lipofílico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INF α	Interferon alfa
ISCL	Sociedade Internacional de Linfoma Cutâneo
LD	Lipossoma deformável
LCCT	Linfoma Cutâneo de Células T
MF	Micose Fungóide
mL	Mililitro
mM	Milli Molar
mm	Milímetros
MPa	Mega Pascal
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Fosfatidilcolina
PdI	Índice de Polidispersão
PUVA	Psoraleno mais Ultravioleta A
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
RXR	Receptor retinóide X
SS	Síndrome de Sézary
TFA	Ácido trifluoroacético
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

SUMÁRIO

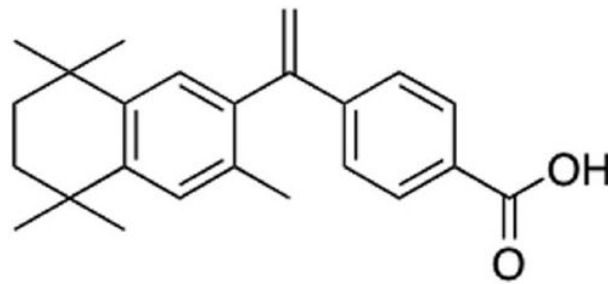
1 APRESENTAÇÃO	15
2 INTRODUÇÃO.....	17
2.1 Linfoma cutâneo de células T	17
2.2 Bexaroteno	20
2.3 A estrutura da pele e a administração tópica de medicamentos	21
2.4 Lipossomas	22
2.4.1 Lipossomas deformáveis	23
2.5 Permeação cutânea	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Metodologia analítica para quantificação do bexaroteno em HPLC	28
4.1.1 Quantificação do bexaroteno em matriz biológica	28
4.1.2 Seletividade do método analítico – análise de possíveis interferentes da matriz biológica	28
4.1.3 Recuperação do BXT nas camadas da pele	29
4.2 Desenvolvimento das formulações de lipossomas	29
4.2.1 Obtenção dos lipossomas convencionais	29
4.2.2 Obtenção dos lipossomas deformáveis	30
4.2.2.1 Seleção do Tensoativo	30
4.2.2.2 Planejamento Experimental	30
4.2.3 Obtenção dos lipossomas deformáveis de bexaroteno	31
4.3 Caracterização dos lipossomas	31
4.3.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão	31
4.3.2 Determinação da elasticidade dos lipossomas deformáveis	32
4.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação	32
4.3.4 Estabilidade dos lipossomas deformáveis de bexaroteno	33
4.4 Estudo de Liofilização dos Lipossomas	33
4.5 Análise das formulações por Ressonância Paramagnética Eletrônica	33
4.6 Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	35

4.6.1 Estudo de solubilidade	35
4.6.2 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Quantificação do bexaroteno por cromatografia líquida de alta eficiência	38
5.1.1 Linearidade	38
5.1.2 Seletividade do método analítico	40
5.1.3 Recuperação do bexaroteno nas camadas da pele	40
5.2 Preparação e Caracterização de Lipossomas Deformáveis sem fármaco	41
5.2.1 Seleção do Tensoativo	41
5.2.2 Planejamento fatorial	45
5.3 Caracterização de lipossomas deformáveis de bexaroteno	45
5.4 Estabilidade dos lipossomas deformáveis de bexaroteno	46
5.5 Liofilização dos lipossomas	49
5.6 Monitoramento da dinâmica molecular dos lipídios na bicamada dos lipossomas	52
5.7 Estudo de solubilidade e verificação da condição sink	57
5.8 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	57
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 APRESENTAÇÃO

O bexaroteno (BXT) é um retinoide de terceira geração quimicamente representado pela Figura 1, é indicado para administração oral no tratamento de recidivas de linfoma cutâneo de células T (LCCT) (SCHADT, 2013), monoterapia de uso tópico em estágios iniciais da doença (NGUYEN e BOHJANEN, 2015) e terapia de manutenção em pacientes em remissão, a fim de prolongar o estado livre de doença (DUMMER et al., 2007).

Figura 1- Estrutura molecular do bexaroteno (HURYN e WIPF, 2014).



O mecanismo de ação exato do bexaroteno é desconhecido, todavia sabe-se que sua atividade ocorre mediante a modulação do receptor retinoide X (RXR), por suprimir a proliferação celular descontrolada e apoptose das células cancerosas. Estudos demonstraram que o bexaroteno também é capaz de inibir a angiogênese e a metástase em tumores sólidos (DRAGNEV et al., 2007; QU e TANG, 2010).

Entretanto, o uso sistêmico do bexaroteno proporciona efeitos colaterais indesejáveis, como a hipertrigliceridemia, hiperlipidemia e hipotireoidismo (TRAUTINGER et al., 2006; WOJDYŁO et al., 2013). Uma estratégia para contornar esses agravantes é o uso tópico do bexaroteno, uma vez que esta via permite a aplicação direta do bexaroteno em seu sítio alvo. Todavia a função barreira da pele, sobretudo na camada córnea, dificulta a permeação cutânea de fármacos, assim, é necessária a incorporação do fármaco em formulações que favoreçam sua penetração no estrato córneo e permeação para as demais camadas da pele (ELIAS e WAKEFIELD, 2015; PRAUSNITZ et al., 2012).

O emprego de lipossomas deformáveis constitui uma alternativa para aumento da penetração de fármacos na pele por atuar como promotores de permeação. Lipossomas deformáveis consistem de vesículas concêntricas de bicamadas lipídicas que apresentam

capacidade elástica, em virtude da adição de um agente capaz de aumentar a fluidez da bicamada lipídica (BOAKYE et al., 2015).

Devido ao incremento proporcionado à penetração cutânea de fármacos, o emprego de lipossomas deformáveis para encapsulação do bexaroteno pode ser uma alternativa promissora para aumentar a permeação do bexaroteno na pele, minimizando reações indesejáveis. Para tanto, este trabalho se objetivou a desenvolver e caracterizar lipossomas deformáveis de bexaroteno, avaliando-os quanto a permeação cutânea e por monitoramento da dinâmica molecular dos fosfolipídios da membrana lipossomal por estudos de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

2 INTRODUÇÃO

2.1 Linfoma cutâneo de células T

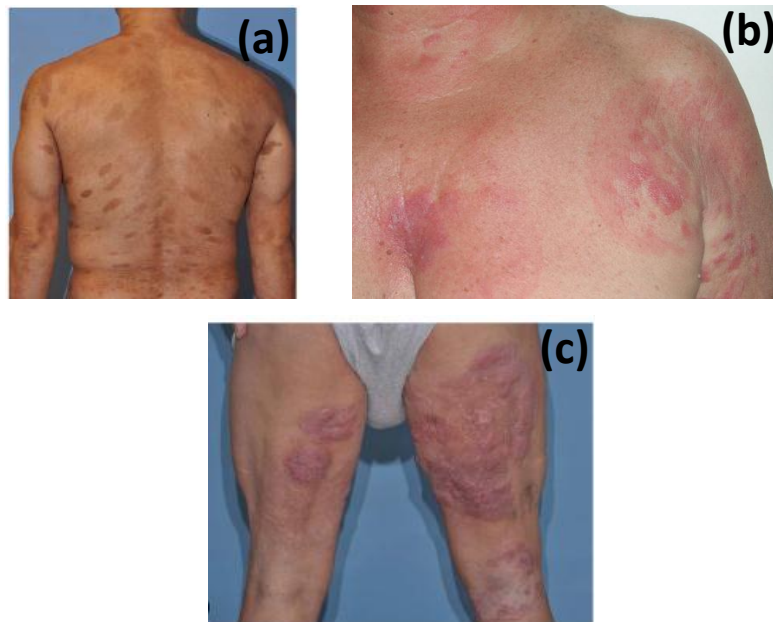
O linfoma cutâneo de células T (LCCT) conforme estabelece a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC), é classificado como linfoma não-Hodgkin e pertence a um grupo heterogêneo de desordens linfoproliferativas extranodais (WILLEMZE et al., 2005).

Após o trato gastrointestinal, a pele é o segundo órgão mais atingido por grupos extranodais de linfoma não-Hodgkin, podendo ocorrer manifestações malignas restritas à pele (linfoma cutâneo primário) ou envolvimento cutâneo com infiltrações sistêmicas (envolvimento extracutâneo) (LEE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011). O diagnóstico para a LCCT é um desafio, faz-se necessário uma combinação da avaliação clínica, de exames imunológicos e caracterização molecular, para um diagnóstico conclusivo (WONG et al., 2011).

A micose fungóide (MF) é a forma mais comum de LCCT, aparece em 44% dos casos de linfoma cutâneo, apresenta comportamento indolente, a princípio apresenta aspectos inespecíficos e variantes que imitam condições benignas da pele, como eczema, psoríase, foliculite, vitiligo, entre outras, o que dificulta o diagnóstico no estágio inicial, uma vez que as lesões são clínica e histologicamente sutis (JAWED et al., 2014; PIMPINELLI et al., 2005).

A MF se apresenta como manchas cutâneas atróficas (Figura 2a) e placas eritematosas (Figura 2b), muitas vezes pruriginosas, em áreas não expostas ao sol (seios, nádegas, tronco inferior e virilha), as placas são bem delimitadas com formato irregular, com a progressão da doença há o aparecimento de tumores (Figura 2c) e, por vezes ocorrem infiltrações. Geralmente, na MF ocorre o surgimento das três lesões, manchas, placas e tumores, concomitantemente.

Figura 2- Manifestações cutâneas na MF: (a) manchas atróficas, (b) placas eritematosas, (c) tumores. (JAWED et al., 2014; SANCHES JÚNIOR et al., 2006).



A síndrome de Sézary (SS) é um tipo agressivo e leucêmico do linfoma de células T, a síndrome é caracterizada por circulação sanguínea de células T neoplásicas e eritroderma generalizado (Figura 3a) e lesões esfoliativas e pruriginosas (Figura 3b), com ou sem associação a linfadenopatia. A SS juntamente com a MF e suas variações representam 53% dos casos de linfoma cutâneo e, demonstram risco aumentado para o aparecimento de câncer secundário, independente do estágio, antes ou após o início da quimioterapia (HALLERMANN et al., 2007).

De forma geral, a MF e a SS não se desenvolvem juntas, todavia há relatos de casos esporádicos em que a MF antecede a SS, assim sendo a Sociedade Internacional de Linfoma Cutâneo (ISCL) recomenda distinção desses casos como Síndrome de Sézary precedida de Micose Fungóide.

Figura 3- Apresentações cutâneas na SS: (a) eritroderma generalizado, (b) lesões esfoliativas. (JAWED et al., 2014)



O estadiamento do linfoma cutâneo é determinado conforme preconiza a EORTEC e a ISCL (Tabela 1), para então o tratamento para a doença ser estabelecido. Para o estadiamento são analisados clinica e histologicamente o comprometimento de quatro parâmetros do corpo: a pele, os linfonodos, as vísceras e o sangue, conforme a Tabela 1 (WHITTAKER e FOSS, 2007; WILLEMZE et al., 2013).

Tabela 1- Estadiamento para a micose fungóide e síndrome de Sézary.

Estágio	T (Pele)	N (Linfonodos)	M (Visceral)	B (Sangue)
IA	1(<10%)	0	0	0-1
IB	2(≥10%)	0	0	0-1
IIA	1-2	1-2	0	0-1
IIB	3	0-2	0	0-1
III	4	0-2	0	0-1
IVA₁	1-4	0-2	0	2
IVA₂	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

T₁: manchas e placas <10% do corpo; T₂: manchas e placas >10% do corpo; T₃: tumor (es); T₄: eritroderma. N₀: ausência de linfonodomegalia; N₁: presença de linfonodomegalia, sem envolvimento histológico. N₂: linfonodomegalia, com envolvimento histológico, sem apagamento da arquitetura do linfonodo. N₃: linfonodomegalia, com envolvimento histológico e apagamento da arquitetura do linfonodo. M₀: sem envolvimento visceral. M₁: com envolvimento visceral. B₀: ausência de células atípicas circulantes (Sézary, linfócitos <5%). B₁: presença baixa de células atípicas circulantes. B₂: presença elevada de células atípicas circulantes (≥1000 U/μl de sangue). Fonte: WILLEMZE et al., 2013; WONG et al., 2011.

A terapia tópica é designada para os estágios iniciais da micose fungóide (IA, IB e IIA), quando a doença é restrita a pele e seu controle é mais viável, uma vez que a média de vida global de 71% dos pacientes nesses estágios está entre 15,8-35,5 anos (AGAR et al., 2010). Por outro lado, o tratamento sistêmico é destinado aos estágios mais graves de MF (IIB, III e IV), em que ocorre infiltração de células sanguíneas ou quando se trata da síndrome de Sézary, devido ao seu comprometimento sistêmico (DUMMER et al., 2007).

No tratamento tópico de MF há uma variedade de terapias que podem ser aplicadas, corticosteroides, quimioterapia tópica por mostardas nitrogenadas, retinóides, fototerapia por UVB ou UVA, radioterapia superficial ou irradiação de corpo inteiro com feixe de elétrons (JAIN et al., 2012; TANDBERG et al., 2015). A terapia tópica é administrada de formas isoladas, como os corticosteroides nos estágios iniciais de grau I e II que conseguem remissão completa entre 25-63% dos casos ou, de forma combinada em pacientes com grau IIB e III, em que os corticosteroides são adjuvantes a uma radioterapia local ou fototerapia (WHITTAKER e FOSS, 2007; WILLEMZE et al., 2013).

As opções de terapia sistêmica se estendem ao uso de retinóides, quimioterápicos (metrotexato, gencitabina), anticorpos monoclonais (alantuzumabe), interferon-alfa (INFα),

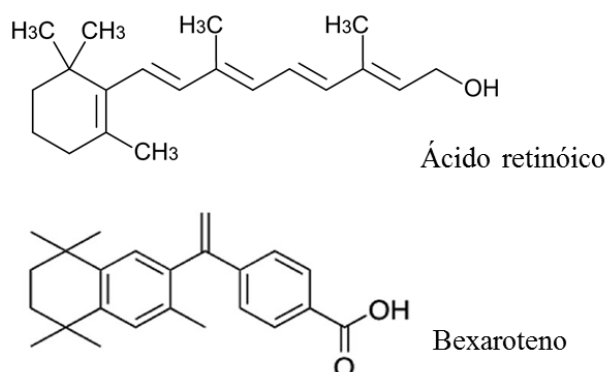
denileucina difitox (ONTAK[®]), voristat e fotoforese. Em virtude da heterogeneidade e raridade de estudos longitudinais em larga escala, não há um tratamento de escolha preconizado pelas associações em saúde, sendo que a terapia a ser administrada fica a critério médico, e as condições para a escolha são múltiplas: estágio do LCCT, tratamento anterior, ocorrência de recidivas, perfil de efeitos colaterais nocivos e capacidade do paciente a suportá-los, bem como conveniência e despesas financeiras (JAIN et al., 2012; MESTEL et al., 2009; POLIGONE e HEALD, 2012).

A remissão clínica significativa e prolongada é o principal objetivo terapêutico no LCCT, independente da terapia tópica, sistêmica ou associações entre ambas. A mostarda nitrogenada (mecloretamina), INF α e o bexaroteno, bem como o tratamento por PUVA apresentaram efeitos satisfatórios no prolongamento das remissões (DUMMER et al., 2007). O bexaroteno e o INF α são candidatos adequados para administração pelo paciente, e somado ao aparecimento de neoplasias secundárias com o uso prolongado, tanto da mecloretamina quanto de PUVA (WILLEMZE et al., 2013; WONG et al., 2011).

2.2 Bexaroteno

O bexaroteno é um composto sintético pertencente à classe dos retinóides que se relaciona estruturalmente à vitamina A (ácido retinóico), Figura 4. Os retinóides regulam processos biológicos de desenvolvimento, diferenciação, proliferação e apoptose das células mediante modulação de receptores do ácido retinóico (RAR) e receptores retinóides X (RXR) (SODHI e SINGH, 2014). As aplicações terapêuticas dos retinóides incluem acne vulgar, fotoenvelhecimento, psoríase e tratamentos antineoplásicos (ALIZADEH et al., 2014; SAMI, 2015).

Figura 4- Estrutura química do ácido retinóico e do bexaroteno. (HURYN e WIPF, 2014).



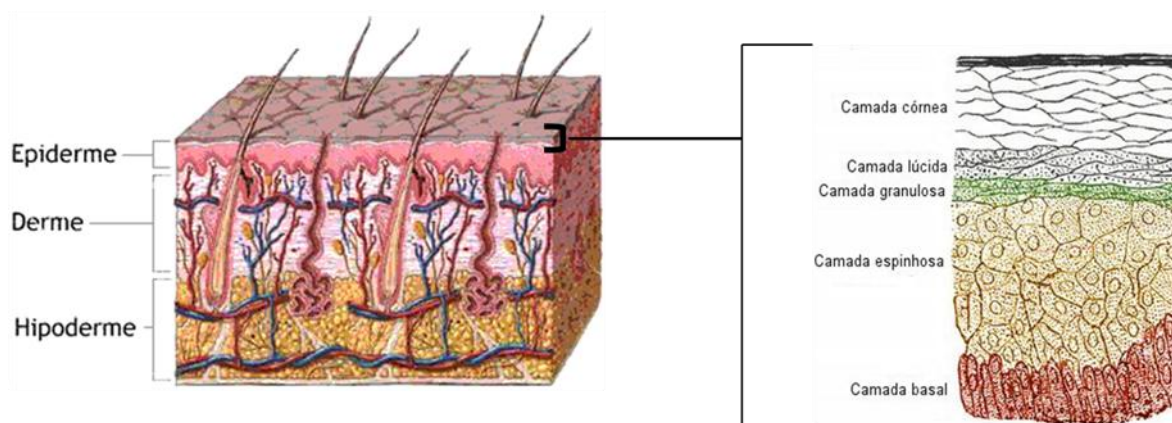
O bexaroteno tem uso preconizado para terapia oral de LCCT refratário ao menos a um tratamento anterior, mas pode ser utilizado na terapia tópica em pacientes com estágios iniciais da doença (I e IIA), bem como na terapia de manutenção em pacientes que obtiveram remissão completa por algum tratamento anterior (HUEN e KIM, 2015; NGUYEN e BOHJANEN, 2015; QU e TANG, 2010).

Uso *off label* do bexaroteno tem sido explorado para câncer de mama e câncer de pulmão de células não pequenas, devido a ação antiangiogênica e anti metástase que são promovidas pela capacidade do bexaroteno impedir a invasão de células tumorais através de células endoteliais (DI MASI et al., 2015; DRAGNEV et al., 2007; YEN et al., 2006).

2.3 A estrutura da pele e a administração tópica de medicamentos

A pele e seus derivados consistem de um órgão complexo, formada por três camadas: hipoderme, derme e epiderme (Figura 5). Sua principal função consiste em formação de barreira de proteção a agentes exógenos, bem como evitar desidratação corpórea, participar da homeostase corporal (regulação térmica), transmissão de informações sensoriais e funções metabólicas (CEVC e VIERL, 2010; CONTRI et al., 2011).

Figura 5- Estrutura da pele. (MAIONE-SILVA, 2012)



A hipoderme ou camada subcutânea gordurosa é formada por tecido conjuntivo e adiposo, atua como proteção mecânica e isolante térmico (ROSS e PAWLINA, 2008). A derme, por sua vez, possui capacidade elástica e flexível que oferece suporte a epiderme, anexos glandulares e folículos, dispõe de uma malha de vasos sanguíneos e linfáticos eficiente em mediar respostas imunológicas (PILLAI et al., 2016). A epiderme é constituída por tecido

epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, não tem vasos sanguíneos e possui 5 camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (ELIAS e WAKEFIELD, 2015).

Os queratinócitos constituem o principal grupo celular encontrado na epiderme, são formados na camada basal e conforme atingem as camadas superiores da epiderme seu DNA é fragmentado e as células são preenchidas por queratina, até que integrem a camada córnea, a qual é formada por células achatadas, queratinizadas e anucleadas, envolvidas por lipídios (PRAUSNITZ et al., 2012). O estrato córneo (EC) é o principal responsável pela função barreira da pele, evitando a perda hídrica e a entrada de substâncias e agentes externos (BARBA et al., 2015).

Há basicamente, três objetivos ao se administrar produtos terapêuticos ou estéticos na pele: a) quando o alvo é apenas a superfície da pele, para casos de desinfecções, proteção solar, repelência a insetos e apelo estético (maquiagem) (TROMMER e NEUBERT, 2006); b) quando a finalidade é a penetração de fármacos na pele para ação local (tópico) ou c) quando o objetivo é a ação sistêmica do fármaco e, neste último caso, a pele é utilizada apenas como via de administração (via transdérmica) (BOAKYE et al., 2015; CONTRI et al., 2011; SILVA et al., 2010).

O uso tópico de medicamentos apresenta como vantagens aumentar a biodisponibilidade do fármaco no sítio alvo por evitar o mecanismo de primeira passagem no fígado, comum em fármacos utilizados pela via oral, permitindo uma ação mais direta do medicamento, que é aplicado no órgão ao qual se destina (BARRY, 2002; MOHAMMED et al., 2014). Além disso, o uso tópico proporciona aumento da adesão ao tratamento em relação a via intravenosa, por ser uma via indolor, não invasiva e que não requer treinamento especializado para aplicação do medicamento (BROWN et al., 2006; LOURENÇO, 2013).

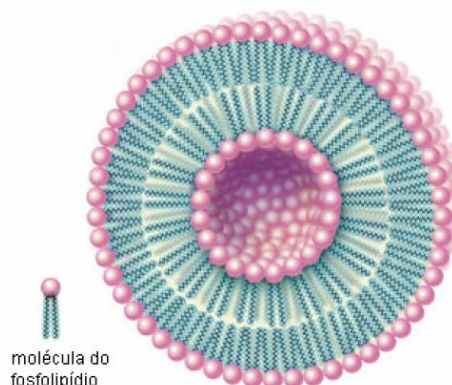
2.4 Lipossomas

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas que envolvem um compartimento aquoso em seu interior (Figura 6). São constituídos basicamente por fosfolipídios e esteróis. Lipossomas podem ser classificados quanto ao número de bicamadas (lamelas), em vesículas multilamelares (MLV) ou unilamelares (ULV), mas também podem ser categorizados quanto ao tamanho em vesículas unilamelares grandes (LUV) ou vesículas unilamelares pequenas (SUV).

Vesículas lipossomais apresentam um comportamento importante para utilização terapêutica, pois permitem encapsular tanto substâncias lipofílicas (bicamada) quanto

substâncias hidrofílicas (interior aquoso), sendo largamente empregadas como *drug delivery systems* (DDS).

Figura 6- Representação esquemática de lipossomas. ©Encyclopedia Britannica, Inc., 2007.



Lipossomas são utilizados como DDS uma vez que são capazes de proporcionar um melhor direcionamento do tratamento terapêutico, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e, preferencialmente, elevando a concentração de fármaco no sítio ativo (ALLEN e CULLIS, 2004; EL KECHAI et al., 2015; PARK, 2014).

2.4.1 Lipossomas deformáveis

Ao longo do tempo, a estrutura dos lipossomas foi aprimorada a fim de se alcançar maior aplicabilidade farmacêutica, como é o caso das formulações destinadas ao uso tópico e transdérmico. Apesar da administração de fármacos através da pele oferecer vantagens em relação ao uso oral, como evitar mecanismo de primeira passagem pelo fígado, e sobre a via intravenosa por administração não invasiva, a administração cutânea também possibilita aplicação do fármaco direto no sítio-alvo (uso tópico). Todavia limitações são encontradas na aplicação cutânea de fármacos, em função da característica de barreira da pele, dificultando a permeação de fármacos por esta via (CEVC e VIERL, 2010; GILLET et al., 2011).

Lipossomas convencionais, constituídos apenas por fosfolípidios e colesterol não são eficientes em penetrar a barreira da pele (CEREDA et al., 2013; EL MAGHRABY et al., 2008). Em 2011, Knudsen e colaboradores mostraram que a rigidez/flexibilidade das membranas dos lipossomas influencia na permeação de fármacos através da pele. O aumento na fluidez da membrana lipossomal ocasiona aumento da flexibilidade e elasticidade dos

lipossomas, isso resulta na formação de lipossomas deformáveis, também conhecidos como lipossomas elásticos ou flexíveis (KNUDSEN et al., 2011).

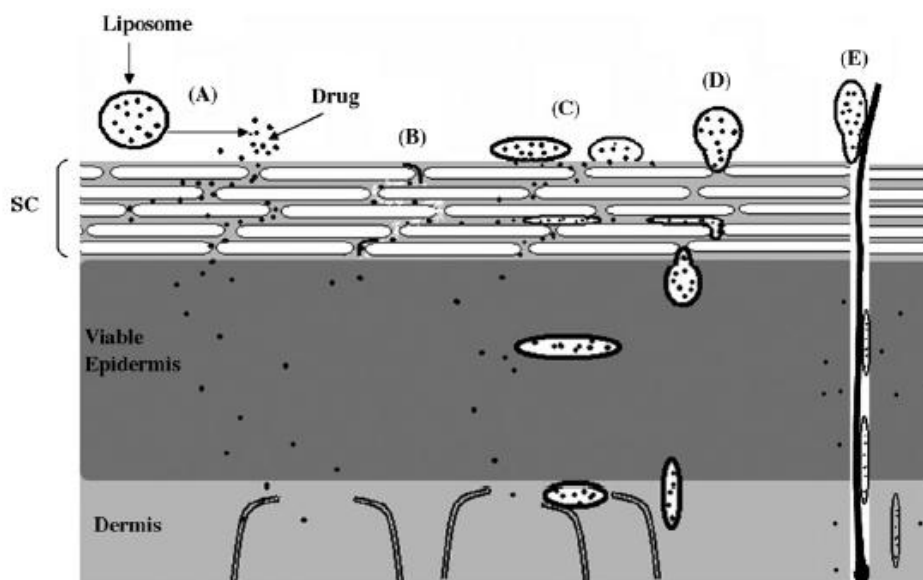
O conceito de lipossomas deformáveis foi introduzido por Cevc e colaboradores em 1992 e, se refere a lipossomas com fosfolipídios e tensoativo de cadeia simples, com alto raio de curvatura, capaz de desestabilizar a bicamada lipídica dos lipossomas ocasionando em aumento da elasticidade dessas vesículas (CEVC, 2012; CEVC e BLUME, 1992; CEVC e BLUME, 2001). Esses lipossomas deformáveis com tensoativo foram chamados de Transfersomas®. Diferentes tipos de tensoativos podem ser adicionados para formação de lipossomas deformáveis, mas em geral são usados tensoativos não-iônicos como, Tween 80, deoxicolato de sódio, Span 80, colato de sódio, Span 85, Tween 60, entre outros (ASCENSO et al., 2014; EL ZAAFARANY et al., 2010; GILLET et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

A adição de etanol em lipossomas também consiste em uma forma de aumentar a fluidez da bicamada lipídica, aumentando a elasticidade e favorecendo a permeação cutânea de fármacos (MAHESHWARI et al., 2012; MANCA et al., 2014; TOUITOU et al., 2000). A incorporação de etanol em lipossomas foi inicialmente introduzida por Touiton e colaboradores em 2000, os quais nomearam esses lipossomas de etossomas. Recentemente, a fim de englobar características de Transfersomas® e dos etossomas, formulações de lipossomas compostos por fosfolipídios, ácido oleico, tensoativo e etanol foram nomeados como transetossomas.

Os lipossomas deformáveis são empregados com a finalidade de aumentar a permeação cutânea de fármacos, todavia a forma como as vesículas lipossomais contribuem para esse aprimoramento da permeação de fármacos através da pele permanece em discussão. Conforme inicialmente proposto por Cevc e Blume 1992, a maior penetração do fármaco na pele quando encapsulado em lipossomas deformáveis deve-se à travessia das vesículas pelos tecidos cutâneos de forma intacta (CEREDA et al., 2013; DARWHEKAR et al., 2012).

Por outro lado, postula-se que as vesículas elásticas, bem como seus componentes trabalhem como promotores de permeação efetivos e, o aumento de fármaco dentro da pele se dá em virtude disso (Figura 7B e 7C). (COSCO et al., 2015; GILLET et al., 2011; MANCONI et al., 2011).

Figura 7- Mecanismos possíveis da permeação de lipossomas deformáveis na pele. A) As vesículas atuam apenas como carreadores e, o fármaco livre permeia a pele. B) Os constituintes da formulação atuam como potenciadores da permeação. C) As vesículas se fundem com o estrato córneo (EC) e o fármaco livre permeia a pele. D) A vesícula elástica atravessa a pele de forma intacta. E) Os lipossomas penetram na pele via folículos pilosos (EL MAGHRABY et al., 2008).



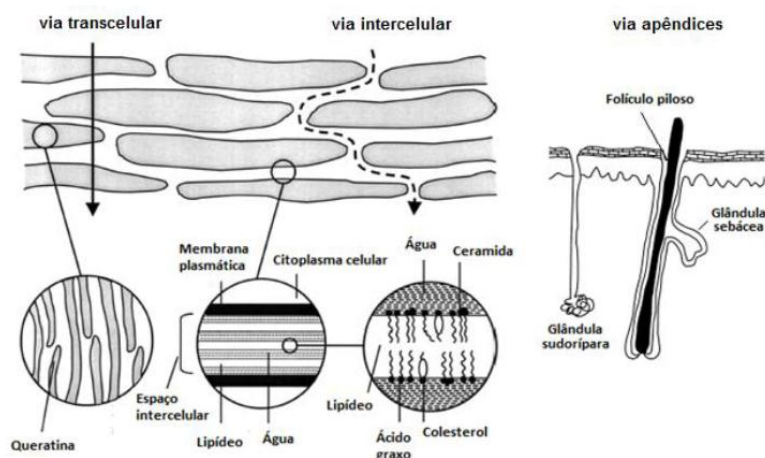
Para Cevc e colaboradores 2001 a elasticidade garante às vesículas penetração na pele de forma intacta (Figura 7D) através de um gradiente de hidratação proporcionado pelas vesículas na superfície do estrato córneo (EC), culminando na abertura de poros entre as junções intercelulares da barreira, permitindo a entrada das vesículas elásticas. Enquanto Vázquez-González e colaboradores (2014) postularam a hipótese da sobreposição em bicamadas planares dos lipossomas sobre o EC, formando um filme oclusivo que tornaria a pele mais permeável a passagem dos lipossomas deformáveis (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2014).

2.5 Permeação cutânea

A atividade do fármaco em um tratamento cutâneo é dependente de sua penetração na pele através do estrato córneo (EC). O transporte de substâncias através do EC pode ocorrer por três formas: via apêndices, transcelular e intercelular (Figura 8). Os apêndices ocupam apenas 0,1% da superfície corporal, de modo que sua contribuição na permeação é considerada baixa. Na via intercelular, a difusão do fármaco acontece por entre os

corneócitos, contornando-os pela matriz lipídica, enquanto na via transcelular o fármaco se difunde através dos corneócitos e da matriz lipídica.

Figura 8- Vias de transporte de fármaco através da pele. Adaptado de Moser et al., 2001.



A principal forma de se aumentar a penetração de fármaco no EC é através do uso de promotores de permeação, que podem ser físicos ou químicos. Entre os promotores de permeação físicos se encontram as microagulhas (PRAUSNITZ, 2004; TUAN-MAHMOOD et al., 2013), iontoforese (ARTUSI et al., 2004; DEL RIO-SANCHO et al., 2012), sonoforese (MITRAGOTRI et al., 1996; POLAT et al., 2010), eletroporação (CHAROO et al., 2010; WONG et al., 2008) e oclusão. Promotores de permeação químicos podem ser solventes, como álcoois e poliálcoois; tensoativos aniônicos, catiônicos ou não iônicos; terpenos; óleos e formulações farmacêuticas, como géis, cremes e pomadas (MOGHADAM et al., 2013; MUTALIK e UDUPA, 2003; SOM et al., 2012).

Neste contexto, as formulações de lipossomas deformáveis são interessantes por atuar tanto como promotores de permeação físicos, por permitir a oclusão sobre o tecido cutâneo quanto como promotor químico, devido a consistir em uma formulação farmacêutica especializada para o direcionamento do *delivery* cutâneo e, também por possuir tensoativo e álcoois em sua constituição.

Dessa forma, o uso de lipossomas deformáveis compostos por etanol e tensoativo para encapsular o bexaroteno consiste em uma alternativa promissora para aprimorar a penetração cutânea do BXT, aumentando a biodisponibilidade cutânea e minimizando efeitos colaterais desagradáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar lipossomas deformáveis de bexaroteno.

3.2 Objetivos específicos

- Delineamento das formulações de lipossomas deformáveis.
- Encapsulação do bexaroteno nos lipossomas deformáveis desenvolvidos.
- Caracterização dos lipossomas deformáveis de bexaroteno.
- Análise da influência dos componentes da formulação na fluidez da bicamada lipídica por RPE.
- Estudo de permeação das formulações de lipossomas convencionais e deformáveis de bexaroteno.

4 METODOLOGIA

4.1 Metodologia analítica para quantificação do bexaroteno

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-Visível foi utilizada como método para quantificação do bexaroteno. Sendo as análises realizadas em cromatógrafo VARIAN, equipado com amostrador automático ProStar 410, detector de UV-Visível ProStar 310 e bomba quaternária modelo ProStar 240. Como fase estacionária utilizou-se uma coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (100x4,6 mm) 3,5µm, mantida a 40°C por forno externo. A detecção do bexaroteno ocorreu em 262 nm (HOWELL et al., 2001).

A fase móvel utilizada foi acetonitrila e ácido trifluoracético (TFA) 0,1% na proporção 85:15 (v/v) com fluxo de 0,8 mL/minuto. Os dados foram processados através do *software* Galaxie Chromatography Data System.

Cada conjunto de amostras analisadas se utilizou da preparação de uma curva analítica, preparada em triplicata, com soluções etanólicas de bexaroteno de 3-100 µg/mL.

4.1.1 Quantificação do bexaroteno em matriz biológica

Durante a realização dos testes em matriz biológica, o bexaroteno foi quantificado conforme o método descrito acima, mas com detecção por fluorescência. A excitação e detecção foram de 262 e 430 nm, respectivamente. Cada conjunto de amostras analisadas se utilizou da preparação de uma curva analítica, preparada em triplicata, com soluções etanólicas de bexaroteno de 0,03 a 1 µg/mL, em triplicata.

4.1.2 Seletividade do método analítico – análise de possíveis interferentes da matriz biológica

Peles de orelhas de porco foram utilizadas como modelo da pele humana na realização de estudos de permeação cutânea devido as suas propriedades similares a pele de humanos, tais como, espessura do estrato córneo, características bioquímicas e densidade de folículos pilosos. Para avaliar os possíveis interferentes da pele no método analítico de quantificação do BXT, as camadas da pele foram separadas pela técnica de *tape stripping*.

O *tape stripping* consiste em uma técnica de separação do estrato córneo (EC) das demais camadas da pele (pele remanescente-PR) através de aplicações sucessivas de fitas adesivas no EC, que fica aderido na superfície da fita.

Para verificação da seletividade, tanto as fitas contendo o EC quanto a PR foram acondicionadas em tubos falcon, separadamente. Foram adicionados 2,5 ml de etanol. Os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto e levados ao banho de ultrassom por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas e analisadas em HPLC com o mesmo método de quantificação do BXT (detecção por fluorescência). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.1.3 Recuperação do BXT nas camadas da pele

A recuperação do BXT nas camadas da pele foi avaliada a partir da razão entre a quantidade de BXT extraída da pele contaminada (detectada pelo método analítico) com a quantidade conhecida de fármaco, expressa em porcentagem. Para tanto, amostras sem fármaco de EC e PR foram contaminadas com 500 µl de uma solução de BXT (2,5 µg/ml) em etanol, em triplicata. Após completa evaporação do solvente, as amostras de EC e PR com BXT foram submetidas à extração por etanol, com agitação vórtex por 1 minuto e levadas ao banho de ultrassom por 20 minutos. A adição de 2,5 ml de etanol resultou na concentração teórica de 0,5 µg/ml.

4.2 Desenvolvimento das formulações de lipossomas

4.2.1 Obtenção dos lipossomas convencionais

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico sucedido por extrusão em membrana de policarbonato, ambos em temperatura ambiente. Para formação dos lipossomas convencionais a fase orgânica foi composta por fosfatidilcolina de soja (PC) em 25 mM dissolvida em clorofórmio.

Uma solução mãe de 100 mg/mL de PC em clorofórmio foi preparada e, uma alíquota de 1 ml foi colocada em balão de fundo redondo, juntamente com 2 mL de clorofórmio para formação do filme lipídico, por rota evaporação do solvente orgânico.

O filme lipídico foi hidratado com 5 ml de água ultrapurificada (milli-Q) por 20 minutos, a seguir houve agitação em vórtex até completo desprendimento do filme com a

formação de vesículas multilamelares. Realizou-se então a extrusão da formulação em 2 ciclos com 10 repetições cada, o primeiro em membrana de policarbonato com poros de 200 nm de diâmetro e o segundo em membranas com poros de 100 nm, ambos sob pressão de 1 MPa (megapascal).

4.2.2 Obtenção dos lipossomas deformáveis

4.2.2.1 Seleção do Tensoativo

Diferentes tensoativos foram incorporados, separadamente, ao filme lipídico com objetivo de observar possíveis variações na elasticidade, tamanho médio e PDI dos lipossomas. Foram testados em três concentrações diferentes (5, 10 e 15 %), o Tween 80, Span 80 e Span 85. As proporções de fosfatidilcolina utilizadas foram complementares a concentração de tensoativo, 95, 90 e 85% (p/p). Os filmes foram formados por rota evaporação, hidratados com 5 ml de água e extrusados conforme metodologia descrita no item 4.2.1.

4.2.2.2 Planejamento Experimental

O planejamento fatorial é um planejamento experimental multivariável que possibilita a obtenção de muitas informações usando menos experimentos, em relação ao uso de estudos univariáveis (KUMAR e GOINDI, 2014). Sendo que a função desejabilidade é um modelo matemático utilizado para otimizar experimentos multivariáveis permitindo encontrar condições que forneçam a resposta mais desejada por combinações de múltiplas respostas, a partir de limites anteriormente estabelecidos.

A fim de se avaliar a contribuição das variáveis, etanol e tensoativo, na elasticidade das formulações lipossomais, foi realizado um planejamento fatorial completo do tipo 3^2 com duplicata do ponto central (Tabela 2). Em que, as variáveis trabalhadas, tensoativo e etanol, são denominadas fatores e, as concentrações os quais se encontram são retratadas como níveis e, codificados para o *software* em nível alto (+1), médio (0) e nível baixo (-1).

Tabela 2- Planejamento Fatorial completo 3².

Experimentos	Etanol (%)	TA (%)	Níveis Codificados	
			X ₁	X ₂
1	5	5	-1	-1
2	5	10	-1	0
3	5	15	-1	+1
4	20	15	+1	+1
5	20	10	+1	0
6	20	5	+1	-1
7	12,5	5	0	-1
8	12,5	15	0	+1
9	12,5	10	0	0
10	12,5	10	0	0
11	12,5	10	0	0

As concentrações estabelecidas de tensoativo (5, 10 e 15%) e etanol (5, 12,5 e 20%), permitiram um planejamento fatorial completo com o total de 11 experimentos, a fim de avaliar a contribuição dessas variações para a elasticidade dos lipossomas (resposta mais desejada).

O software Statistica 7.0 foi utilizado para gerar o planejamento fatorial e tratamento dos resultados.

4.2.3 Obtenção dos lipossomas deformáveis de bexaroteno

Baseado na solução global oferecida pelo planejamento experimental, concentrações progressivas de bexaroteno foram testadas, adicionando-se à fase orgânica da preparação para formação do filme lipídico conforme descrito no item 4.1.1.

4.3 Caracterização dos lipossomas

4.3.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

O diâmetro médio e índice de polidispersão (PdI) dos lipossomas deformáveis foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*- DLS), através do equipamento ZetaSizer NanoS (Malvern Instruments, Reino Unido). As leituras foram feitas em água ultrapurificada (1:10).

4.3.2 Determinação da elasticidade dos lipossomas deformáveis

A elasticidade dos lipossomas foi analisada a partir da metodologia descrita por IRFAN et al., 2012 com modificações. Dois mL de cada formulação foram submetidos ao processo de extrusão em membrana de policarbonato de 50 nm, uma única vez, sob pressão de 1 MPa por um período máximo de cinco minutos. A determinação da elasticidade dos lipossomas foi obtida pela equação 1.

$$E = J \cdot \left(\frac{d_p}{d_v}\right)^2 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: E corresponde à elasticidade (mg. s². cm²), J é a taxa de penetração através da membrana (Equação 2), d_p é o diâmetro médio das partículas após a extrusão e, d_v é o diâmetro dos poros da membrana empregada (50 nm).

$$J = \frac{m}{t \cdot A} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que, m é a massa em mg de formulação após o processo de extrusão, t é o tempo em segundos que a formulação levou para passar através da membrana, A é a área da membrana de policarbonato em cm².

4.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) dos lipossomas de bexaroteno foi realizada por centrifugação de 1 ml da formulação por 15 minutos a 14500 rpm e 15 minutos a 8000 rpm, sucessivamente. Uma alíquota de 100 µl foi retirada do líquido sobrenadante e diluída em 1000 µl de etanol. As amostras foram quantificadas em HPLC e a EE% calculada através da equação 3.

$$EE = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \quad \text{Eq.(3)}$$

Onde EE corresponde a eficiência de encapsulação em porcentagem, C_e é a concentração experimental e C_t é a concentração teórica.

4.3.4 Estabilidade dos lipossomas deformáveis de bexaroteno

A estabilidade dos lipossomas deformáveis de bexaroteno aconteceu com experimentos em triplicata, mediante avaliação das formulações mantidas em refrigerador a 4°C e a temperatura ambiente a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 30 dias. As formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão (PdI), eficiência de encapsulação (EE) e elasticidade, após o preparo, 2, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

4.4 Estudo de Liofilização dos Lipossomas

Para o preparo de lipossomas liofilizados foram avaliadas diferentes concentrações dos crioprotetores, sacarose e trealose, separadamente, em quatro proporções fosfatidilcolina:crioprotetor (PC:CRP), 1:2, 1:3, 1:4 e 1:6.

Três formulações foram preparadas, uma de lipossoma convencional e outras duas de lipossomas deformáveis. As formulações de lipossomas deformáveis diferem quanto à hidratação do filme lipídico, enquanto um filme lipídico foi hidratado com solução hidroalcoólica 5,25%, o outro o foi com água milli-Q, a fim de se avaliar a interferência do álcool no processo de liofilização dos lipossomas deformáveis. Ambas as preparações foram ressuspensas com solução hidroalcoólica 5,25%, sendo que o crioprotetor foi adicionado durante a fase de hidratação do filme lipídico.

Após a extrusão, 2 ml dos lipossomas deformáveis foram mantidos em freezer a -22°C por 12 horas. As amostras foram colocadas, congeladas, no liofilizador (Micromodulyo, Thermo Scientific, USA), sob baixa pressão e temperatura, e mantidas por 24 horas. Ao final da liofilização, as formulações, agora em pó, foram retiradas do liofilizador. No dia seguinte foram ressuspensas com água (lipossomas convencionais) e solução hidroalcoólica 5,25% (lipossomas deformáveis) e, reavaliadas quanto ao tamanho médio, PdI e elasticidade.

4.5 Análise das formulações por Ressonância Paramagnética Eletrônica

A estrutura e fluidez da bicamada lipídica podem ser estudadas mediante aplicação da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE ou EPR- *electron paramagnetic resonance*). Biomoléculas como os lipídios não possuem elétrons desemparelhados, todavia o monitoramento da dinâmica molecular da fosfatidilcolina, presente em lipossomas, pode

ocorrer através da associação a uma molécula com radical livre estável, denominadas marcadores de spin (KONOV et al., 2015; STONE et al., 1965).

Os marcadores de spin apresentam espectros de RPE que informam dados relacionados ao ambiente molecular em que estão inseridos (TOSTA et al., 2014). É possível que a adição de açúcares de cadeia curta, como a sacarose (KONOV et al., 2015) e a trealose (LUZARDO et al., 2000) possa influenciar na dinâmica molecular dos lipídeos.

Dessa forma, e em vista do emprego desses dissacarídeos como crioprotetores na liofilização de formulações lipossomais, foi realizado um estudo para avaliar a influência dos componentes da formulação e o processo de liofilização na fluidez da bicamada lipídica dos lipossomas por análise de RPE.

Na Tabela 3, está descrito as formulações avaliadas por RPE, considerando as variáveis presença e ausência de Span 80, sacarose, trealose e o processo de liofilização. Além disso, a influência do bexaroteno na fluidez da bicamada lipídica dos lipossomas também necessitou de avaliação, de forma que as formulações da Tabela 3 foram realizadas com e sem bexaroteno, totalizando 20 formulações.

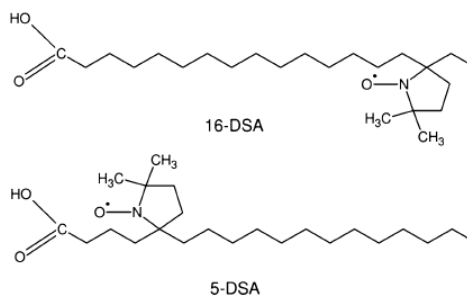
Tabela 3- Formulações de Lipossomas avaliadas por EPR.

Formulação	Componentes			
	Span 80	Sacarose	Trealose	Liofilização
1	X	X	-	-
2	-	X	-	-
3	X	-	X	-
4	-	-	X	-
5	X	-	-	-
6	-	-	-	-
7	X	X	-	X
8	-	X	-	X
9	X	-	X	X
10	-	-	X	X

X: presente na formulação. -: ausente na formulação.

Os marcadores utilizados foram o análogo do ácido esteárico 5-doxil-estearato (5-DSA) e o 16- doxil-estearato (16-DSA) (Figura 9), separadamente. Foi adicionado 1µl de uma solução a 5mg/ml do 5-DSA a durante a fase de formação do filme lipídico. Contudo, antes da leitura no RPE as amostras precisaram ser remarcadas, o mesmo marcador, com a mesma concentração. As marcações com o 16-DSA procederam da mesma forma que para o 5-DAS.

Figura 9- Estrutura química dos marcadores 5-DSA e 16-DSA. (TOSTA et al., 2014).



As análises foram realizadas em um espectrômetro ESP Bruker 300 (Rheinstetten) com uma cavidade ressonante ER 4102 ST ajustado com as seguintes configurações: potência de microondas, 2 mW, frequência de modulação, 100 KHz, amplitude de modulação, 1,0 G, campo magnético de varredura, 100 G.

Os espectros teóricos foram ajustados aos espectros experimentais usando modelos com um e dois componentes espectrais, para o marcador 16-DSA e 5-DSA, respectivamente. Os valores dos tensores magnéticos g e A utilizados foram $g_{xx}(1) = 2.0088$; $g_{yy}(1) = 2.0058$; $g_{zz}(1) = 2.0028$; $A_{xx}(1) = 6.6$; $A_{yy}(1) = 6.5$; $A_{zz}(1) = 33.0$; $g_{xx}(2) = 2.0088$; $g_{yy}(2) = 2.0058$; $g_{zz}(2) = 2.0026$; $A_{xx}(2) = 5.5$; $A_{yy}(2) = 5.5$; e $A_{zz}(2) = 30.8$. Onde, os números (1) e (2) referem-se ao primeiro e segundo componente espectral (CAMARGOS e ALONSO, 2013; MENDANHA e ALONSO, 2015). Todas as medições foram realizadas a temperatura ambiente.

4.6 Estudos de permeação cutânea *in vitro*

4.6.1 Estudo de solubilidade

Antes da realização dos estudos de permeação cutânea é necessário fazer um estudo de solubilidade do fármaco, a fim de que seja assegurada a condição *sink*, em que o volume de solução utilizado nos experimentos não favoreça proximidade à saturação do fármaco.

A solubilidade do BXT foi determinada em água:etanol (50:50, v:v) através da preparação de uma solução saturada de BXT mantida em agitação orbital (300 rpm) por 24 horas em mini-incubadora a 37°C. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 μ m, diluída e quantificada por HPLC. O estudo foi realizado em triplicata.

4.6.2 Permeação cutânea *in vitro*

A permeação cutânea *in vitro* foi realizada em células de difusão vertical do tipo Franz, acopladas ao sistema de permeação da Hanson Research (Hanson Research Corporation). Foram adicionados no compartimento doador das células de difusão 250 µl das formulações de lipossomas deformáveis de BXT e lipossomas convencionais de BXT. Ambas as formulações tinham a mesma concentração de bexaroteno, 0,5 mg/ml, resultando em um total de 0,15 mg de bexaroteno em cada compartimento doador. As formulações foram dispostas nas células de Franz, conforme na Figura 10 (FDA, 1997). As demais condições experimentais estão expostas na Tabela 4.

Figura 10- Disposição das formulações de lipossomas convencionais (LC) e deformáveis (LD) de bexaroteno nas células de difusão de Franz para realização do estudo de permeação cutânea.

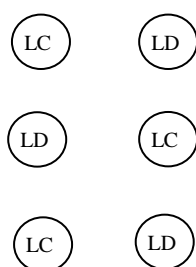


Tabela 4- Condições estabelecidas nos estudos de permeação cutânea *in vitro*.

Agitação	300 rpm
Temperatura	37°C
Volume de coleta	1 ml
Volume de rinse	1 ml
Volume do compartimento doador	300 µl
Volume do compartimento receptor	6,7 ml
Área de difusão	1,86 cm ²
Concentração de BXT no compartimento doador	0,15 mg

As orelhas de porco foram coletadas imediatamente após o abate dos animais e a pele foi removida da cartilagem com um bisturi. A pele foi armazenada a -80°C por no máximo 30 dias. Para os experimentos de permeação a pele foi colocada com o estrato córneo voltado para cima entre os dois compartimentos da célula de Franz (doador e receptor). Os estudos de permeação foram realizados por 24 horas, com duas coletas do meio receptor, em 12 e 24 horas.

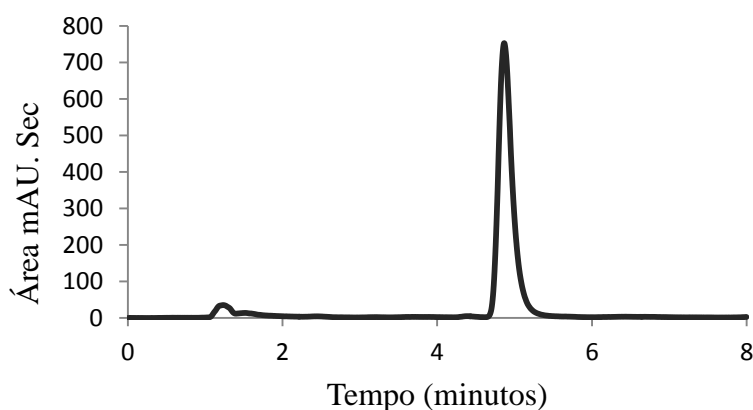
Ao final do experimento a pele foi removida da célula, lavada com água ultrapurificada, colocada em uma superfície lisa com o EC voltado para cima e, então submetida à técnica de *tape stripping* para separação do EC e PR, a fim de determinar a quantidade de fármaco retido mediante a extração conforme descrito no tópico 4.1.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação do bexaroteno por cromatografia líquida de alta eficiência

Ambos detectores utilizados (UV-Vis e fluorescência) para quantificar o bexaroteno, apresentaram método com tempo de corrida de 8 minutos e tempo de retenção do fármaco em 5 minutos como mostra a Figura 11. O tempo correspondente ao volume morto da corrida foi de 1,04 minutos. As condições aplicadas do método geraram um tempo de corrida curto, possibilitando a quantificação do bexaroteno de forma rápida e eficiente.

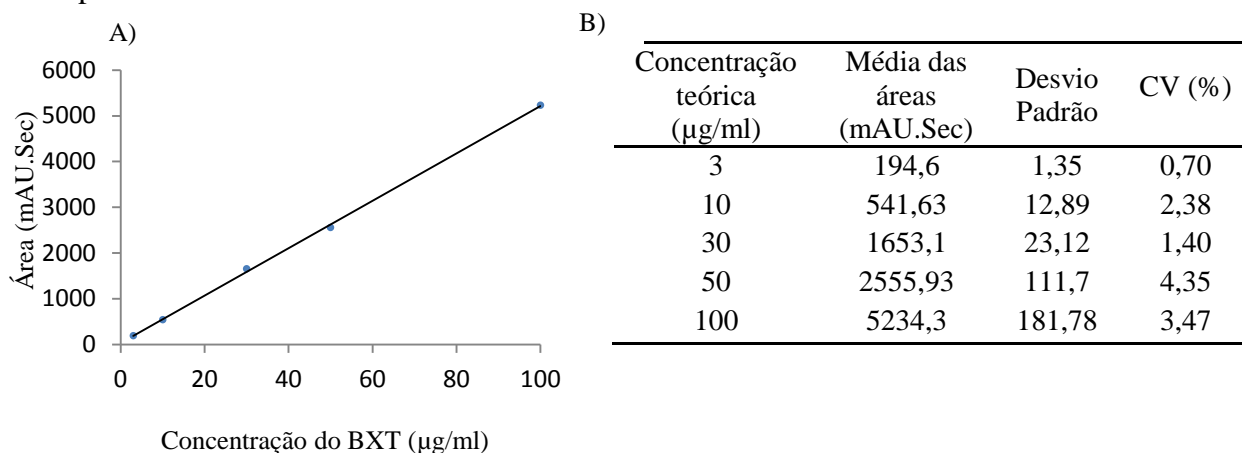
Figura 11- Perfil cromatográfico do bexaroteno gerado a partir da análise do fármaco em etanol na concentração de 100 µg/ml, em HPLC-UV (262 nm).



5.1.1 Linearidade

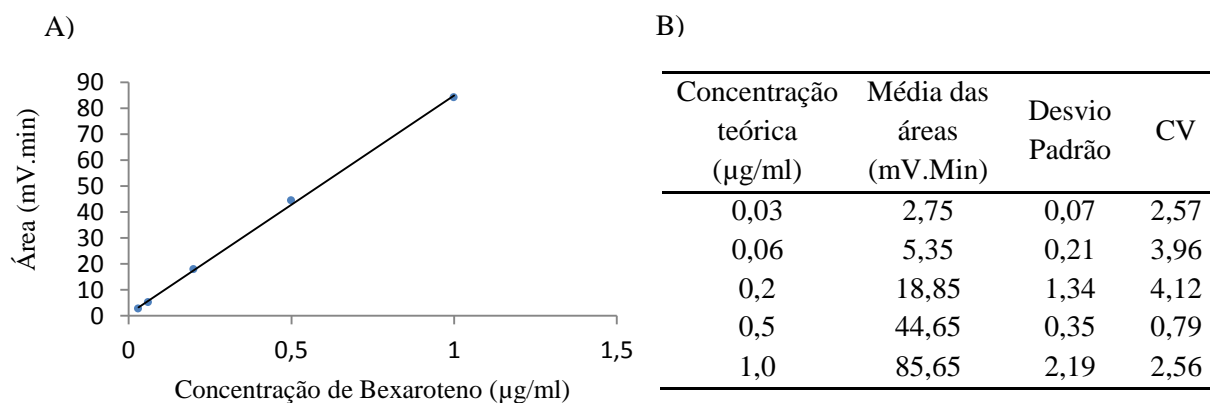
A curva de calibração obtida pela plotagem da área do pico versus a concentração do bexaroteno em etanol, pelo método de detecção em UV-Vis, é demonstrada na Figura 12 A. Os valores das médias das áreas e o coeficiente de variação (CV) são apresentados na Figura 12 B. A equação da reta obtida foi de $y=51,804x + 36,292$, com coeficiente de correlação igual a 0,999. Todas as concentrações apresentaram CV menor que 5%, como preconizado pela Resolução 899 da ANVISA, 2003. Portanto, o método se mostrou linear na faixa analisada.

Figura 12- (A) Curva analítica do BXT em etanol na faixa de concentração de 3-100 $\mu\text{g/ml}$ obtida por análise em HPLC com detecção em UV-Vis, usando como fase móvel acetoneitrila e TFA 0,1%, 85:15, com fluxo de 0,8 ml/min. (B) Média das concentrações, área sob a curva, desvio padrão e CV.



A curva de calibração obtida pela plotagem da área do pico versus a concentração do bexaroteno em etanol, pelo método de detecção em fluorescência, é demonstrada na Figura 13 A. Os valores das médias das áreas e o coeficiente de variação (CV%) são apresentados na Figura 13 B. A equação da reta obtida foi de $y=84,19x + 0,7198$, com coeficiente de correlação igual a 0,9992. Todas as concentrações apresentaram CV menor que 5%, como preconizado pela Resolução 899 da ANVISA, 2003. Portanto, o método se mostrou linear na faixa analisada.

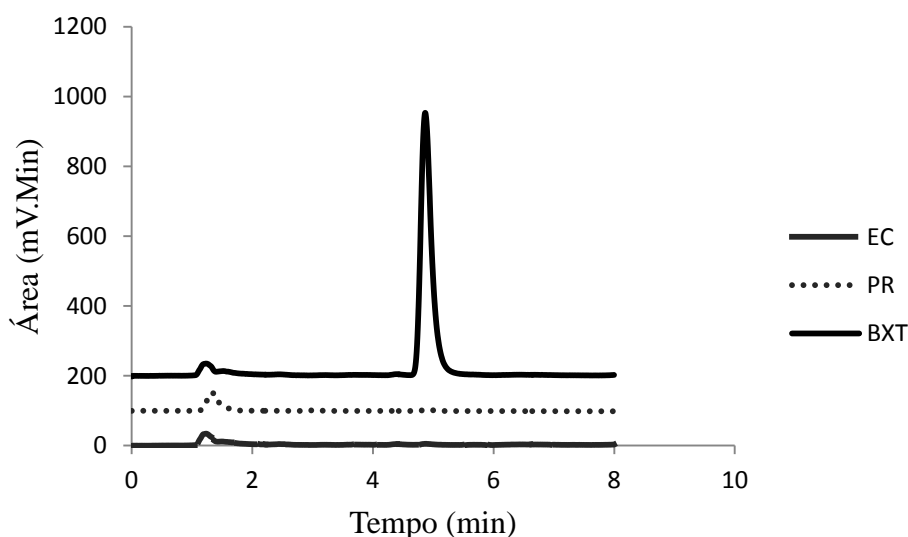
Figura 13- (A) Curva analítica do BXT em etanol na concentração de 0,03-1 $\mu\text{g/ml}$ obtida por análise em HPLC com detecção em fluorescência, usando como fase móvel acetoneitrila e TFA 0,1%, 85:15, com fluxo de 0,8 ml/min. (B) Média das concentrações, área sob a curva, desvio padrão e CV.



5.1.2 Seletividade do método analítico

A seletividade de um método analítico é dada pela capacidade em analisar uma substância mesmo na presença de outros componentes, sem que haja interferência. Os cromatogramas obtidos pela análise dos produtos de extração do estrato córneo (EC) e pele remanescente (PR) por HPLC com o mesmo método analítico que o bexaroteno, estão apresentados na Figura 14. Pode-se observar que não há presença de interferentes da pele no tempo de retenção do BXT.

Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir da análise do EC e PR sem fármaco em relação ao tempo de retenção do BXT em solução etanólica.



5.1.3 Recuperação do bexaroteno nas camadas da pele

O método de extração se mostrou eficiente e capaz de efetuar a recuperação do BXT nas camadas da pele (EC e PR), como observado na Tabela 5. Os estudos de recuperação da pele são de fundamental importância, pois componentes da pele como proteínas e lipídios podem interagir com o fármaco em estudo, levando a baixa extração do fármaco da matriz biológica.

Tabela 5- Recuperação do BXT no EC e PR.

Camadas da pele	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração obtida (µg/ml)	Recuperação (%)
EC	0,5	0,57 ± 0,05	114,69 ± 10,07
PR	0,5	0,55 ± 0,02	110,02 ± 4,92

5.2 Preparação e Caracterização de Lipossomas Deformáveis sem fármaco

5.2.1 Seleção do Tensoativo

Com o intuito de estudar a influência de diferentes tensoativos nas características de elasticidade dos lipossomas deformáveis, formulações lipossomais foram preparadas usando Span 80, Span 85 e Tween 80. A escolha desses tensoativos foi feita com base nas propriedades de elasticidade que estes conferem aos lipossomas (EL ZAAFARANY et al., 2010; ELSAYED et al., 2006; KUMAR et al., 2013; RATTANAPAK et al., 2012)

O tamanho médio das vesículas lipossomais está demonstrado na Tabela 6. Os valores variaram de $103,1 \pm 3,32$ a $91,44 \pm 1,78$ nm. O tratamento estatístico por ANOVA mostrou que não houve diferença nos valores de tamanho dos lipossomas, com exceção do experimento usando 15 % de Tween 80, sendo que, nessa concentração, os lipossomas apresentaram tamanho de $91,44 \pm 1,78$ nm.

Tabela 6- Diâmetro médio dos lipossomas obtidos com diferentes proporções de tensoativos e fosfatidilcolina.

PC:TA	Diâmetro Médio (nm)		
	Span 80	Tween 80	Span 85
95:5	$98,76 \pm 4,52$	$98,98 \pm 1,93$	$95,13 \pm 3,19$
90:10	$97,83 \pm 1,73$	$98,03 \pm 2,14$	$95,21 \pm 3,48$
85:15	$103,10 \pm 3,32$	$91,44 \pm 1,78^*$	$97,96 \pm 4,07$

Nota: PC:TA – proporção fosfatidilcolina : tensoativo. Valores representados com * foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

A faixa de tamanho encontrada está de acordo com Mishra et al., 2007, nota-se que há aumento de diâmetro da partícula com o aumento de tensoativo até o ponto de saturação, a partir do qual formam-se micelas que se encontram em maior número e o diâmetro cai. A capacidade de formação de micelas depende em parte do HLB do tensoativo, o Tween 80 tem HLB igual a 15, um potencial de detergente elevado, isso explicaria a diminuição de tamanho para o Tween 80 na concentração de 15%, um número elevado de micelas, fator que não ocorre para o Span 80 e 85, com valores de HLB mais baixos, 4,5 e 1,6, respectivamente.

O índice de polidispersão permite análise da heterogeneidade de tamanho das partículas na formulação, a Tabela 7 mostra os valores de PDI obtidos com diferentes

tensoativos. Todos os sistemas lipossomais desenvolvidos apresentaram valores de PDI abaixo de 0,2. Tanto o tipo de tensoativo quanto as proporções avaliadas apresentaram uma distribuição estreita para sistemas nanoestruturados. O Tween 80 apresentou os menores índices de PDI em relação aos demais, enquanto o Span 80 demonstrou valores mais elevados.

Com relação à concentração de tensoativo, as formulações produzidas com 5 % foram capazes de reduzir o PDI, enquanto que o aumento de tensoativo produziu lipossomas com PDIs mais elevados, com exceção do Tween 80.

Tabela 7- Valores de PDI dos lipossomas obtidos com diferentes proporções de tensoativos e fosfatidilcolina.

PC:TA	Índice de Polidispersão (PDI)		
	Span 80	Tween 80	Span 85
95:5	0,125±0,014	0,094±0,024	0,104±0,024
90:10	0,111±0,016	0,103±0,015	0,144±0,035
85:15	0,205±0,063	0,106±0,09	0,155±0,033

Para averiguar se o procedimento experimental no estudo de elasticidade poderia modificar o tamanho das vesículas lipossomais, o tamanho médio das partículas foi monitorado antes e depois do teste, conforme apresentando na Tabela 8.

O tamanho médio das formulações produzidas com 5 % de Span 80 antes e após a extrusão em membrana de 50 nm, foram de $97,97 \pm 2,02$ e $92,17 \pm 1,02$ nm, sendo consideradas semelhantes com $p > 0,05$, Tabela 8. As porcentagens de 10 e 15 % também mostraram semelhanças, quando os tamanhos de antes e depois da extrusão foram comparados, não apresentando diferença de tamanho. Considerando o conceito de lipossoma deformável, o fato dessas partículas não apresentarem alteração de tamanho está diretamente relacionado ao fato do tensoativo conferir elasticidade ao lipossoma, impedindo a diminuição do diâmetro, mesmo com a extrusão em membrana de poro menor (CEVC et al., 2004, 2010, 2012; EL MAGHRABY et al., 2006).

Tabela 8- Composição e caracterização dos lipossomas deformáveis com Span 80, Tween 80 ou Span 85.

Formulação ^a	Proporção PC: TA (v/v)	Diâmetro médio antes TE (nm±DP)	PdI antes de TE	Diâmetro médio após TE (nm±SD)	PdI após TE	Elasticidade (mg.s ⁻¹ .cm ⁻² ±DP)
SP 80-1	95:5	98,76±4,52 ^a	0,104±0,01	92,17±2,5 ^a	0,127±0,02	24,33±0,69
SP 80-2	90:10	97,83±1,73 ^a	0,111±0,015	90,59±3,1 ^a	0,131±0,01	23,53±0,42
SP 80-3	85:15	103,10±3,32 ^a	0,120±0,02	102,06±8,1 ^a	0,204±0,08	16,81±0,58*
TW 80-1	95:5	98,98±1,93 ^a	0,087±0,01	94,94±2,5 ^a	0,130±0,04	5,71±0,08
TW 80-2	90:10	98,03±2,14 ^a	0,103±0,008	95,71±8,4 ^a	0,140±0,05	6,56±0,47
TW 80-3	85:15	91,44±1,78 ^a	0,102±0,007	86,32±3,3 ^a	0,120±0,01	4,79±0,13
SP 85-1	95:5	95,13±3,19 ^{b*}	0,098±0,02	87,22±5,1 ^b	0,115±0,02	9,52±0,79
SP 85-2	90:10	95,21±3,48 ^{b*}	0,136±0,01	87,32±3,4 ^b	0,154±0,01	13,76±1,46
SP 85-3	85:15	97,96±4,07 ^a	0,154±0,03	94,52±4,2 ^a	0,219±0,01	10,89±0,31

^aPC: fosfatidilcolina, TA: tensoativo, SP80: Span 80, TW80: Tween 80, SP85: Span 85. a: indica que não há diferença estatística entre o diâmetro médio do lipossoma antes e após o teste de elasticidade; b: indica diferença estatística entre o diâmetro médio do lipossoma antes e após o teste de elasticidade. *: valores estatisticamente diferentes por teste de variância ANOVA fator único seguido por Bonferroni, com p<0,05.

Em relação, aos lipossomas obtidos com Span 85, os valores de tamanho de partícula apresentaram diferenças entre de tamanho nas concentrações de 5 e 10 %, Tabela 8. A formulação com 5% apresentou tamanho de 94,72±1,05 nm e, após o processo de extrusão o tamanho de partícula diminuiu para de 87,22±2,08 nm. O mesmo foi observado para a formulação com 10 % que apresentou valores de tamanho médio de 95,21 ± 1,42 e 87,33 ± 1,40 nm antes e após a extrusão, respectivamente.

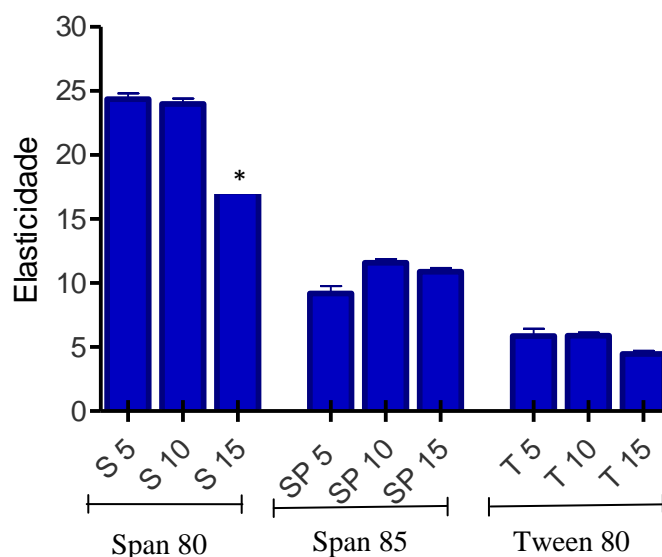
Por outro lado, na porcentagem de 15 % de Span 85 o tamanho de partícula não foi alterado após o processo de extrusão, com valores de tamanho de 97,96 ± 1,66 nm antes e 94,52±1,73 nm depois do processo de extrusão, conferindo característica de elasticidade aos lipossomas.

Diferentemente do ocorrido com o Span 80 e 85, as formulações de Tween 80 mostraram diferença significativa para o tamanho médio da concentração de 15 %, antes

(91,44±0,73 nm) e depois (86,32±1,34 nm) da extrusão. Entretanto, a formulação com menor proporção de PC:TA, 90:10 não mostrou diferença no tamanho médio de suas partículas antes (98,03±0,87 nm) e após (98,11±2,97nm) o ensaio de elasticidade por extrusão, Tabela 8.

A Figura 15 mostra os valores de elasticidade dos lipossomas deformáveis obtidos com três diferentes tensoativos. Os lipossomas produzidos com Tween 80 apresentaram os menores valores de elasticidade, abaixo de $5,82 \pm 0.12$. Comparado ao Tween 80, o Span 85 mostrou um aumento dos valores de elasticidade próximos a $11,48 \pm 0.34$. Por outro lado, o Span 80 apresentou valores bem elevados de elasticidade quando comparado aos outros dois tensoativos avaliados.

Figura 15- Elasticidade dos lipossomas deformáveis produzidos com Span 80 (S), Span 85 (SP) e Tween 80 (T) nas concentrações de 5, 10 e 15 %.



Nota: (*) valores que foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

Os lipossomas deformáveis produzidos com 5 e 10 % de Span 80 apresentaram valores de elasticidade de $24,33 \pm 0.69$ e $23,53 \pm 0.42$, respectivamente. Em contrapartida, o aumento da porcentagem de Span 80 para 15 % promoveu uma diminuição dos valores de elasticidade para $16,81 \pm 0.58$.

Os requisitos do tensoativo em obter melhores valores de elasticidade, tamanho razoavelmente pequeno na escala nanométrica e que apresentasse um PdI menor, foram atendidos pelo Span 80, nas concentrações de 5 e 10 %, as quais foram capazes de aumentar a

elasticidade quando comparado aos outros tensoativos avaliados e apresentaram um tamanho de aproximadamente 100 nm com um PDI menor que 0,125.

5.2.2 Planejamento fatorial

A partir da escolha do Span 80 como tensoativo da formulação, o desenvolvimento de lipossomas deformáveis seguiu conforme o planejamento experimental estabelecido (Tabela 9). O planejamento fatorial mostrou que os fatores estudados (porcentagem de etanol e Span 80) influenciaram as respostas analisadas.

A partir de combinações das múltiplas respostas obtidas (tamanho médio, PDI e elasticidade) pelas diferentes formulações desenvolvidas dentro do planejamento experimental, a função desejabilidade forneceu condições otimizadas (5,25% de etanol e 5% de Span 80), a partir da elasticidade que foi estabelecida como parâmetro alvo, através pelo programa Statistica 7.0.0, conforme representado na tabela 6.

Tabela 9- Otimização dos lipossomas deformáveis.

Parâmetros	Dados						
	Objetivo	Baixo	Alvo	Alto	Peso	Valores Preditos	Valores Atuais
Elasticidade	Máximo	20,25	44,71	44,71	1	43,55	31,09±1,79
Diâmetro (nm)	-	-	-	-	-	-	91,14±1.32
PDI	-	-	-	-	-	-	0.138±0,01
Desejabilidade: 0,95256							
Solução global:							
% etanol = 5,25							
% de tensoativo = 5							

5.3 Caracterização de lipossomas deformáveis de bexaroteno

A partir da solução global oferecida pelo emprego da ferramenta desejabilidade no planejamento fatorial, em que a proporção de tensoativo da formulação aparece em 5% (p/v) e a hidratação dos lipossomas, a encapsulação do bexaroteno foi testada nessa formulação, com concentração inicial de 0,2% (p/v), considerando o volume final da formulação de 5 ml.

Todavia a eficiência de encapsulação dessas formulações foi baixa 25,71-42,53% (Tabela 10), possivelmente devido ao extravasamento de fármaco das vesículas, o que

também pode ser observado pela baixa estabilidade aparente da formulação que sofreu turvação, seguida de quebra do sistema lipossomal, em menos de 6 horas, além de PDI elevado ($> 0,3$).

Tabela 10- Resultados da caracterização dos lipossomas deformáveis de bexaroteno.

Percentual de fármaco (p/v)	EE (%)	Diâmetro médio (nm)	PdI
0,05%	99,67±3,4	93,69±1,95	0,092±0,02
0,1%	95,74±4,2	99,85±11,27	0,228±0,095
0,2%	32,84±8,6	104,21±36,25	0,307±0,12

Eficiência de encapsulação baixa (65,5%) da tretinoína em lipossomas deformáveis foi encontrada por Raza e colaboradores 2013, enquanto formulações com 0,05% apresentaram eficiência de encapsulação satisfatórias em um outro estudo (ASCENSO et al., 2014), sendo que a tretinoína é também um retinóide com características físico-químicas similares a do bexaroteno e, além disso não há casos registrados anteriormente da encapsulação do bexaroteno em vesículas lipossomais deformáveis ou não.

Apesar das formulações com 0,1 e 0,05% terem apresentado eficiência de encapsulação acima de 90%, a formulação com 0,1% demonstrou baixa estabilidade aparente com turvação e separação de fase em menos de 48 horas, sugerindo extravasamento do bexaroteno das vesículas lipossomais. Dessa forma, a formulação contendo 0,05% de bexaroteno se mostrou a mais adequada quanto aos parâmetros de diâmetro médio, PDI, eficiência de encapsulação, bem com mantê-los durante o tempo avaliado.

5.4 Estabilidade dos lipossomas deformáveis de bexaroteno

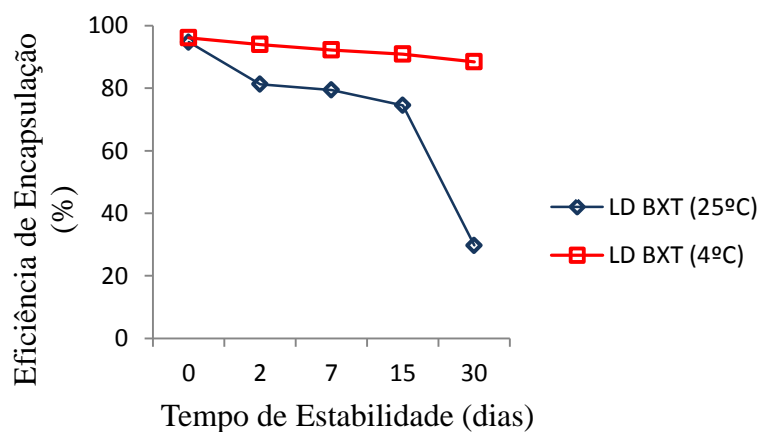
Lipossomas deformáveis contendo bexaroteno expostos à temperatura ambiente de 25°C demonstraram menor estabilidade ao longo dos 30 dias de análise quanto aos parâmetros de elasticidade, eficiência de encapsulação e diâmetro médio. Na Tabela 11, observa-se que o diâmetro médio das formulações mantidas a 25°C se manteve sem alterações significativas até o 15º dia, todavia no 30º dia observa-se aumento do diâmetro médio juntamente com diminuição significativa ($p<0,05$) da eficiência de encapsulação do BXT. Possivelmente, o aumento no diâmetro dos lipossomas ao longo do tempo está associada a agregação e fusão das partículas (EL ZAAFARANY et al., 2010)

Tabela 11- Parâmetros de estabilidade avaliados dos lipossomas deformáveis de bexaroteno mantidos a 25 ou a 4°C, por 30 dias, com avaliação do diâmetro médio, PdI e EE nos dias 0, 2, 7, 15 e 30.

Tempo (dias)	Estabilidade a 25°C			Estabilidade a 4°C		
	Diâmetro médio (nm±DP)	PdI	EE%	Diâmetro médio (nm±DP)	PdI	EE%
0	84,06±3,35	0,139±0,01	95,56±4,5	85,48±1,91	0,132±0,01	96,08±8,06
2	84,01±3,3	0,156±0,003	81,26±8,07*	84,25±3,45	0,134±0,01	92,20±0,3
7	88,11±6,3	0,134±0,03	79,41±6,45*	86,59±1,1	0,122±0,01	93,93±5,01
15	85,22±1,3	0,114±0,001	74,52±6,07	88,54±1,6	0,137±0,01	90,89±3,7
30	140,6±53,0*	0,223±0,04	29,73±18,8*	84,92±1,9	0,148±0,01	88,40±1,8

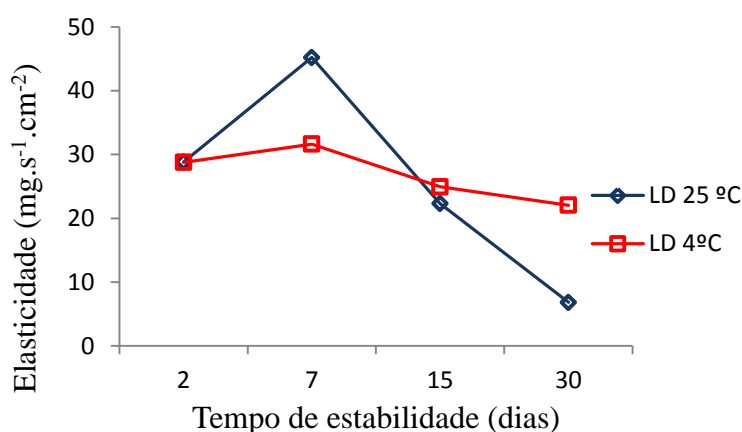
Nota-se que as formulações de lipossomas deformáveis mantidas a 4°C, apesar de aparentar perda do fármaco com diminuição da eficiência de encapsulação, essa diferença não é estatisticamente significativa e, assim sendo a formulação em 4°C manteve a eficiência de encapsulação do BXT durante os 30 dias do estudo de estabilidade. Por outro lado, as formulações lipossomais mantidas a 25°C tiveram perda progressiva do fármaco encapsulado ao longo do tempo. Houve alterações macroscópicas das formulações de lipossomas deformáveis de BXT mantidas a 25°C no 30º dia do estudo de estabilidade, a formulação estava visivelmente mais opaca e precipitado branco.

Figura 16- Eficiência de encapsulação do BXT em lipossomas deformáveis mantidos a 25 e a 4 °C, durante 30 dias com avaliação nos dias 0, 2, 7, 15 e 30 do estudo.



Quanto aos parâmetros de elasticidade dos lipossomas deformáveis de BXT, houve, inicialmente, aumento significativo da elasticidade dos lipossomas mantidos a 25°C, de $28,82 \pm 2,86$ para $45,23 \pm 2,16$, entre o segundo e sétimo dia (Figura 17). Entretanto, o diâmetro médio das partículas antes e após o teste de elasticidade (TE) demonstraram diminuição significativa no tamanho dos lipossomas após a passagem por membrana de 50 nm, durante todos os dias de análise da estabilidade, sendo condizente com a queda abrupta da elasticidade após o dia 7.

Figura 17- Elasticidade dos lipossomas deformáveis de BXT mantidos a 25 e a 4 °C, durante 30 dias com avaliação nos dias 0, 2, 7, 15 e 30 do estudo.



Os lipossomas deformáveis de BXT mantidos a 4°C apresentaram um comportamento de elasticidade semelhante aos lipossomas mantidos em 25°C, com aumento inicial da elasticidade entre os dias 2 e 7 da análise, $28,77 \pm 5,5$ a $31,63 \pm 1,6$, seguido por uma diminuição para $24,93 \pm 3,9$ e $22,05 \pm 2,71$ nos dias 15 e 30, respectivamente. Todavia, o comportamento de elasticidade dos lipossomas mantidos a 4°C se mostrou menos proeminente que o dos lipossomas em 25°C.

Além disso, os valores de diâmetros médios obtidos antes e após TE, dos lipossomas em 4°C, se apresentaram estatisticamente iguais nas duas primeiras análises (2° e 7° dia), indicando maior manutenção das características elásticas dos lipossomas mantidos em 4°C em vista dos armazenados a 25°C (Tabela 12).

Tabela 12- Avaliação do diâmetro médio dos lipossomas deformáveis de BXT antes e após o teste de elasticidade (TE) em membrana de 50 nm.

Diâmetro Médio (nm±DP)	Dia 2		Dia 7		Dia 15		Dia 30	
	LD 25°C	LD 4°C	LD 25°C	LD 4°C	LD 25°C	LD 4°C	LD 25°C	LD 4°C
Antes de TE	84,01±3,33	84,25±3,43	88,11±6,27	86,59±1,12	85,22±1,26	88,54±1,57	140,6±53,0	84,92±1,92
Depois de TE	73,95±4,11*	80,1±0,95	78,51±3,60*	78,34±0,66	77,19±2,41*	79,13±5,53*	303,8*	75,46±1,12*

(*) valores que foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido de Bonferroni, com $p < 0,05$.

5.5 Liofilização dos lipossomas

Um fator limitante para aplicação clínica de lipossomas é a instabilidade físico-química das formulações, que pode ser causada por oxidação lipídica das membranas lipossomais, ocasionando em quebra da estrutura lipossomal e, conseqüentemente vazamento do fármaco encapsulado.

A liofilização é uma técnica comumente empregada como estratégia para se prolongar a vida útil das formulações, todavia, para uso em formulações lipossomais é necessário o emprego de medidas que garantem a integridade da membrana durante o processo, pois os cristais de gelo provocam desintegração da estrutura vesicular formando agregados durante a reidratação (STARK et al., 2010).

Adicionar carboidratos a formulação lipossomal promove formação de uma matriz amorfa no lugar dos cristais de gelo, durante a fase de congelamento, evitando os problemas causados pelos cristais.

Foram avaliadas diferentes concentrações de trealose e sacarose como crioprotetor em três formulações diferentes, convencionais e, deformáveis com hidratações feitas em água e em meio de hidroalcoólico 5,25%, em ambos os casos as formulações de lipossomas deformáveis foram reidratadas com a solução hidroalcoólica.

As formulações deformáveis, em que a sacarose foi utilizada como crioprotetor, se mostraram mais polidispersas e com diâmetro médio menor, em relação às formulações de lipossomas convencionais, como apresentado na Tabela 13. O diâmetro médio e o PDI das formulações não sofreram alterações significativas ($p < 0,05$) antes e após a liofilização,

contudo foi observado o aparecimento de partículas maiores que 1 μm após a reidratação das formulações de lipossomas convencionais, contendo razão molar de 1:2 e 1:4 (lipídio:sacarose).

Tabela 13- Diâmetro médio e PdI dos lipossomas antes e após a liofilização com uso da sacarose como crioprotetor.

Razão PC:Sacarose (mM:mM)	Formulação	Antes da liofilização		Após a liofilização	
		Diâmetro médio (nm)	PdI	Diâmetro médio (nm)	PdI
1:2	LC	114,56 \pm 9,40	0,158 \pm 0,098	108,9 \pm 1,60	0,101 \pm 0,01
	LD ⁺	109,75 \pm 1,48	0,096 \pm 0,003	104,35 \pm 1,60	0,084 \pm 0,01
	LD ⁺⁺	98,57 \pm 3,85	0,073 \pm 0,024	92,67 \pm 2,59	0,153 \pm 0,02
1:3	LC	109,85 \pm 0,01	0,063 \pm 0,02	106,55 \pm 0,02	0,107 \pm 0,02
	LD ⁺	106,5 \pm 0,01	0,056 \pm 0,01	101,6 \pm 1,62	0,090 \pm 0,02
	LD ⁺⁺	96,55 \pm 0,01	0,042 \pm 0,01	93,88 \pm 1,56	0,158 \pm 0,02
1:4	LC	110,80 \pm 1,69	0,078 \pm 0,015	119,55 \pm 1,62	0,185 \pm 0,01
	LD ⁺	106,10 \pm 1,98	0,056 \pm 0,01	111,85 \pm 2,32	0,106 \pm 0,02
	LD ⁺⁺	102,65 \pm 1,91	0,049 \pm 0,01	99,81 \pm 2,48	0,151 \pm 0,01
1:6	LC	110,8 \pm 1,98	0,062 \pm 0,002	109,6 \pm 1,80	0,125 \pm 0,02
	LD ⁺	105,95 \pm 1,06	0,070 \pm 0,02	105,85 \pm 2,30	0,100 \pm 0,01
	LD ⁺⁺	99,44 \pm 2,07	0,068 \pm 0,01	92,14 \pm 1,58	0,140 \pm 0,02

LC: lipossomas convencionais. LD⁺: lipossomas deformáveis com hidratação por água e reidratação com solução hidroalcoólica de 5,25%. LD⁺⁺: lipossomas deformáveis com hidratação e reidratação com solução hidroalcoólica de 5,25%.

O diâmetro médio e PdI das formulações que utilizaram a trealose como crioprotetor está demonstrado na Tabela 14, em que as formulações com proporção molar 1:2 e 1:6 (PC:trealose) se apresentaram mais polidispersas, indicando para a proporção 1:2 sua incapacidade em proteger a membrana lipossomal, enquanto que a opacidade e dificuldade em ressuspender as formulações com 1:6 (lipídio:trealose) podem indicar um excesso de crioprotetor.

Tabela 14- Diâmetro médio e PDI dos lipossomas antes e após a liofilização com uso da trealose como crioprotetor.

Razão PC:Trealose (mM:mM)	Formulação	Antes da liofilização		Após a liofilização	
		Diâmetro médio (nm)	PdI	Diâmetro médio (nm)	PdI
1:2	LC	106,8±0,71	0,052±0,01	100,40±2,34	0,086±0,023
	LD ⁺	100,81±2,11	0,062±0,02	112,80±12,005	0,250±0,087
	LD ⁺⁺	99,74±1,78	0,080±0,01	90,46±1,48	0,130±0,028
1:3	LC	98,30±2,40	0,100±0,01	106,94±19,88	0,200±0,089
	LD ⁺	107,95±3,18	0,077±0,01	99,09±1,58	0,066±0,017
	LD ⁺⁺	101,50±1,41	0,056±0,02	94,50±2,16	0,111±0,024
1:4	LC	112,6±2,83	0,048±0,01	104,45±2,28	0,088±0,010
	LD ⁺	107,30±3,94	0,078±0,01	101,55±1,81	0,085±0,019
	LD ⁺⁺	103,60±2,12	0,056±0,003	105,4±1,53	0,198±0,012
1:6	LC	100,44±3,06	0,055±0,002	93,9±1,42	0,097±0,012
	LD ⁺	93,25±1,95	0,133±0,003	91,25±2,28	0,112±0,009
	LD ⁺⁺	87,44±1,84	0,148±0,03	114,95±3,42	0,365±0,003

LC: lipossomas convencionais. LD⁺: lipossomas deformáveis com hidratação por água e reidratação com solução hidroalcoólica de 5,25%. LD⁺⁺: lipossomas deformáveis com hidratação e reidratação com solução hidroalcoólica de 5,25%.

A elasticidade média dos lipossomas deformáveis sem bexaroteno teve um aumento significativo, quando a sacarose foi utilizada (Tabela 15). Mesmo as formulações de lipossomas convencionais após a liofilização apresentaram valores de elasticidade semelhantes àqueles encontrados por lipossomas deformáveis não liofilizados.

Tabela 15- Elasticidade dos lipossomas após a liofilização.

Razão PC:Crioprotetor (mM:mM)	Formulação ^a	Elasticidade	
		Sacarose	Trealose
1:2	LC	215,5±5,5	14,89±0,51
	LD-+	159,1±7,8	36,31±1,38
	LD++	121,8±4,45	34,86±1,36
1:3	LC	167,1±3,9	17,005±0,95
	LD-+	121,8±4,5	39,75±1,92
	LD++	124,7±2,8	42,33±1,88
1:4	LC	175,16±4,1	22,13±1,04
	LD-+	205,3±6,15	42,4±0,9
	LD++	171,5±5,2	33,4±0,98
1:6	LC	189,57±8,66	13,24±0,32
	LD-+	201,79±7,35	20,45±0,53
	LD++	147,09±7,36	46,99±1,13

^aLC: lipossoma convencional, LD-+: lipossoma deformável hidratado com água e ressuspensão com solução hidroalcoólica (5,25%), LD++: lipossoma deformável hidratado e ressuspensão com solução hidroalcoólica (5,25%).

Esses resultados sugerem que o processo de liofilização dos lipossomas, com uso da trealose e da sacarose como crioprotetores, ocasionou na obtenção de lipossomas com um grau mais elevado de elasticidade após a ressuspensão do pó liofilizado. Considerando que a presença do açúcar em formulações não liofilizadas, não demonstrou diferença significativa (>0,5 G) na dinâmica da bicamada em análises por EPR, conclui-se que a liofilização tem uma contribuição fundamental nos parâmetros de elasticidade e fluidez dos lipossomas.

5.6 Monitoramento da dinâmica molecular dos lipídios na bicamada dos lipossomas

As figuras 18 e 19 apresentam os espectros experimentais por EPR, bem como o de seus melhores ajustes obtidos a partir de lipossomas marcados com 5-DSA. Esses marcadores foram utilizados a fim de se monitorar diferentes regiões da bicamada lipídica lipossomal. Devido a presença do grupo nitroxídeo no carbono 5 da cadeia do ácido esteárico, o marcador 5-DSA permite detectar alterações no ambiente mais próximo aos grupos polares da membrana. Enquanto, o 16-DSA é mais sensível a alterações na região mais hidrofóbica da bicamada, por ter o grupo nitroxídeo no C 16 de sua cadeia carbônica.

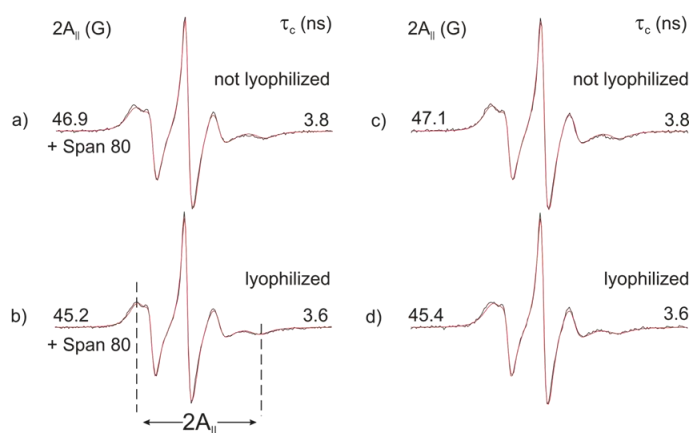
Em espectroscopia por EPR, o parâmetro de desdobramento hiperfino, $2A_{\parallel}$ está relacionado com a mobilidade do marcador e, é retratado na separação em Gauss (G) entre o primeiro pico do espectro e a última depressão (GAETI, 2011; MENDANHA et al., 2013; STONE et al., 1965). Valores menores atribuídos à medição do $2A_{\parallel}$ indicam maior mobilidade do 5-DSA dentro da bicamada lipídica, sugerindo maior fluidez da membrana. Os erros experimentais estimados para $2A_{\parallel}$ e τ_c são 0,5G e 0,1 ns, respectivamente. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G (ANDRADE et al., 2014; MENDANHA e ALONSO, 2015).

Foram avaliadas por RPE formulações de lipossomas variáveis quanto à presença e ausência de Span 80, sacarose, trealose e o processo de liofilização, além da influência do bexaroteno na fluidez da bicamada lipídica dos lipossomas.

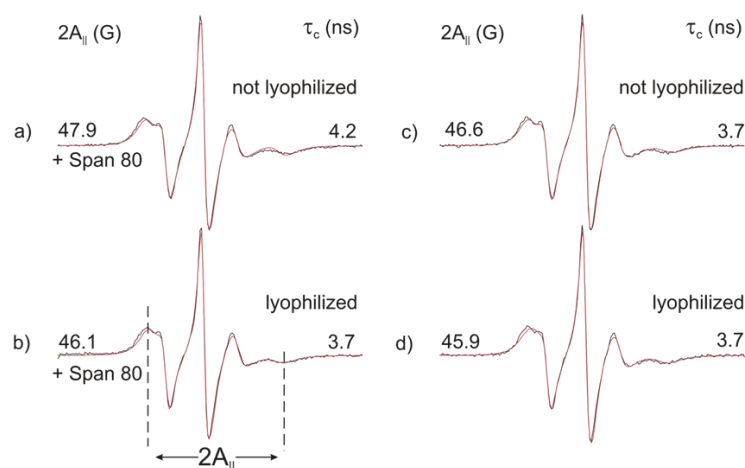
Quando o Span 80 está presente nas formulações em que a trealose é usada em lipossomas não liofilizados, ocorre diminuição da dinâmica molecular da bicamada pelo marcador 5-DSA (aumento do valor de $2A_{\parallel}$ e diminuição nos valores de τ_c). Por outro lado, o mesmo não ocorre para as formulações não liofilizadas com adição de sacarose, sugerindo diferentes mecanismos de interação dos dois crioprotetores usados com o tensoativo. Nos quais, a presença da sacarose junto com o Span 80 concedeu maior fluidez a membrana lipídica tanto para as amostras não liofilizadas quanto as liofilizadas, analisando paralelamente com os resultados obtidos pela trealose (Figura 18).

Figura 18- Espectros experimentais (linha preta) e melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DSA incorporado em lipossomas deformáveis (a e b) e lipossomas convencionais (c e d). Sacarose (parte A) ou trealose (parte B) foram usadas como crioprotetores. Os valores do parâmetro de desdobramento hiperfino $2A_{||}$ foram medidos diretamente nos espectros de EPR e o tempo de correlação rotacional (τ_c) obtidos a partir do melhor ajuste são indicados.

A



B



É interessante notar que quando apenas o Span 80 é incorporado nas formulações, sem adição de crioprotetores, há uma diminuição da dinâmica molecular na membrana lipídica dos lipossomas (Tabela 16). Entretanto, quando as amostras são submetidas à liofilização ocorre aumento na dinâmica dos fosfolípidios em todas as formulações marcadas com 5-DSA em vista das mesmas formulações quando não liofilizadas. Entre as formulações liofilizadas com sacarose, a adição de Span 80 não mostrou diferenças na dinâmica dos lípidios e, o mesmo foi observado entre as formulações liofilizadas com trealose, apesar das formulações liofilizadas com sacarose terem demonstrado maior dinâmica de bicamada.

Tabela 16- Parâmetros de EPR de membranas lipossomais determinados a partir da simulação de melhores ajustes dos espectros obtidos pelos marcadores 5-DAS e 16-DAS em lipossomas não liofilizados, sem crioprotetores, com e sem Span 80.

	5-DAS		16-DAS
	τ_c (ns)*	$2A_{ }$ *	τ_c (ns)*
Presença de Span 80	4,2	48,3	0,4
Ausência de Span 80	3,9	47,4	0,4

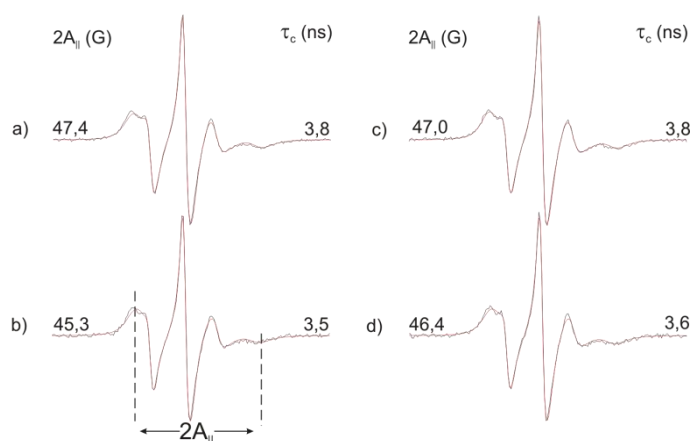
* O erro experimental de τ_c (ns) e $2A_{||}$ é de 1,0 e 0,5G, respectivamente.

Nas formulações com bexaroteno podemos notar que não há diferença na dinâmica molecular dos lipídios de membrana entre as formulações não liofilizadas com sacarose e trealose, independente da adição de Span 80 (Figura 19). Todavia, entre as formulações não liofilizadas com trealose, a presença do Span 80 diminui a dinâmica molecular dos fosfolipídios, o que não acontece entre as formulações com sacarose, à semelhança do que ocorreu para as formulações sem bexaroteno.

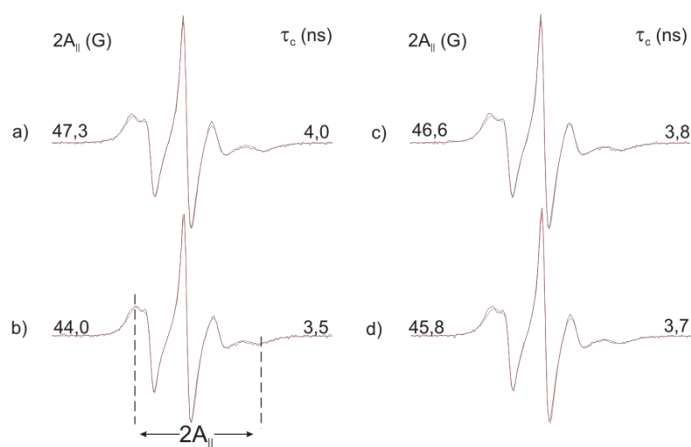
Entretanto, as formulações liofilizadas com bexaroteno apresentaram contrastes em relação as formulações liofilizadas sem bexaroteno: a presença do Span 80 aumentou a dinâmica dos lipídios nas formulações liofilizadas tanto com sacarose quanto nas liofilizadas com trealose, entretanto as formulações com trealose demonstraram maior dinâmica molecular dos lipídios quando liofilizadas com bexaroteno.

Figura 19- Espectros experimentais (linha preta) e melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DSA incorporado em lipossomas deformáveis (a e b) e lipossomas convencionais (c e d). **Com presença de bexaroteno**. Sacarose (parte A) ou trealose (parte B) foram usadas como crioprotetores. Os valores do parâmetro de desdobramento hiperfino $2A_{||}$ foram medidos diretamente nos espectros de EPR e o tempo de correlação rotacional (τ_c) obtidos a partir do melhor ajuste são indicados.

A



B



Apesar das diferenças na dinâmica molecular dos lipídios entre as formulações marcadas com 5-DSA, não houve nenhuma modificação significativa para as formulações em que o marcador 16-DSA foi utilizado (todas apresentaram valores de τ_c igual a 0,4). Isto sugere que as alterações demonstradas pelo processo de liofilização ocorrem, sobretudo, na interface polar dos lipossomas, enquanto o núcleo hidrofóbico da membrana permanece sem modificações.

5.7 Estudo de solubilidade e verificação da condição *sink*

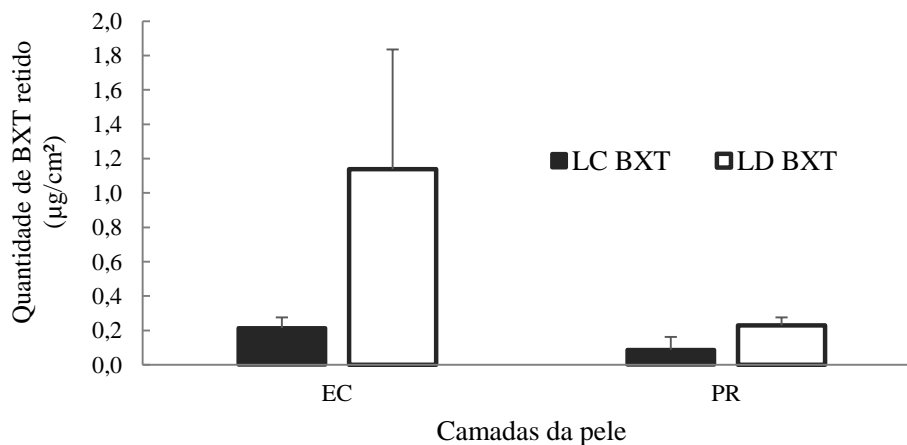
A verificação da condição *sink* é importante para assegurar que o fármaco será solubilizado no meio receptor e que o volume deste meio é suficiente para não causar a saturação da solução receptora. A condição *sink* é garantida quando o volume do meio receptor é pelo menos três vezes maior que o volume necessário para solubilizar o fármaco disponível (MARQUES, 2009).

A solubilidade do BXT em solução etanol: água, na proporção 50:50 foi de 0,065 mg/ml. De acordo com este resultado, para solubilizar o fármaco contido no compartimento doador (0,125 mg) seriam necessários 1,92 ml de meio receptor. No entanto, o volume do compartimento receptor é de 6,666 ml e, portanto o volume de meio receptor é aproximadamente 3,47 vezes maior que o necessário (1,92 ml).

5.8 Permeação cutânea *in vitro*

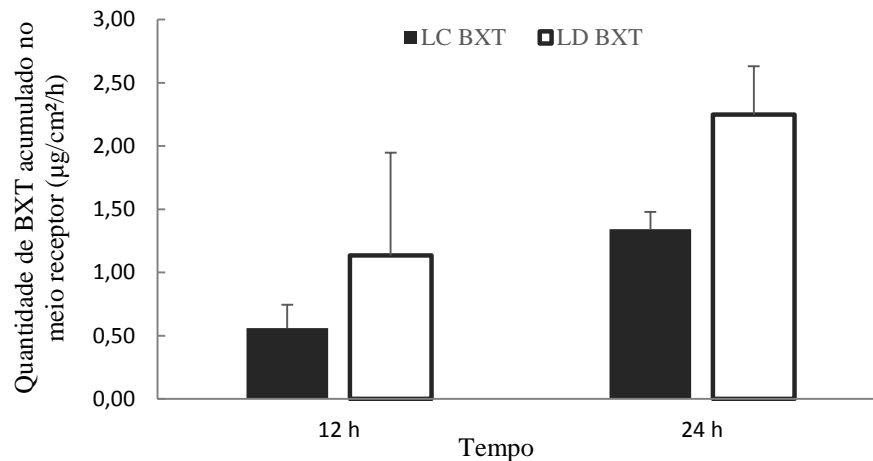
Nos estudos de permeação realizados em pele de orelha de porco é possível observar que os lipossomas deformáveis favoreceram a entrada de BXT na pele em relação aos lipossomas convencionais. Na Figura 20, observa-se que quando encapsulado nos lipossomas deformáveis, a quantidade de BXT que penetrou no EC foi cerca de 5 vezes superior à quantidade de BXT retido no EC com a encapsulação do BXT nos lipossomas convencionais. O acúmulo de BXT na PR foi um pouco maior com a encapsulação do fármaco em lipossomas deformáveis, no entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre estes resultados ($p < 0,05$).

Figura 20- Quantidade de BXT retido no EC e PR ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de exposição da pele a formulações de lipossomas deformáveis e convencionais de BXT.



Após 12 horas, é possível verificar que a quantidade de BXT que atravessou a pele e chegou no meio receptor apresentou uma tendência maior de permeação quando utilizados os lipossomas deformáveis ($p > 0,05$). No entanto, a capacidade destes lipossomas de facilitar a entrada do BXT através da pele é comprovada com a maior quantidade de BXT contida no meio receptor após 24 horas de experimento ($p < 0,05$) (Figura 21).

Figura 21- Quantidade de BXT difundido para o meio receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) com tempo de coleta em 12 e 24 h de exposição da pele a formulações de lipossomas deformáveis e convencionais de BXT.



A maior penetração do fármaco pelo EC, seguida de maior difusão para o meio receptor é semelhante aos resultados descritos por Song e colaboradores (2012), no qual foram utilizados lipossomas deformáveis com etanol e Tween 80 para encapsular o fármaco lipofílico voriconazol. A não permanência do fármaco na PR, apesar da grande difusão pelo EC conforme demonstrado na Figura 20, pode ser devido à baixa afinidade deste fármaco com as camadas da PR, que possuem muita água em sua composição (MOSER et al., 2001). Todavia, extrapolando-se para uma situação de permeação *in vivo*, em que as células da pele se encontram em plena atividade, o aumento no fluxo de fármaco capaz de penetrar na pele seria muito favorável, uma vez que poderia haver captação do fármaco pelas células, com possibilidade de desempenho das suas funções terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

- Durante o desenvolvimento de lipossomas deformáveis, o Span 80 foi escolhido como tensoativo na concentração de 5% e 5,25% de etanol, através da solução global oferecida pelos resultados do planejamento fatorial.
- O bexaroteno a 0,05% (p/v) obteve índices de eficiência de encapsulação em $99,67 \pm 3,4\%$, com tamanho e PDI em $93,69 \pm 1,95$ nm e $0,092 \pm 0,02$, respectivamente. Portanto, por apresentar melhor estabilidade em relação às demais, a concentração de bexaroteno a 0,05% foi escolhida para compor a formulação de lipossomas deformáveis.
- O estudo de estabilidade dos lipossomas deformáveis de BXT revelou que as formulações mantidas em 4°C indicaram melhor estabilidade em vista das formulações em 25°C, por maior prolongamento da elasticidade.
- A liofilização dos lipossomas sem fármaco apresentaram valores de elasticidade elevados em todas as formulações avaliadas inclusive em lipossomas convencionais.
- As análises de RPE das formulações com múltiplas variáveis nos lipossomas (Span 80, etanol, sacarose, trealose, BXT e o processo de liofilização) demonstraram que as formulações com e sem BXT exibem aumento na dinâmica molecular dos lipídios quando foram liofilizadas.
- Os estudos de permeação cutânea *in vitro* entre lipossomas de BXT convencionais e deformáveis apontaram aumento na penetração de BXT pela barreira do EC, quando encapsulado em lipossomas deformáveis em detrimento dos lipossomas convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAR, N. S. et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Mycosis Fungoides/Se´zary Syndrome: Validation of the Revised International Society for Cutaneous Lymphomas/ European Organisation for Research and Treatment of Cancer Staging Proposal. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 4730-4739, 2010.
- ALIZADEH, F. et al. Retinoids and their biological effects against cancer. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 43-49, 2014.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, March 19, 2004 2004.
- ANDRADE, L. M. et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 40-47, 2014.
- ARTUSI, M. et al. Effect of chemical enhancers and iontophoresis on thiocolchicoside permeation across rabbit and human skin in vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 10, p. 2431-2438, 2004.
- ASCENSO, A. et al. In vitro and in vivo topical delivery studies of tretinoin-loaded ultradeformable vesicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 48-55, 2014.
- BARBA, C. et al. Effect of lipid modification on stratum corneum permeability. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 297-305, Apr 2015.
- BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S31-S40, 2002.
- BOAKYE, C. H. A.; PATEL, K.; SINGH, M. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1-2, p. 106-116, 2015.
- BRASIL; ANVISA. **Resolução RDC 899- Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. ANVISA.
Website:http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%A9ticos+e+bioanal%C3%A9ticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 21/03/2016 2003.
- BROWN, M. et al. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future aspects. **Drug Delivery**, v. 13, p. 175-187, 2006.
- CAMARGOS, H. S.; ALONSO, A. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectral components of spin-labeled lipids in saturated phospholipid bilayers: effect of cholesterol. **Química Nova**, v. 36, p. 815-821, 2013.
- CEREDA, C. M. S. et al. Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 3, p. 228-234, 2013.

CEVC, G. Rational design of new product candidates: The next generation of highly deformable bilayer vesicles for noninvasive, targeted therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 135-146, 2012.

CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1104, n. 1, p. 226-232, 1992.

CEVC, G.; BLUME, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1514, n. 2, p. 191-205, 2001.

CEVC, G.; VIJEL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHAROO, N. A. et al. Electroporation: an avenue for transdermal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 7, n. 2, p. 125-36, Apr 2010.

CONTRI, R. V. et al. Transport of Substances and Nanoparticles across the Skin and in Vitro Models to Evaluate Skin Permeation and/or Penetration. In: GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R., *et al* (Ed.). **Nanocosmetics and Nanomedicines- New approaches for skin care**: Springer, 2011. cap. 1, p.3-36.

COSCO, D. et al. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1-2, p. 1-10, 2015.

DARWHEKAR, G.; JAIN, D. K.; CHOUDHARY, A. Elastic liposomes for delivery of neomycin sulphate in deep skin infection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 230-240, 2012.

DEL RIO-SANCHO, S. et al. Transdermal absorption of memantine – Effect of chemical enhancers, iontophoresis, and role of enhancer lipophilicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 164-170, 2012.

DI MASI, A. et al. Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 41, p. 1-115, 2015.

DRAGNEV, K. H. et al. A Proof-of-Principle Clinical Trial of Bexarotene in Patients with Non Small Cell Lung Cancer. **Cancer Therapy Clinical**, v. 13, p. 1794-1800, 2007.

DUMMER, R. et al. Maintenance therapy in cutaneous T-cell lymphoma: Who, when, what? **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 16, p. 2321-2329, 2007.

EL KECHAI, N. et al. Recent advances in local drug delivery to the inner ear. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 83-101, 2015.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

EL ZAAFARANY, G. M. et al. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, n. 1-2, p. 164-172, 2010.

ELIAS, P. M.; WAKEFIELD, J. S. An integrated view of the epidermal environmental interface. **Dermatologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 49-57, 2015.

ELSAYED, M. M. A. et al. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, n. 1–2, p. 60-66, 2006.

FDA. **Guidance for Industry: nonsterile semisolid dosage forms. Scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation.** Rockville, MD, USA: Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM070930.pdf>> 1997.

GAETI, M. P. N. **Efeito da encapsulação em lipossomas sobre a estabilidade físico-química e citotoxicidade in vitro do 4-nerolidilcatecol.** 2011. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GILLET, A. et al. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 43-53, 2011.

HALLERMANN, C. et al. High frequency of primary cutaneous lymphomas associated with lymphoproliferative disorders of different lineage. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 7, p. 517-517, 2007.

HOWELL, S. R. et al. Bexarotene metabolism in rat, dog, and human, synthesis of oxidative metabolites, and in vitro activity at retinoid receptors. **Drug metabolism and disposition**, v. 29, n. 7, p. 990-998, 2001.

HUEN, A. O.; KIM, E. J. The Role of Systemic Retinoids in the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 715-729, 2015.

HURYN, D. M.; WIPF, P. Natural product chemistry and cancer drug discovery. In: NEIDLE, S. (Ed.). **Cancer drug design and discovery.** Londres: Elsevier, v.2, 2014. cap. 3, p.91-120. ISBN 978-0-12-396521-9.

IRFAN, M.; VERMA, S.; RAM, A. Preparation and characterization of ibuprofen loaded transferosome as a novel carrier for transdermal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 162-165, 2012.

JAIN, S.; ZAIN, J.; O'CONNOR, O. Novel therapeutic agents for cutaneous T-Cell lymphoma. **J Hematol Oncol**, v. 5, p. 24, 2012.

JAWED, S. I. et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 2, p. 205 e1-16; quiz 221-2, Feb 2014.

KNUDSEN, N. Ø. et al. Targeting of liposome-associated calcipotriol to the skin: Effect of liposomal membrane fluidity and skin barrier integrity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 478-485, 2011.

KONOV, K. B. et al. Membrane–Sugar Interactions Probed by Pulsed Electron Paramagnetic Resonance of Spin Labels. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 32, p. 10261-10266, 2015.

- KUMAR, N.; GOINDI, S. Statistically designed nonionic surfactant vesicles for dermal delivery of itraconazole: Characterization and in vivo evaluation using a standardized *Tinea pedis* infection model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, p. 224-240, 2014.
- KUMAR, V. D.; SARASWATHI, B.; KANTH, N. P. Transfersome: latest updates. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 11, p. 4125-4132., 2013.
- LEE, J. H. et al. Characteristics of primary cutaneous lymphoma according to WHO-EORTC classification in Korea. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, n. 5, p. 457-463, 2013.
- LOURENÇO, A. R. N. **Administração tópica de fármacos, das restrições aos desafios**. 2013. (Dissertação de mestrado). Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- LUZARDO, M. D. C. et al. Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 5, p. 2452-2458, 2000.
- MAHESHWARI, R. G. S. et al. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 2, p. 161-170, 2012.
- MAIONE-SILVA, L. **Nanopartículas Lipídicas sólidas contendo genisteína para uso tópico**. 2012. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- MANCA, M. L. et al. Molecular arrangements and interconnected bilayer formation induced by alcohol or polyalcohol in phospholipid vesicles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, n. 0, p. 360-367, 2014.
- MANCONI, M. et al. Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 42, p. 37-46, 2011.
- MARQUES, M. R. C. Dissolução de medicamentos. In: GUANABARA-KOOGAN (Ed.). **Ciências Farmacêuticas, Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro, 2009. cap. 7,
- MENDANHA, S. A.; ALONSO, A. Effects of terpenes on fluidity and lipid extraction in phospholipid membranes. **Biophysical chemistry**, v. 198, p. 45-54, 2015.
- MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 323-329, 2013.
- MESTEL, D. S. et al. Treatment of Cutaneous Lymphomas: Today and Tomorrow. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 100, Supplement 1, p. 18-32, 2009.
- MISHRA, D. et al. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4847-4855, 2006.
- MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 411-20, Mar 1996.
- MOGHADAM, S. H. et al. Effect of chemical permeation enhancers on stratum corneum barrier lipid organizational structure and interferon alpha permeability. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2248-60, 2013.

- MOHAMMED, D. et al. In Vitro–In Vivo Correlation in Skin Permeation. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 2, p. 394-400, 2014/02/01 2014.
- MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutcs**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.
- MUTALIK, S.; UDUPA, N. Effect of some penetration enhancers on the permeation of glibenclamide and glipizide through mouse skin. **Pharmazie**, v. 58, n. 12, p. 891-4, 2003.
- NGUYEN, C. V.; BOHJANEN, K. A. Skin-Directed Therapies in Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 683-696, 2015.
- OLIVEIRA, M. C. L. A. D. et al. Apresentação cutânea inicial de linfomas na infância. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 799-802, 2011.
- PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3-8, 2014.
- PILLAI, S.; MANCO, M.; ORESAJO, C. Epidermal barrier. In: DRAELOS, Z. (Ed.). **Cosmetic Dermatology- products and procedure**. 2. Oxford: Wiley Blackwell, 2016. cap. 1, p.3-12.
- PIMPINELLI, N. et al. Defining early mycosis fungoides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 1053–1063, 2005.
- POLAT, B. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n. 12, p. 1415-32, Dec 2010.
- POLIGONE, B.; HEALD, P. Menus for Managing Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 31, n. 1, p. 25-32, 2012.
- PRAUSNITZ, M. R. Microneedles for transdermal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 581-587, 2004.
- PRAUSNITZ, M. R. et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L., et al (Ed.). **Dermatology**. 3. New York, US: Elsevier, v.2, 2012. cap. 124,
- QU, L.; TANG, X. Bexarotene: a promising anticancer agent. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, p. 201-205, 2010.
- RATTANAPAK, T. et al. Comparative study of liposomes, transfersomes, ethosomes and cubosomes for transcutaneous immunisation: characterisation and in vitro skin penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1560-1569, 2012.
- RAZA, K. et al. Nano-Lipoidal Carriers of Tretinoin with Enhanced Percutaneous Absorption, Photostability, Biocompatibility and Anti-psoriatic Activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 65-72, 2013.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Sistema Tegumentar. In: ROSS, M. H. e PAWLINA, W. (Ed.). **Histologia texto e atlas**. 5. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2008. cap. 15, p.445-485.
- SAMI, N. Retinoides Tópicos. In: ELSEVIER (Ed.). **Terapêutica Dermatológica**. Rio de Janeiro: Wolverson, S.E 2015. cap. 41, p.505-516.

SANCHES JÚNIOR, J. A.; MORICZ, C. Z. M.; FESTA NETO, C. Processos linfoproliferativos da pele. Parte 2 – Linfomas cutâneos de células T e de células NK. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 7-25, 2006.

SCHADT, C. R. Topical and oral bexarotene. **Dermatologic Therapy**, v. 26, n. 5, p. 400-403, 2013.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SODHI, R. K.; SINGH, N. Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 120, p. 117-123, 2014.

SOM, I.; BHATIA, K.; YASIR, M. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 2-9, Jan-Mar 2012.

SONG, C. K. et al. A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: Characterization and in vitro/in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 299-304, 2012.

STARK, B.; PABST, G.; PRASSL, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3-4, p. 546-555, 2010.

STONE, T. J. et al. Spin-labeled biomolecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 4, p. 1010-1017, 1965.

TANDBERG, D. J.; CRACIUNESCU, O.; KELSEY, C. R. Radiation Therapy for Cutaneous T-Cell Lymphomas. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 703-713, 2015.

TOSTA, F. V. et al. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles for topical application: the influence of oil content on lipid dynamic behavior, stability, and drug skin penetration. **Journal of Nanoparticle Research**, p. 16:2782, 2014.

TOUITOU, E. et al. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 403-418, 2000.

TRAUTINGER, F. et al. EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 8, p. 1014-1030, 2006.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 2, p. 106-121, 2006.

TUAN-MAHMOOD, T.-M. et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 5, p. 623-637, 2013.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M. L. et al. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 427-436, 2014.

WHITTAKER, S. J.; FOSS, F. M. Efficacy and tolerability of currently available therapies for the mycosis fungoides and Sezary syndrome variants of cutaneous T-cell lymphoma. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 2, p. 146-160, 2007.

WILLEMZE, R. et al. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 6, p. vi 149-vi 154, 2013.

WILLEMZE, R. et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 3768-3785, 2005.

WOJDYŁO, M. S.; UMER, H. L.; RADOMSKA, A. M. Oral retinoids and rexinoids in cutaneous T-cell lymphomas. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 30, p. 19-29, 2013.

WONG, H. K. et al. Evolving Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). **British Journal of Haematology**, v. 155, n. 2, p. 150-166, 2011.

WONG, T. W.; KO, S. F.; HUI, S. W. Enhancing transdermal drug delivery with electroporation. **Recent Patents on Drug Delivery and Formulation**, v. 2, n. 1, p. 51-7, 2008.

YEN, W. C. et al. A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, targretin) inhibits angiogenesis and metastasis in solid tumours. **British Journal of Cancer**, v. 94, p. 654-660, 2006.