



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZIANA CAVALCANTE COSTA FERNANDES CRISÓSTOMO

**LIPOSSOMAS COM MONOLAURO DE SORBITANO E MICROAGULHAS COMO
PROMOTORES DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE 5-FLUOROURACIL (5-FU) PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PELE**

**ABRIL
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F3991 Fernandes Crisóstomo, Luiziana Cavalcante Costa.
Lipossomas com monolaurato de sorbitano e microagulhas como promotores de penetração cutânea de 5-Fluorouracil (5-FU) para o tratamento do câncer de pele / Luiziana Cavalcante Costa Fernandes Crisóstomo. – 2021.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy.
Coorientação: Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araújo.
1. nanotecnologia. 2. absorção cutânea. 3. carcinoma de células escamosas. I. Título.

CDD 615

LUIZIANA CAVALCANTE COSTA FERNANDES CRISÓSTOMO

LIPOSSOMAS COM MONOLAURO DE SORBITANO E MICROAGULHAS COMO
PROMOTORES DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE 5-FLUOROURACIL (5-FU) PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PELE

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para aprovação do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

FORTALEZA

2021

LUIZIANA CAVALCANTE COSTA FERNANDES CRISÓSTOMO

LIPOSSOMAS COM MONOLAURO DE SORBITANO E MICROAGULHAS COMO
PROMOTORES DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE 5-FLUOROURACIL (5-FU) PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PELE

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, para aprovação do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marlus Chorilli
Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Araraquara

RESUMO

O câncer de pele não-melanoma é frequente e possui menor mortalidade. Após o diagnóstico, o tratamento mais comum é a remoção do tumor, o que pode gerar sequelas locais. A terapia fotodinâmica, criocirurgia e a imunoterapia também podem ser aplicadas como tratamento. O carcinoma celular escamoso (SCC, da sigla em inglês *squamous cell carcinoma*) representa 20% dos casos de câncer de pele não-melanoma, origina-se na epiderme, caracteriza-se como um tumor sólido mais frequente nas regiões de maior incidência solar. O fármaco 5-fluorouracil (5-FU) é frequentemente utilizado para o tratamento quimioterápico. Contudo, o 5-FU possui caráter hidrofílico, um obstáculo para o tratamento pela via tópica, já que é preciso que o fármaco atravesse a barreira do estrato córneo, altamente lipofílica. Como consequência o 5-FU chega ao seu local de ação em baixas concentrações, dificultando o sucesso terapêutico. Desse modo, existem estratégias para melhorar a penetração cutânea, como o uso de promotores de penetração, uso de nanocarreadores lipídicos, como os lipossomas, e a utilização de métodos físicos, como as microagulhas. O presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver lipossomas com promotores de penetração para veiculação tópica do 5-FU e associando ou não ao uso de microagulhas para o tratamento do câncer de pele. Os lipossomas convencionais e com promotor de absorção monolaurato de sorbitano (Span 20) foram desenvolvidos pelo método clássico da hidratação do filme lipídico. As nanopartículas foram então caracterizadas quanto ao seu tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação do fármaco. A morfologia dos lipossomas foi observada utilizando microscopia de força atômica. A liberação do fármaco foi avaliada em membrana de celulose utilizando o aparato da célula de Franz. A citotoxicidade foi estudada utilizando o teste de MTT com a linhagem celular A431. O estudo de penetração cutânea do fármaco, de forma passiva e com microagulhas, foi realizado utilizando pele íntegra de orelha de suíno, com quantificação do fármaco em diferentes estratos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Para o lipossoma contendo Span 20, os resultados de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação foram de $88,08 \pm 1,06$ nm, $0,169 \pm 0,006$, $-12,3 \pm 1,04$ mV e $50,20 \pm 10,20\%$, respectivamente. A liberação do 5-FU, em todos os grupos, foi acima de 80% após 8 h, e não houve diferença estatisticamente significativa. A citotoxicidade em células A431 correspondeu ao IC₅₀ de $0,622185 \pm 0,26$, $30,52 \pm 6,21$, $24,65 \pm 18,49$, comparado o lipossoma com Span 20 para o lipossoma sem Span 20 e a solução de 5-FU, respectivamente. Nos estudos de penetração cutânea foi observada maior concentração do fármaco na camada de epiderme viável + derme, correspondendo a $2585,49 \pm 275,98$ ng/cm² para o lipossoma com Span 20 na liberação passiva e $5018,05 \pm 1696,52$ ng/cm² após tratamento prévio com microagulhas, sendo o grupo do lipossoma com Span 20 associado a microagulhas aquele que resultou em maior penetração cutânea de 5-FU. Diante dos resultados obtidos destacamos o sucesso no desenvolvimento dos lipossomas com promotor de absorção Span 20 para a encapsulação de 5-FU, bem como sua ação citotóxica, promovendo a melhora expressiva da penetração de 5-FU nas camadas da pele de forma passiva e principalmente com o tratamento prévio empregando microagulhas.

Palavras chave: nanotecnologia; absorção cutânea; carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

Non-melanoma skin cancer is frequent and has lower mortality. After diagnosis, the most common treatment is to remove the tumor, which can lead to local sequels. Photodynamic therapy, cryosurgery and immunotherapy can also be applied as a treatment. Squamous cell carcinoma (SCC) represents 20% of cases of non-melanoma skin cancer, originates in the epidermis, is characterized as a solid tumor more frequent in the regions with the highest incidence of sunlight. The drug 5-fluorouracil (5-FU) is often used for chemotherapy treatment. However, 5-FU has a hydrophilic character, an obstacle for topical treatment, since it is necessary that the drug crosses the barrier of the stratum corneum, highly lipophilic. As a consequence, 5-FU arrives at its site of action in low concentrations, hindering therapeutic success. Thus, there are strategies to improve skin penetration, such as the use of penetration promoters, the use of lipid nanocarriers, such as liposomes, and the use of physical methods, such as microneedles. The present work has as main objective to develop liposomes with penetration promoters for topical delivery of 5-FU and associated or not with the use of microneedles for the treatment of skin cancer. Conventional liposomes and sorbitan monolaurate absorption promoter (Span 20) were developed by the classic method of hydrating the lipid film. The nanoparticles were then characterized in terms of their size, polydispersity index, zeta potential and drug encapsulation efficiency. The morphology of the liposomes was observed using atomic force microscopy. The drug release was evaluated on a cellulose membrane using the Franz cell apparatus. Cytotoxicity was studied using the MTT test with cell line A431. The study of the skin's penetration of the drug, passively and with microneedles, was carried out using intact porcine skin, with quantification of the drug in different strata using high-performance liquid chromatography. For the liposome containing Span 20, the results for particle size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency were 88.08 ± 1.06 nm, 0.169 ± 0.006 , -12.3 ± 1.04 mV and $50.20 \pm 10.20\%$, respectively. The release of 5-FU, in all groups, was above 80% after 8 h, and there was no statistically significant difference. The cytotoxicity in A431 cells corresponded to the IC_{50} of 0.622185 ± 0.26 , 30.52 ± 6.21 , 24.65 ± 18.49 , compared to the liposome with Span 20 for the liposome without Span 20 and the 5-FU solution, respectively. In skin penetration studies, a higher concentration of the drug was observed in the viable epidermis + dermis layer, corresponding to 2585.49 ± 275.98 ng/cm² for the liposome with Span 20 in passive release and 5018.05 ± 1696.52 ng/cm² after previous treatment with microneedles, the group of the liposome with Span 20 associated with microneedles being the one that resulted in the greatest cutaneous penetration of 5-FU. In view of the results obtained, we highlight the success in the development of liposomes with Span 20 absorption promoter for 5-FU encapsulation, as well as its cytotoxic action, promoting a significant improvement in the penetration of 5-FU in the skin layers in a passive way and mainly with the pretreatment using microneedles

Keywords: nanotechnology; cutaneous absorption; squamous cell carcinoma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por permitir que eu faça todos os dias valerem a pena.

Aos meus pais, Agripina Cavalcante e Nilo César Fernandes, pelo apoio contínuo a mim durante a pós-graduação, sei que sempre contarei com as orações e o apoio de vocês.

Ao meu irmão, fiel companheiro, meu primeiro grande presente de Deus, sei que posso sempre contar com seu abraço acolhedor.

A minha cunhada Juliana Ramos, por todo apoio, carinho, amizade e cumplicidade.

Ao meu avô e minha avó, Luiz Oriá Fernandes e Ana Bárbara Costa, pela torcida e afeto contínuos, por sempre oferecerem a mim o aconchego de um abraço.

Ao meu avô, bisavô e bisavó, Raimundo Cavalcante, Francisco Antônio e Maria Nila, que não estão mais conosco no plano terrestre, a vocês que sempre foram verdadeiros exemplos de patriarcas e matriarca para nossa família. Jamais esquecerei do amor e afeto destinados a mim.

Ao meu esposo, confidente, amigo, Matheus Crisóstomo, que apoia a todos os meus sonhos, que caminha ao meu lado alcançando objetivos, trilhando novos caminhos e almejando novos objetivos. Obrigada pela doce caminhada, sei que andaremos juntos pelo resto de nossas vidas.

A minha sogra, meu sogro, meu cunhado e minha cunhada, Aparecida Crisóstomo, Rogério Holanda, Yuri e Marjorie, por me acolherem e permitirem que eu faça parte dessa grande família.

Ao meu orientador, minha co-orientadora e colaboradora, Prof. Dr. Josimar Eloy, Profa. Dra. Tamara Gonçalves e Profa. Dra. Raquel Petrilli, pela acolhida durante os anos de pós-graduação sempre dispostos a me orientar da melhor maneira, vocês foram mais do que orientadores e colaboradores, vocês foram verdadeiros mentores! Buscando sempre novas oportunidades para o desenvolvimento acadêmico/científico de seus alunos. Gratidão!

Aos alunos e colaboradores do grupo CEDEFAR/GPNANO, o apoio e ajuda mútua foram de essencial importância para mim. Vocês fizeram com que a bancada fosse leve, meu muito obrigada!

A CAPES, unidade de apoio financeiro a minha pesquisa científica durante a pós-graduação. Código de financiamento 001

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), unidade de apoio financeiro a compra da coluna Zichilic5µm 200Å 150x4,6 mm (Merck SA), de acordo com o Edital N° 03/2019.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> (Carcinoma Celular Escamoso)
5FU	5-Fluorouracil
FUMP	Monofosfato de fluorouridina
FUDP	Difosfato de fluorouridina
FdUDP	Difosfato de fluorodioxiidina
FdUTP	Trifosfato de fluorodioxiidina
FdUMP	Monofosfato de fluorodioxiidina
DPD	Dihidropirimidina desidrogenase
DHFU	Dihidrofluorouracil
RNA	Ácido Ribonucleico
SPC	Fosfatidilcolina de soja
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
FDA	Food Drug Administration

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele com a esquematização de seus diferentes estratos.	16
Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil (PubChem).....	19
Figura 3. Esquema do mecanismo de ação do 5FU (LONGLY; HARKIN; JONHSTON, 2003)	21
Figura 4. Vias de transporte através do estrato córneo adaptado de LANE, 2013.....	23
Figura 5. Representação da estrutura química dos promotores de absorção, ácido oleico, Span 20, Span 60 e Tween 80 (Sigma Aldrich).....	25
Figura 6. Representação esquemática da estrutura de um lipossoma.....	29
Figura 7. Esquema dos tipos de microagulhas adaptada de YANG et al., 2020.....	32
Figura 8. Aparato da Célula de Franz montado para o experimento de avaliação da penetração cutânea de 5-FU.....	42
Figura 9. Aparato utilizado para medir a resistividade da pele de suíno.....	43
Figura 10. Imagem da morfologia dos lipossomas com SPC:Col:Span 20:5-FU 3D 10x10 µm (A), 2D 10x10 µm (B) e 2D 2x2 µm (C); e dos lipossomas com SPC:Col:5-FU 3D 10x10 µm (D), 2D 10x10 µm (E) e 2D 2x2 µm (F). Imagens com resolução de 512 pixels.....	54
Figura 11. Imagem da morfologia do lipossoma com SPC:Col:Span 20:-FU 2D 10x10 µm (A), 2D 2x2 µm (C) e lipossoma com SPC:Col:5-FU 2D 10x10 µm (B), 2D 2x2 µm (D). Imagens com resolução de 512 pixels.....	55
Figura 12. Histograma das rugosidades evidenciadas no lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU (A) e lipossoma com SPC:Col:5-FU (B)	56
Figura 13. Gráfico de tamanho médio para os lipossomas com SPC:Col:5-FU e lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU. Barras expressam tamanho máximo e mínimo	57
Figura 14. Gráfico de distribuição por tamanho de partícula da amostra lipossoma com SPC:Col:5- FU.	57
Figura 15. Gráfico de distribuição por tamanho de partícula da amostra lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU.....	58
Figura 16. Gráfico da distribuição de tamanho por DLS dos lipossomas com SPC:Col:5-FU.....	58
Figura 17. Gráfico da distribuição de tamanho por DLS dos lipossomas com SPC:Col:Span 20:5- FU	59
Figura 18. Liberação em porcentagem de 5FU em célula de Franz a 32°C e 100 rpm após 24 h .	60
Figura 19. Viabilidade celular pelo ensaio do MTT da célula A431 após incubação com solução 5- FU, lipossoma convencional contendo 5-FU e branco, lipossoma com Span 20 contendo 5-FU e branco.	62
Figura 20. Gráficos das curvas de calibração analisadas em HPLC para desenvolvimento do método bioanalítico utilizando banho ultrassônico (A) e ultraturrax (B) para extração do fármaco da pele.	65
Figura 21. Imagens dos cromatogramas referentes ao estudo de penetração cutânea do lipossoma convencional com 5-FU quantificados por HPLC. A equivale a 5-FU com metanol na concentração de 1 µg/mL, B equivale a 5-FU em pele com metanol na concentração de 1 µg/mL	65
Figura 22. Representação gráfica de quantificação de 5-FU (780 µg/ml) de forma passiva e com microagulhas no estrato córneo em solução, lipossoma convencional e lipossoma com Span 20..	69
Figura 23. Representação de quantificação de 5-FU (780 µg/ml) de forma passiva e com microagulhas na epiderme viável + derme em solução, lipossoma convencional e lipossoma com Span 20	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de alguns estudos visando o uso de promotores de absorção cutânea de fármacos	24
Tabela 2. Identificação dos lipossomas desenvolvidos	38
Tabela 3. Caracterização físico-química dos lipossomas brancos compostos por DSPC e colesterol (55:45), empregando diferentes condições de hidratação e sonicação.	46
Tabela 4. Caracterização físico-química dos lipossomas branco compostos por DSPC e colesterol com Tween80 como promotor de absorção.....	48
Tabela 5. Caracterização físico-química dos lipossomas compostos por DPSC, colesterol, Tween80 e 5-FU	49
Tabela 6. Caracterização físico-química de lipossomas compostos por SPC, colesterol e 5FU	50
Tabela 7. Caracterização físico-química de lipossomas compostos por SPC, colesterol, 5-FU, Tween80, Ácido Oleico (AO), Span 60 e Span 20, na proporção, lipídeos:promotor, de 9:1	52
Tabela 8. Caracterização físico-química do lipossoma convencional e com promotor de absorção, compostos por SPC, colesterol, Span20 e 5-FU. Os lipossomas foram preparados em ultrassom de ponta com potência de 500W.	53
Tabela 9. Valores do IC ₅₀ para a solução de 5-FU, lipossoma 5-FU e lipossoma com Span 20 e 5-FU	62
Tabela 10. Recuperação (%) de 5-FU em pele de orelha de suíno.....	64
Tabela 11. Quantificação do 5-FU em solução, lipossoma convencional com 5-FU, lipossoma com Span 20 e 5FU em estrato córneo (EC) e epiderme viável e derme (EV + D) de pele de orelha de suíno após estudo de penetração por 24h	67
Tabela 12. Avaliação estatística significativa (p<0,05) entre os grupos estudados na penetração cutânea de 5-FU	70

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Referencial Teórico.....	16
2.1 Estrutura da pele.....	16
2.2 Câncer de pele: carcinoma de célula escamosa.....	17
2.3 5-Fluorouracil no tratamento do câncer.....	19
2.4 Penetração tópica passiva e promotores de penetração cutânea.....	22
2.5 Promotores de penetração químicos.....	24
2.6 Nanotecnologia como adjuvante para veiculação tópica: lipossoma.....	27
2.7 Métodos físicos para a entrega tópica de fármacos: microagulhas.....	32
3. Objetivos.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. Material e Método.....	37
4.1 Materiais.....	37
4.2 Preparo dos lipossomas.....	37
4.3 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	38
4.4 Eficiência de encapsulação de 5-FU.....	38
4.5 Estudo das amostras por Microscopia de Força Atômica.....	39
4.6 Liberação <i>in vitro</i>	39
4.7 Citotoxicidade.....	40
4.8 Quantificação do 5-FU em pele de orelha de suíno por cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
4.9 Quantificação do 5-FU nas camadas da pele e no compartimento receptor.....	41
4.10 Pré-tratamento da pele com microagulhas.....	43
4.11 Análise Estatística.....	44
5. Resultados e Discussões.....	45
5.1 Caracterização dos lipossomas convencionais e com promotor de absorção por tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação.....	45
5.2 Caracterização dos lipossomas por microscopia de força atômica (MFA).....	54
5.3 Liberação passiva <i>in vitro</i> de 5-FU.....	60
5.4 Avaliação da citotoxicidade de 5-FU e lipossomas em linhagem de câncer de pele.....	61
5.5 Avaliação de penetração cutânea de 5-FU em solução ou lipossomas de forma passiva ou com aplicação de microagulhas.....	64
6. Conclusão.....	72

1. INTRODUÇÃO

A pele é a primeira linha de defesa do organismo, tanto contra choques mecânicos, como também contra a invasão de patógenos (EYERICH et al., 2018). Formada por tecido estratificado, é dividida em camadas. A mais externa é a epiderme, subdividida em quatro estratos, do mais interno ao mais externo temos, estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. A principal célula presente nessa camada é o queratinócito (LOSQUADRO, 2017). A derme é a camada responsável por prover nutrientes e sustentar a epiderme, onde encontraremos os vasos sanguíneos, fibras de sustentação, bem como os anexos, como glândulas, pelos e nervos (MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012).

As células epiteliais passam por um intenso processo de regeneração, entretanto, esse processo pode vir a ocorrer de forma que desrespeite a homeostase, de modo que ocorra a morte celular ou a formação de novas células em momentos desnecessários, podendo levar a formação de câncer, a depender de alterações genéticas e estímulos cancerígenos externos (ZHANG et al., 2019). O câncer de pele do tipo não-melanoma é o mais frequente no Brasil, possui altos percentuais de cura quando diagnosticado precocemente, do contrário, pode deixar lesões bastante expressivas. A estimativa do surgimento de novos casos no Brasil é de 176.930, desses 83.770 em homens e 93.160 em mulheres (INCA, 2020).

O carcinoma celular escamoso (SCC, da sigla em inglês *squamous cell carcinoma*) é um tipo de câncer de pele não-melanoma, caracterizado por ser um tumor sólido, originário na epiderme, que possui maior frequência em regiões de maior exposição solar, como cabeça e pescoço, no entanto pode ser encontrado em outros locais, como epitélio respiratório, digestivo e genital (GUAN et al., 2019). Para SCC de baixo risco o tratamento de primeira linha consiste na excisão padrão do tumor com margens clínicas seguida da avaliação padrão pós-operatória, já nos casos de alto risco de SCC a terapia padrão é a cirurgia micrográfica de Mohs (WALDMAN; SCHMULTS, 2019).

O 5-fluorouracil (5-FU) é um fármaco citotóxico muito comumente utilizado na terapia de vários outros tipos de câncer, como colo retal (ALOMRANI et al., 2019), pulmão (TSENG et al., 2015), glioblastoma (LAKKADWALA; SINGH, 2018), tratamento tópico de ceratose actínica, doença de Bowen (Morse et al. 2003) bem como para o tratamento do câncer de pele do tipo não-melanoma, como o SCC (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020). Seu mecanismo de ação está relacionado principalmente a interferência na síntese de DNA, inibir a função do RNA e inibir o processamento e síntese de timidilato; São os metabólitos ativos do 5FU que interrompen a síntese de RNA e de timidilato (HANDALI et al., 2019; MOGHIMIPOUR et al., 2018a). É uma molécula muito pequena, de baixo peso molecular, que possui caráter hidrofílico, ou seja, um fármaco que

possui alta solubilidade, porém baixa permeação em relação a membranas biológicas, sendo assim, quando aplicado pela via tópica é mal absorvido pelos tecidos da pele (THOMAS et al., 2011).

A pele tem sido estudada como uma via alternativa para a veiculação tópica de medicamentos, tendo em vista algumas vantagens frente a vias mais convencionais, no entanto, sua principal desvantagem é a baixa penetração de fármacos, principalmente considerando moléculas com caráter hidrofílico (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). A principal barreira a ser ultrapassada/vencida é o estrato córneo (EC), uma estrutura muito fina, mas ao mesmo tempo muito bem organizada composta por células mortas queratinizadas e achatadas, chamadas de corneócitos, envoltos por um denso líquido rico em lipídios, o que confere a essa camada uma estrutura altamente rígida e “fechada” à passagem de substâncias (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2020).

Algumas estratégias são adotadas a fim de melhorar a penetração e concentração de substâncias nas camadas da pele. Uma delas é a utilização de intensificadores/promotores de penetração, que são substâncias capazes de aumentar a permeabilidade de um substância através da pele (JAIMES-LIZCANO; LAWSON; PAPADOPOULOS, 2011). Os tensoativos são constituintes de formulações com a finalidade de solubilizar componentes de caráter lipofílico, partindo desse princípio, podem ter a capacidade de solubilizar os lipídios que estão presentes no estrato córneo, facilitando a penetração de substâncias (WILLIAMS; BARRY, 2012). Alguns estudos mostram a utilização de tensoativos não-iônicos que possuem essa finalidade, como Tween 60 e Span 60 (JUNYAPRASERT et al., 2012), Span 20, Tween 20 e azona (LÓPEZ et al., 2000), Tween 20 e Tween 85:Span 20 (COVIELLO et al., 2015).

Outra estratégia é a encapsulação de fármacos em sistemas nanométricos, como os lipossomas, que são vesículas formadas por fosfolipídeos que na presença de meio aquoso se desdobram e adquirem uma forma concêntrica, formando um núcleo hidrofílico e uma bicamada lipofílica (BRUCH et al., 2019). Por serem de natureza lipídica são bastante estudados para a finalidade de aplicação cutânea de fármacos, isso se deve a sua natureza lipofílica ser compatível com o estrato córneo, o que pode acarretar em melhor penetração pelas camadas da pele (CHACKO et al., 2020). Os lipossomas permitem modificações na estrutura da sua bicamada lipídica, possibilitando a adição de promotores de absorção, o que tende a melhorar a penetração dessas nanopartículas na pele, cujo efeito já foi demonstrado em muitos estudos, como PLEGUEZUELOS-VILLA et al., 2018 (lipossomas ultradeformáveis para carrear narigina), BAHRAMIZADEH et al., 2019 (lipossomas deformáveis para encapsular metotrexato), DAR et al., 2020 (lipossomas ultradeformáveis contendo Anfotericina B-miltefosina).

Como estratégia adicional para melhorar a penetração de fármacos nas camadas da pele temos a utilização de métodos físicos, como as microagulhas. São estruturas pouco invasivas que possuem tamanho micrométrico, possuem a capacidade de perfurar o estrato córneo e epiderme formando microporos por onde é possível que o fármaco penetre. As microagulhas têm tamanho suficiente para adentrar no estrato córneo, mas não tem capacidade para estimular as terminações nervosas, portanto, se trata de um método não doloroso LI et al., 2020. Na literatura podemos encontrar trabalhos que utilizam as microagulhas como método físico associadas ao 5-FU, em forma de creme ou solução, para o tratamento do vitiligo, como pode ser visto nos estudos de JHA; SONTHALIA, 2019 e no estudo de KUMAR; BHARTI; AGARWAL, 2019. Porém, não está relatado na literatura um estudo que combine lipossomas contendo promotor de penetração para encapsular 5-FU e microagulhas com o intuito de aprimorar a penetração cutânea e acúmulo do fármaco nas camadas da pele.

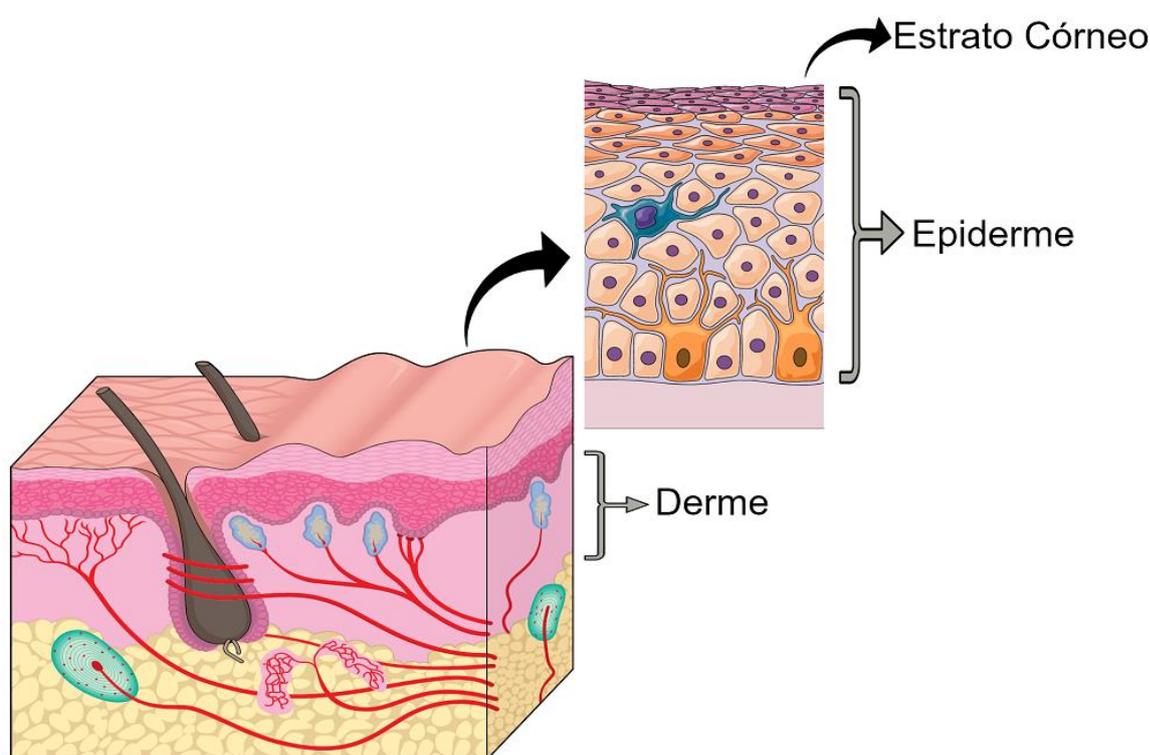
Diante do exposto, no presente trabalho contemplamos o desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* de lipossomas contendo promotor de absorção para encapsulação de 5-FU, uma composição inédita com o objetivo de melhorar a penetração nas camadas da pele, passivamente e aplicando tratamento prévio com microagulhas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura da pele

A pele (Figura 1) é a primeira defesa física do nosso organismo, é colonizada por microrganismos que estão dispostos sobre toda sua superfície, que fazem uma ponte entre o ambiente externo e a unidade imunológica da pele, enviando sinais de defesa para possíveis patógenos (EYERICH et al., 2018). Além disso, o tecido cutâneo é responsável por regular a temperatura corporal, absorver impactos mecânicos, proteger frente a radiação ultravioleta A e B, além de ser o maior órgão do corpo humano (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

Figura 1. Estrutura da pele com a esquematização de seus diferentes estratos.



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software *MindTheGraph*

A pele é um tecido estratificado, sendo dividida em camadas, a primeira e mais externa é a epiderme, responsável pela coloração e textura. Sua principal célula é o queratinócito que durante sua maturação atravessa as camadas da epiderme, indo da mais interna até chegar a superfície onde o processo de síntese da queratina está completo formando um complexo rígido, de composição lipídica. A camada mais interna presente na epiderme é o estrato basal, que constitui a camada de divisão celular, onde as células basais se dividem e passam a formar os queratinócitos. Após a divisão ocorre a migração para a camada seguinte, estrato espinhoso, nesta camada ocorre ligações entre as células através dos desmossomos, sendo possível visualizar os grânulos lamelares no

interior das células. O estrato granuloso é a camada seguinte, onde é possível visualizar os filamentos de queratina se agregando, à medida que os queratinócitos atravessam as camadas da epiderme, ocorre a perda de organelas e assim perdem sua funcionalidade, até que chegam a última camada e mais externa, o estrato córneo, onde a queratinização está completa, as células são anucleadas, justapostas e cercadas por uma densa camada lipídica (LOSQUADRO, 2017).

A camada basal constitui a junção entre a epiderme e a derme. A camada dérmica é responsável por prover nutrientes e sustentar a camada epidérmica, é subdividida em derme papilar, que é a camada superior composta por pelos, nervos e papilares responsáveis por nutrir a epiderme, e a reticular composta por um tecido conjuntivo que contém fibras de colágeno e elastina. Por terem alta resistência a tração as fibras de colágeno evitam que ocorra ruptura da pele quando a mesma é contraída ou esticada. A elastina é um filamento mais fino e está disposto de forma entrelaçada nas fibras de colágeno, também possui propriedades elásticas que permitem que a pele volte a sua composição inicial após sofrer algum estresse (MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012; MIKESH et al., 2013).

Na derme também podemos encontrar anexos a pele, como pelos, glândulas, nervos. As glândulas sudoríparas tem a função de secretar suor, podendo ser divididas em dois tipos, as glândulas écrinas (suor, termoregulação) e as glândulas apócrinas (suor leitoso, puberdade). As glândulas sebáceas possuem uma unidade secretora, algumas delas podem estar unidas a um folículo capilar, são responsáveis pela secreção de sebo, essa secreção protege os cabelos evitando que fiquem secos e quebrem, evitam a evaporação excessiva da água da pele, atua como lubrificante, tem função bactericida e antifúngica (MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012).

2.2 Câncer de pele: carcinoma de células escamosas

As células presentes no tecido epitelial tem alto poder de regeneração, sendo assim, muitas células novas são formadas constantemente, todavia algumas vezes esse sistema de regeneração celular não ocorre de forma homeostática, levando à formação de novas células ou a morte celular em momentos desnecessários, com formação de uma massa tumoral (ZHANG et al., 2019). Um dos fatores de risco que mais estão relacionados com o surgimento do câncer de pele é a exposição à radiação UV, sendo classificada como agente iniciador ou promotor de carcinogênese, seja ela por meio da exposição excessiva aos raios solares ou pelo uso de bronzamento artificial, esse último foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como uma fonte carcinogênica para o ser-humano. A radiação UVA possui comprimento de onda maior do que a radiação UVB, sendo capaz de penetrar mais profundamente na pele e causar mutações em genes supressores de tumor ou outros oncogenes, danos diretos ao DNA ou indiretos por meio de estresse

oxidativo. Assim, cuidados com o tempo e frequência de exposição à luz solar, bem como o uso de agentes protetores, tem o poder de atenuar as chances de aparecimento do câncer de pele na fase adulta, visto que os danos da radiação solar só serão notados anos após a exposição. O surgimento na pele de manchas que coçam, ardem, descamam ou sangram, são sinais de alerta (KORNEK; AUGUSTIN, 2013; O’SULLIVAN et al., 2019; INCA, 2020).

O câncer de pele do tipo não melanoma é o mais frequente e de menor mortalidade, se for detectado e tratado previamente existe alta possibilidade de cura. Por outro lado, caso o diagnóstico seja feito tardiamente e o tratamento negligenciado, pode deixar marcas de mutilação bastante expressivas nos locais da lesão. Apresenta diferentes tipos de tumores, entre os mais frequentes estão carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide (INCA, 2020).

Entre os tipos de tumores de câncer de pele não melanoma tem-se o carcinoma de célula escamosa (SCC, sigla do inglês *squamous cell carcinoma*), que representa 20% do tipos de câncer. É muito frequente em pessoas negras, e seu aparecimento pode estar relacionado a processos de cicatrização ou processos inflamatórios da pele (HOGUE; HARVEY, 2019). As células malignas se originam na epiderme, podendo invadir a derme se metastatizando para outros locais, caso o tumor fique restrito a epiderme se denomina SCC in situ ou doença de Bowen (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020). Trata-se de um tumor sólido que pode se desenvolver tanto no tecido epitelial, como também em diferentes sítios do organismo como epitélio respiratório, digestivo e genital. No entanto, os locais mais comuns para o surgimento desse tipo de câncer são cabeça e pescoço, devido à maior frequência de exposição à radiação solar (GUAN et al., 2019).

As lesões se apresentam solitárias e de cunho escamosa avermelhada, e seu aparecimento é geralmente nas regiões de maior exposição solar. O diagnóstico deve ser feito através de uma biópsia de modo que possa ser observado a profundidade da lesão, podendo ser uma invasão perineural ou linfovascular (WALDMAN; SCHMULTS, 2019).

De fato alguns fatores de alterações/mutações genéticas estão relacionadas ao aparecimento do SCC. A proteína TP53 funciona como codificador de fator de transcrição, o nível basal dessa proteína na pele é baixo, porém aumenta frente ao estímulo frente a radiação UV, de modo que as células presentes em tumores de SCC são facilmente coradas na presença de um anticorpo contra TP53 (WIKONKAL; BRASH, 1999). Ademais, a mutação no receptor NOTCH é um mecanismo supressor de tumor em SCC, importante no aparecimento de carcinogênese cutânea induzidos por HRAS (SOUTH et al., 2014).

Para SCC de baixo risco o tratamento de primeira linha consiste na excisão padrão do tumor com margens clínicas seguida da avaliação padrão pós-operatória, já nos casos de alto risco de SCC a terapia padrão é a cirurgia micrográfica de Mohs (WALDMAN; SCHMULTS, 2019), uma técnica

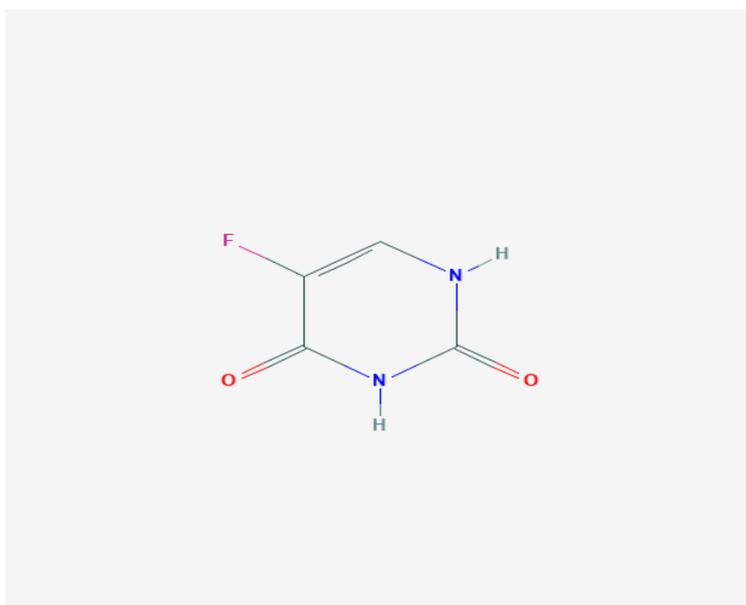
que foi desenvolvida em 1938 pelo médico Frederic E. Mohs. Essa cirurgia é considerada uma técnica refinada, com 98% de precisão e efetiva no tratamento do câncer de pele. O procedimento consiste na retirada do câncer da pele, camada por camada, e do exame de cada uma delas ao microscópio, até a remoção completa do tumor, com posterior reconstituição do local da ferida (SBD, 2020).

De 5-12% dos casos de SCC podem progredir para metástase, o procedimento cirúrgico muitas vezes deixa grandes cicatrizes no local do tumor como também interfere na funcionalidade do tecido lesionado (PETRILLI et al., 2018a). Desse modo, o desenvolvimento de terapias específicas ao alvo se tornam fundamentais para minimizar esses problemas e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes em tratamento.

2.3 5-Fluorouracil no tratamento do câncer

O 5-fluorouracil (5-FU) (Figura 2) foi sintetizado primeiramente por Heidelberger et al., em 1957 como fármaco antitumoral citostático de uso sistêmico (EWERT DE OLIVEIRA et al., 2020). É um fármaco citotóxico muito comumente utilizado na terapia de vários outros tipos de câncer, como colo retal (ALOMRANI et al., 2019), pulmão (TSENG et al., 2015), glioblastoma (LAKKADWALA; SINGH, 2018).

Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil (PubChem)



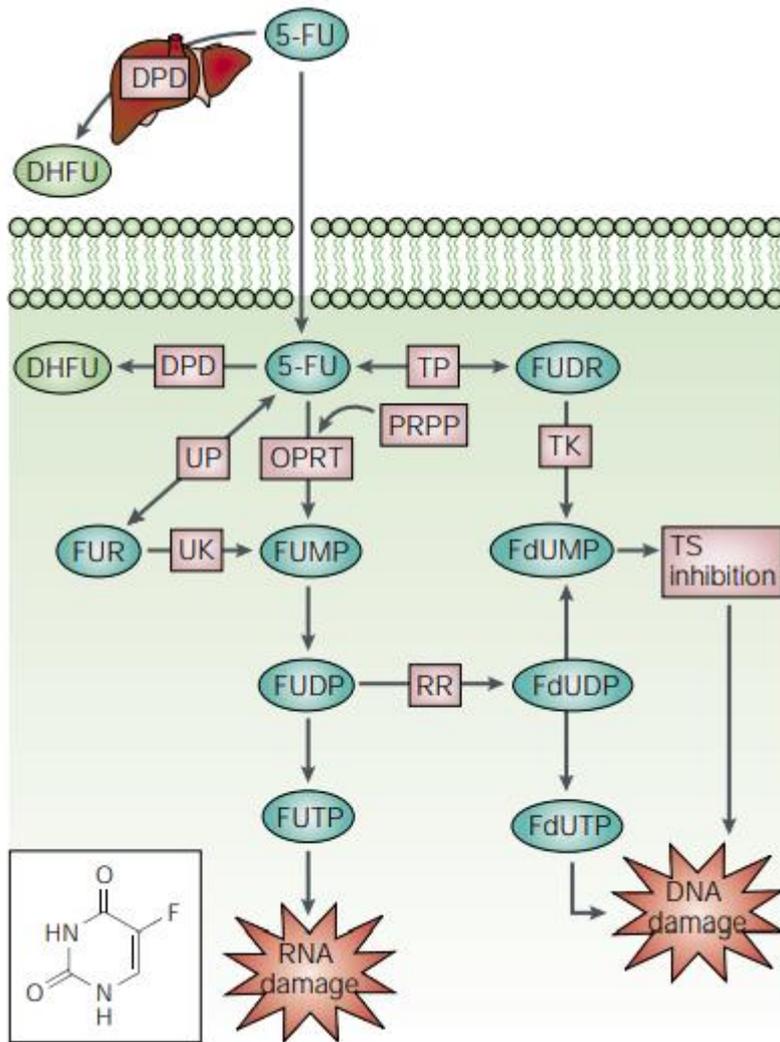
O 5-FU também pode ser utilizado para o tratamento tópico de ceratose actínica, doença de Bowen (MORSE et al. 2003) bem como para o tratamento do câncer de pele não-melanoma, como

o SCC (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020). Estudo prévio mostrou que o tratamento consistindo de injeções intralesionais em quatro locais diferentes, em doses com variação de 0,8 a 2,4 mL, resultou em involução completa do câncer, sendo que a repetição da biópsia mostrou ser negativa para SCC residual. RANA; SHARMA; PREET, 2019 demonstraram a ação sinérgica do 5FU e nisina no tratamento do câncer de pele, onde os resultados evidenciaram uma diminuição no número de tumores em camundongos fêmeas BALBc após a aplicação tópica dos fármacos. Foi observado ainda um efeito antiproliferativo citotóxico em linhagem de células A431 dose-dependente com a diminuição do IC₅₀ em 8 vezes quando o foi usado o tratamento combinado de 5FU e nisina.

O 5-FU é um fármaco que já possui uso clínico, além de possuir estudos clínicos visando uma nova abordagem de tratamento de câncer com o uso do 5FU, como é o exemplificado por WRIGHT et al., 2015 que relataram um estudo clínico de fase 1 para examinar a farmacocinética, a segurança e a dosagem recomendada de injeção intravenosa semanal de 5-fluorouracil (5-FU) em crianças e adultos jovens com tumor cerebral. Os pacientes considerados elegíveis para esse estudo tinham idade ≤ 22 anos com diagnóstico de ependimoma intracraniano ou espinhal recorrente. Inicialmente se estabeleceram 3 doses de 400 (nível 0), 500 (nível 1) e 600 (nível 2) mg/m². Foi demonstrado que o tratamento no nível de dosagem 0 foi bem tolerado em todos os pacientes; o nível de dosagem 1 foi bem tolerado em pacientes pré-tratados menos intensamente com quimioterapia. Os teste de farmacocinéticas demonstraram que o 5-FU possui farmacocinética linear em pacientes pediátricos com dosagem de 400–650 mg/m². Algumas limitações para uma avaliação de eliminação não-linear de 5-FU após administração em bolus são o número limitado da amostra e o número de doses estudadas. O trabalho forneceu dados farmacocinéticos, de tolerabilidade, bem como de toxicidade de administração do 5-FU em bolus.

Considerando o tratamento do câncer pele, comercialmente pode ser encontrado na forma de creme para aplicação tópica, tais como Efurix® 5% (Valeant Pharmaceuticals, Int., Costa Mesa, CA), Fluoroplex® 1% (Allergan, Inc., Irvine, CA) e Carac® 0,5% (Dermik Laboratories, Berwyn, PA).

Figura 3. Esquema do mecanismo de ação do 5FU (LONGLEY; HARKIN; JONHSTON, 2003)



O 5-FU é um análogo de uracil que contém na posição C5 da sua molécula um átomo de flúor no lugar do átomo de hidrogênio. A Figura 3 esquematiza o mecanismo do 5-FU, para entrar na célula o fármaco usa o mesmo mecanismo facilitado de transporte do uracil, uma vez no interior celular o 5-FU é ativado após sua conversão em monofosfato de fluorouridina (FUMP) que é então fosforilado em difosfato de fluorouridina (FUDP) ou ainda ou convertido em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP), esse último pode ser convertido em metabolitos ativos por fosforilação, gerando trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) ou sofrer desfosforilação, gerando monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP). A dihidropirimidina desidrogenase (DPD) é a enzima limitante do mecanismo de ação do fármaco em células normais e tumorais, essa enzima converte o 5-FU em dihidrofluorouracil (DHFU) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Seu mecanismo de ação está relacionado principalmente a interferência na síntese de DNA, inibir a função do RNA e inibir o processamento e síntese de timidilato; São os metabólitos ativos do 5-FU que interrompem a síntese de RNA e de timidilato (HANDALI et al., 2019; MOGHIMIPOUR et al., 2018a).

Dentre algumas desvantagens quanto seu uso na clínica podemos destacar a sua baixa meia vida (em torno de 20 min) devido ao seu rápido metabolismo e inespecificidade em sua distribuição sistêmica, por conta disso esse fármaco pode desenvolver alguns efeitos colaterais sistêmicos (cardíacos, hematológicos, neurais) e toxicidades dermatológicas (MOGHIMIPOUR et al., 2018a).

É uma molécula muito pequena, de baixo peso molecular, que possui caráter hidrofílico, devido a essas características é classificada pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica do Food Drug Administration (FDA) como de Classe III, ou seja, um fármaco que possui alta solubilidade, porém baixa permeação em relação a membranas biológicas, sendo assim, quando aplicado pela via tópica é mal absorvido pelos tecidos da pele (THOMAS et al., 2011).

2.4 Penetração tópica passiva e promotores de penetração cutânea

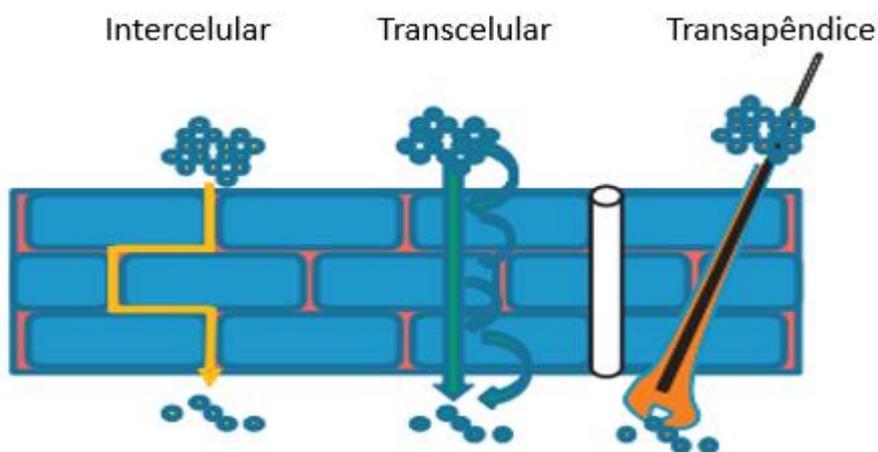
A pele tem sido uma ótima via alternativa para a veiculação de medicamentos, tendo em vista algumas vantagens frente a vias mais convencionais, como a via oral. Entre as vantagens podemos citar melhorar a adesão ao tratamento, principalmente em pacientes que se encontram em estado de inconsciência ou que apresentam dificuldades na deglutição, aumento da biodisponibilidade dos medicamentos, tendo em vista que por meio dessa via não temos o metabolismo de primeira passagem ou a degradação no trato gastrointestinal, reduzindo grande parte dos efeitos colaterais. No entanto, sua principal desvantagem é a baixa penetração de fármacos, principalmente considerando moléculas com caráter hidrofílico (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

Considerando o tratamento tópico, o fármaco é aplicado diretamente na pele, no sítio da doença a ser tratada, a partir de então deve ocorrer o transporte de modo eficiente do fármaco até o local de ação na pele. No entanto, esse processo é limitado visto que a pele possui grandes barreiras que dificultam a devida permeação cutânea de substâncias (CHACKO et al., 2020).

Como abordado anteriormente, a estrutura da pele forma uma perfeita barreira protetora, dentre elas, a principal estrutura de ser ultrapassada/vencida é o estrato córneo (EC), que possui uma estrutura muito fina, mas ao mesmo tempo muito bem organizada composto por células mortas queratinizadas e achatadas, chamadas de corneócitos, envoltos por um denso líquido rico em lipídios, o que confere a essa camada uma estrutura altamente rígida e “fechada” à passagem de substâncias. Com isso, em 1975, Micheals et al propuseram o modelo “tijolo e argamassa”, onde as células mortas representariam o tijolo e o rico líquido lipídico a argamassa (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2020).

A difusão passiva através do EC pode ocorrer por meio de três rotas (Figura 4): transcelular, intercelular e através dos apêndices da pele. Os apêndices, como folículos e glândulas, são invaginações profundas nas camadas do epitélio, sendo a via de escolha quando se deseja a difusão sistêmica de um fármaco. Moléculas de caráter apolar e com peso <500 Da podem facilmente permear através da rota intercelular, enquanto que moléculas polares, geralmente, utilizam a rota transcelular (SALA et al., 2018). Após aplicação de uma formulação tópica o fármaco deve ser liberado do seu veículo, em seguida ocorre uma partição do mesmo para o EC, em seguida, mediante um gradiente de concentração, esse fármaco deve se difundir através do EC até chegar na epiderme viável, onde um novo processo de partição e difusão deve ocorrer até que o fármaco chegue na derme. A depender da doença a ser tratada, o fármaco pode parar na epiderme viável ou chegar até a derme onde pode ganhar a circulação sistêmica (LANE, 2013).

Figura 4. Vias de transporte através do estrato córneo adaptado de LANE, 2013



Alguns fatores influenciam na penetração de substâncias através da pele. Por exemplo, durante o processo de partição e difusão da molécula pode ocorrer ligação de forma reversível ou não com estruturas do tecido epitelial, como as proteínas presentes nas camadas da pele, podendo desencadear reação fisiológicas ou alérgicas (LANE, 2013); em uma pele saudável a renovação celular ocorre a cada 14 dias, ou seja, diferenciação celular, migração através das camadas da pele, formação do EC e descamação dos corneócitos, são etapas que podem dificultar a penetração de substâncias na pele (SALA et al., 2018); uma boa hidratação do EC faz com que ocorra uma diminuição da resistência à difusão; a distribuição dos apêndices na extensão da pele não é uniforme o que pode afetar a penetração de fármacos através da pele; o coeficiente de partição óleo/água é outro fator determinante visto que moléculas mais lipofílicas possuem maior facilidade de permear pelo EC e demais camadas da pele; as propriedades físico-químicas do veículo ao qual o fármaco

de interesse está inserido também são um fator relevante, visto que os componentes que formam o mesmo entraram em contato com a pele, podendo auxiliar ou dificultar a penetração da droga (BAROLI, 2010).

Diante das dificuldades para um tratamento tópico eficiente algumas estratégias são adotadas a fim de melhorar a penetração e concentração de substâncias nas camadas da pele. Geralmente três estratégias são mais usuais, a primeira é a utilização de adjuvantes químicos que são capazes de aumentar a partição do fármaco e aumentando a fluidez dos lipídios da pele; a segunda estratégia é a utilização de sistemas nanoestruturados; a terceira estratégia para aumentar a penetração cutânea de fármacos é a utilização de métodos físicos (iontoforese, microagulhas, sonoforese) que melhoram a entrega do fármaco ao local de ação específico driblando o EC (CHACKO et al., 2020).

2.5 Promotores de Penetração Químicos

Os intensificadores/promotores de penetração químicos são substâncias que possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade de uma determinada substância nas camadas da pele (JAIMES-LIZCANO; LAWSON; PAPADOPOULOS, 2011). Existem algumas propriedades que são estimadas para que uma dada substância química possa ser classificado como um ótimo promotor de absorção, como ser não-tóxico, não-irritante, não-alergênico, não devem ter atividade farmacológica dentro do corpo, devem permitir que os agentes terapêuticos penetrem com mais facilidade e devem ser compatíveis com diversos excipientes e fármacos (WILLIAMS; BARRY, 2012).

No presente trabalho contemplamos a adição de promotor de penetração na bicamada lipídica do lipossoma, a fim de melhorar a penetração cutânea do 5-FU fazendo com que o fármaco consiga chegar na epiderme, sítio onde está localizado o tumor de SCC. Para isso, estudamos a utilização de quatro promotores de penetração, Tween 80 (Polissorbatato 80), Span 20 (Monolaurato de sorbitano), Span 60 (Estearato de sorbitano) e Ácido Oleico (Figura 5).

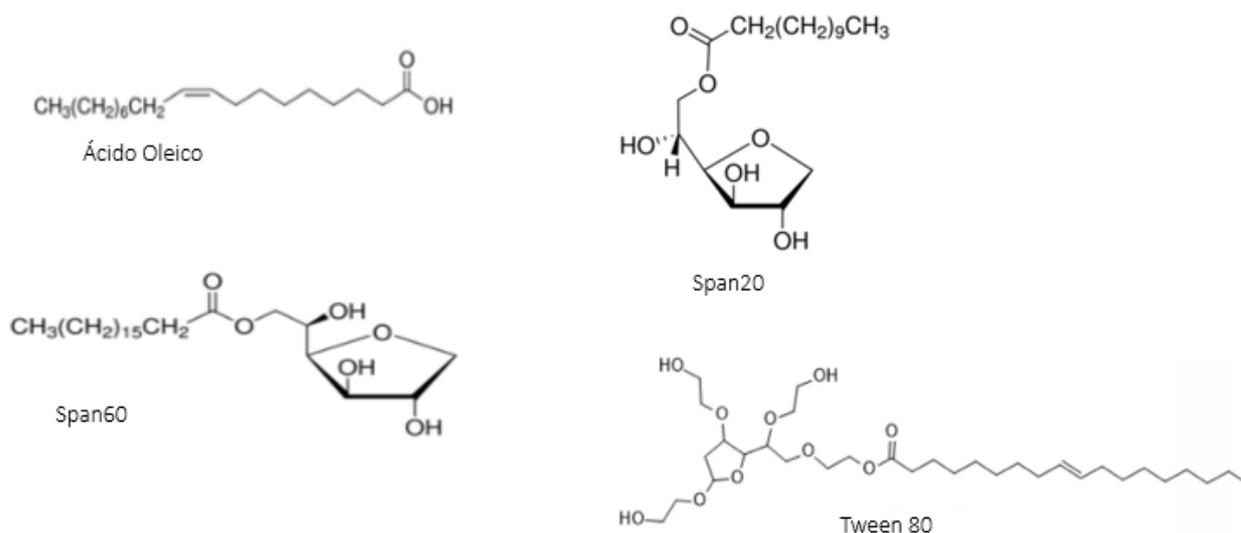
Na Tabela 1 estão exemplificados alguns estudos encontrados na literatura que abordam a utilização desses promotores.

Tabela 1. Resumo de alguns estudos visando o uso de promotores de absorção cutânea de fármacos

Promotor de Penetração	de	Objetivo	Referência
Ácido oleico e propilenoglicol	e	Estudar a influência do ácido oleico como promotor de penetração do Tenoxicam e propileno glicol para co-intensificador de penetração.	(LARRUCEA et al., 2001)

Ácido oleico	Investigar a absorção percutânea <i>in vivo</i> de manitol, 6-mercaptopurina e butilparabeno na presença de ácido oleico.	(YAMASHITA et al., 1995)
Tween 60 e Span 60	Desenvolver niosomas compostos por Tween60/Span60 para encapsular ácido elágico e investigar sua entrega cutânea	(JUNYAPRASERT et al., 2012)
Span 20, Tween20 e Azona	Aprimorar a influência do grupo funcional polar nos efeitos dos tensoativos não iônicos na permeabilidade da pele.	(LÓPEZ et al., 2000)
Tween 20 e colesterol ou Tween 85 e Span 20	Incorporar niosomas em gel visando melhorar a penetração e disponibilidade dérmica de glicirrizinato de monoamônio.	(COVIELLO et al., 2015)
Span 20	Estudar a interação do Span 20 com diferentes modelos de lipídios do estrato córneo.	(LÓPEZ-CASTELLANO et al., 2000)

Figura 5. Representação da estrutura química dos promotores de absorção, ácido oleico, Span 20, Span 60 e Tween 80 (Sigma Aldrich)



O ácido oleico (AO) é um agente potencializador de penetração cutânea. Estudos revelaram que a rota de penetração mais afetada pelo ácido oleico é a rota apolar através do estrato córneo, seu mecanismo está relacionado tanto em aumentar a difusão como a partição do fármaco (YAMASHITA et al., 1995).

LARRUCEA et al., 2001 desenvolveram um gel e investigaram a penetração cutânea do fármaco utilizando o aparato da célula de Franz. Os resultados demonstraram que a utilização de

ácido oleico aumentou a penetração do fármaco nas camadas da pele, e a utilização do propilenoglicol com ácido oleico juntos levou ao aumento da absorção do fármaco na pele.

YAMASHITA et al., 1995 avaliaram a capacidade do ácido oleico de melhorar a penetração cutânea de três fármacos de diferente lipofilicidade. Os resultados *in vivo* mostraram que o ácido oleico aumentou a concentração dos fármacos na pele, a absorção de manitol e 6-mercaptopurina foi acrescida significativamente, enquanto que a absorção de butilparabeno obteve ligeiro aumento com a dose baixa de ácido oleico, mas teve uma queda com a dose alta.

Os tensoativos são largamente utilizados nas formulação com a finalidade de solubilizar componentes de caráter lipofílico, partindo desse princípio, são substâncias que possam ter a capacidade de solubilizar os lipídios que estão presentes no estrato córneo, facilitando a penetração de fármacos. São compostos por uma cadeia de alquila ou arila lipofílica e um grupo de cabeça hidrofílica, são usualmente descritos em virtude da natureza da cabeça hidrofílica (WILLIAMS; BARRY, 2012). Os tensoativos de caráter não-iônicos são frequentemente estudados como promotores de penetração cutânea. Por exemplo, JUNYAPRASERT et al., 2012 desenvolveram niosomas compostos de Tween 60 e Span 60 para encapsular ácido elágico (EA) como forma de melhorar a entrega cutânea. Utilizando a célula de Franz para realizar o teste de penetração cutânea pode ser observado que a permeabilidade e a concentração de EA na epiderme foi maior com os niosomas em comparação com a solução do fármaco. LÓPEZ et al., 2000 estudaram a influência de diferentes tensoativos não-iônicos, Span 20, Tween 20 e azona, na sua capacidade melhorar a permeabilidade de fármacos na pele. Para o 5-Fluorouracil, apenas o pré-tratamento com Tween 20 não resultou em melhora na penetração cutânea; para a antipirina, 2-fenil etanol e 4-fenil butanol o pré-tratamento com Span 20 (solução a 5%) e azona (solução a 1 e 5%) aumentaram a permeação na pele. De acordo com os resultados, Span 20 e azona se mostraram mais adequados para aumentar a penetração cutânea.

Os tensoativos devem possuir baixa irritabilidade cutânea, podem ser adicionados as formulações para solubilizar o componente ativo na matriz lipídica do estrato córneo por meio de fluidização ou extração lipídica, ou ainda se ligar aos filamentos de queratina de modo a perturbar os corneócitos (STRATI et al., 2021). COVIELLO et al., 2015 desenvolveram um gel composto por goma xantana e goma de alfarroba para carrear vesículas de tensoativos não-iônicos, compostos por Colesterol:Tween 20 e Tween85:Span 20, para modular a liberação de glicirrizinato de monoamônio. Estudos de reologia mostraram que a incorporação dos tensoativos não desestruturou a composição do gel, o estudo de liberação mostrou que, aproximadamente, 100% do fármaco é liberado quando na presente das vesículas, em comparação com o fármaco livre no gel. As

formulações do gel com as vesículas de tensoativo se mostraram estáveis após um período de um ano.

Os efeitos do Span 20 (monolaurato de sorbitano) como promotor cutâneo são muito relacionados a sua cadeia alquil C12, que permite a capacidade de se inserir entre a cadeia acil de lipídios nas bicamadas do espaço intercorneócito. LÓPEZ-CASTELLANO et al., 2000 estudaram a influência do Span 20 em modelo de monocamada nos lipídeos presentes no estrato córneo. Utilizando modelos de monocamadas compostos por colesterol (modelo 1), ceramidas (modelo 2) e ácidos graxos livres (modelo 3), e a combinação de ceramidas + colesterol (modelo 4) e ceramidas + colesterol + ácidos graxos livres (modelo 5), que são os maiores componentes da massa lipídica presente no estrato córneo. Os resultados mostraram que o Span 20 reduz o estado de condensação de filmes monomoleculares das monocamadas nos modelos 1, 2 4 e 5, aumentando assim a fluidez dentro das monocamadas. De acordo com os resultados, o Span 20 pode ser considerado um potenciador percutâneo, atuando sobre a fluidez da estrutura lipídica do estrato córneo, aumentando a difusividade das moléculas.

2.6 Nanotecnologia como adjuvante para veiculação tópica: lipossomas

A nanotecnologia surge como um campo de intensa interdisciplinaridade entre áreas de estudo da ciência, saúde e medicina. Suas aplicações se encontram principalmente no desenvolvimento de novas terapias, diagnóstico, controle e monitoramentos de doenças, principalmente o câncer e algumas doenças inflamatórias (NANCE, 2019). As pesquisas para a aplicação de nanopartículas no tratamento do câncer de pele e/ou lesões pré-cancerosas estão avançando e se baseiam, principalmente, no fato de que as nanopartículas tem a capacidade de maior penetrabilidade nas camadas da pele e no sítio tumoral, fazendo com que ocorra maior acúmulo do fármaco do local de ação, bem como minimizar a dosagem, os efeitos colaterais, aumentando assim a adesão ao tratamento (KRISHNAN; MITRAGOTRI, 2020).

Os lipossomas (Figura 6) são vesículas de tamanho nanométrico descritos pela primeira vez por Bangaham em 1965, sendo constituídas por fosfolipídios que quando em meio aquoso se desdobram e formam uma vesícula concêntrica com um núcleo hidrofílico e bicamada lipofílica. Desse modo, tornam-se uma excelente nanopartícula para a veiculação e entrega de fármacos, tanto com caráter hidrofílico como com caráter lipofílico, possibilitando a utilização de uma terapia combinada. Além de possuírem baixa imunogenicidade, o que acarreta poucas reações de toxicidade e elevada biocompatibilidade com o organismo humano (BRUCH et al., 2019). São nanocarreadores que permitem modificações estruturais tanto em sua membrana (adição de novos constituintes)

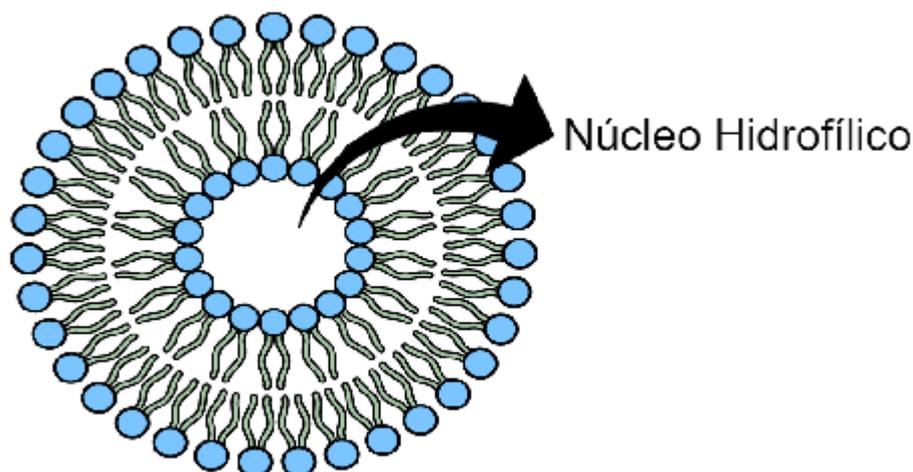
como no seu microambiente (tornando essa vesícula responsiva a estímulos) com o intuito de melhorar sua aplicabilidade e potencialização do efeito biológico (LI et al., 2019).

Dentre suas grandes vantagens para a administração e entrega de fármacos podemos citar a redução do tamanho da nanopartícula e aumento de área superficial, encapsulação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, proteção do fármaco contra possíveis danos no organismo, além de diminuir possíveis efeitos colaterais relacionados aos fármacos (TRAN et al., 2017; WOLFRAM; FERRARI, 2019).

O estrato córneo atua como uma excelente barreira de proteção a penetração de agentes externos a pele, o que dificulta o sucesso de terapias tópicas para a entrega eficiente de fármacos até o seu local de ação. Desse modo, o desenvolvimento de nanocarreadores que permitem uma entrega direcionada ao sítio de ação, com uma concentração adequada do fármaco, é de extrema valia para o tratamento de doenças cutâneas. Os nanocarreadores podem interagir com a barreira da pele de diferentes maneiras para promover a penetração do fármaco, i) pode ocorrer acúmulo dos nanocarreadores na superfície do estrato córneo com posterior liberação do fármaco nas camadas da pele; ii) os nanocarreadores podem encontrar os apêndices dispostos na pele permitindo um transporte passivo do fármaco; iii) os nanocarreadores podem ainda diminuir a integridade do estrato córneo, aumentando assim a fluidez do fármaco nas camadas da pele (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2020).

Os nanocarreadores de natureza lipídica, como os lipossomas, são bastante estudados para a finalidade de aplicação cutânea de fármacos, isso se deve a sua natureza lipofílica ser compatível com o estrato córneo, o que pode acarretar em melhor penetração pelas camadas da pele (CHACKO et al., 2020).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura de um lipossoma



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software *MindTheGraph*

Diversos estudos já relataram o uso bem sucedido de lipossomas como promotores de penetração cutânea de fármacos. Diversos estudos já demonstram o papel de lipossomas como formulações adjuvantes no tratamento tópico de câncer de pele. Por exemplo, Jose et al. 2018 estudaram a co-encapsulação de curcumina e anti-STAT3 siRNA em lipossoma, associados a iontoforese, para o tratamento do câncer de pele. Os resultados mostraram uma ótima inibição do crescimento celular quando tratadas com lipossomas co-encapsulados com curcumina e anti-STAT3 siRNA, em comparação com os demais grupos estudados. Os lipossomas com curcumina e anti-STAT3 siRNA associados a iontoforese foram promissores na melhora da penetração cutânea e na redução do tamanho e volume tumoral. SINGH et al., 2018 desenvolveram lipossomas revestidos com ouro para encapsular a curcumina (Au-Lipos Cur NPs) e verificar suas propriedades fototérmicas e contra o câncer de pele. Os resultados de *uptake* celular mostraram que Au-Lipos Cur NPs se ligaram as células cancerígenas com maior afinidade em comparação aos demais grupos, após a terapia fototérmica em células B16F10 o grupo Au-Lipos Cur NPs mostraram maior citotoxicidade e menor viabilidade celular em comparação aos demais grupos.

ZHOU et al., 2014 desenvolveram um sistema de liberação transdérmica utilizando lipossoma com vitamina C (VitC) revestido com pectina. O estudo *in vitro* de permeação cutânea utilizando pele de camundongo mostrou que após 24 horas as taxas de concentração cumulativas na pele de VitC foram maiores para a formulação de lipossoma revestidos com pectina em comparação com as demais formulações estudadas.

PARK; JO; JEON, 2014 investigaram a permeação cutânea de lipossoma contendo resveratrol revestidos com quitosana. Utilizando o aparato da célula de Franz e pele íntegra do dorso de camundongo albino para o estudo de permeação cutânea, após 24 horas pode ser observado que o sistema com lipossomas revestidos com quitosana apresentaram maior permeação de resveratrol em comparação aos demais grupos estudados.

CHOUDHARY; SHIVAKUMAR; OJHA, 2019 desenvolveram lipossomas contendo curcumina para liberação sustentada do fármaco. Utilizando o aparato da célula de Franz e membrana de diálise foi realizado o estudo de liberação *in vitro*, enquanto para o estudo *in vitro* de deposição do fármaco na pele foi utilizado pele de porco. Os estudos liberação foram realizados com a formulação otimizada e mostraram que após 24 horas a liberação cumulativa do fármaco foi de 70,12%. Já o estudo de penetração cutânea mostrou que após 24 horas, para o lipossoma, a porcentagem de acúmulo do fármaco de 30% no estrato córneo, 10% na epiderme viável, 2% na derme e 0,5% no compartimento receptor.

Finalmente, para o fármaco 5-FU, PETRILLI et al., 2017 desenvolveram imunolipossomas baseados em disteroilfosfatidilcolina, DSPC, e colesterol, funcionalizados com cetuximabe para direcionamento ao alvo EGFR de células para câncer de pele. Os resultados mostraram que o 5FU encapsulado em lipossoma e principalmente o imunolipossoma foi mais eficaz em diminuir a viabilidade celular em comparação com o fármaco em solução. Em outro estudo, PETRILLI et al., 2018b estudaram a penetração cutânea em pele de orelha de suíno de imunolipossomas contendo 5FU, lipossomas e imunolipossomas e após aplicar a iontoforese a penetração do fármaco aumentou consideravelmente, principalmente no grupo dos imunolipossomas. Foram também realizados estudos *in vivo* em camundongos com xenotransplante de câncer de pele, provando que houve melhor controle do crescimento tumoral para o imunolipossoma com aplicação de iontoforese, em comparação à injeção subcutânea.

Uma modificação de membrana nos lipossomas muito utilizada é a adição de promotores de penetração, o que classifica esses lipossomas como *ultradeformáveis* ou *elásticos*, sua matriz lipídica consiste na mistura entre fosfolipídios e ativadores de borda (do inglês, “edge activators”) (MONTANARI et al., 2007). Esses ativadores de borda, em sua maioria são da classe dos tensoativos, são moléculas anfifílicas compostas de uma cabeça polar e um cauda única apolar, possuindo uma morfologia na forma de cone e conseguem se agrupar na bicamada lipídica dos lipossomas e modificar sua flexibilidade e morfologia (CARITA et al., 2018). Alguns exemplos mais usuais dessas moléculas são colato de sódio (NaCo), Span 60, Span 65, Desoxicolato de Sódio, Tween 60, Span 80, Tween 20, glizirrinato dipotássico e etanol (ASCENSO et al., 2015).

Esse classe de lipossomas possui maior probabilidade de penetração nas camadas da pele por razões como a criação de um gradiente osmótico entre a cavidade interna e externa do estrato córneo, além disso os ativadores de borda tem a capacidade de desorganizar a matriz lipídica do estrato córneo e devido a sua maior flexibilidade, os lipossomas elásticos conseguem percorrer os espaços entre os corneócitos que compõem o estrato córneo (TOSATO et al., 2018).

O efeito promotor de penetração cutânea já foi demonstrada com sucesso previamente. Por exemplo, PLEGUEZUELOS-VILLA et al., 2018 desenvolveram vesículas lipossômicas ultradeformáveis para carrear narigina (NA) para verificar sua ação anti-inflamatória na pele. O estudo de penetração *in vitro* foi feito utilizando o aparato da célula de Franz com pele de porco e o estudo *in vivo* utilizou fêmeas de camundongo CD-1 com aplicação de forbol 1,2-miristato 1,3-acetato (TPA) para induzir a inflamação cutânea. No primeiro estudo foi possível observar uma taxa de acumulação de NA próxima de 10% na epiderme nas formulações utilizando lipossoma ultradeformável após 24 horas, no estudo *in vivo* o lipossoma ultradeformável se mostrou muito mais eficiente na redução do edema cutâneo em comparação com as demais amostras testadas.

BAHRAMIZADEH et al., 2019 desenvolveram formulações lipossomais deformáveis contendo ácido oleico a fim de encapsular metotrexato (MTX) para o tratamento da psoríase. A psoríase foi induzida na pele de camundongos BALC/c utilizando creme de Imiquimid 5%, a penetração e retenção do MTX nas formulações de lipossoma foram estudados utilizando o aparato de célula de Franz. No compartimento doador foram adicionados 200 ou 600 mg de lipossoma a 0,5% de MTX na pele saudável, enquanto que na pele com psoríase apenas 200 mg de lipossoma foram aplicados. Os resultados mostraram que após 24 h de aplicação de 200 mg na pele saudável não foi possível encontrar MTX no compartimento receptor, no entanto, quando aplicado a mesma quantidade na pele psoriática foi possível detectar, em torno de 50%, de MTX no compartimento receptor, um aumento estatisticamente significativo.

DAR et al., 2020 estudaram lipossomas ultradeformáveis compostos por Tween 80 ou colato de sódio contendo Anfotericina B-miltefosina (AmB-MTF) para o tratamento tópico da leishmaniose em camundongos BALB/c. O Tween 80 apresentou formulações claras e estáveis após uma semana de preparo armazenadas a uma temperatura de 37°C, desse modo, o Tween 80 foi escolhido como tensoativo para os demais experimentos. Os estudos *in vivo* mostraram que a quantidade de fármaco permeada por unidade de área na pele de AmB e MTF nos lipossomas foi de 327.64 ± 29.4 e $291.63 \pm 28.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente, isso demonstrou um aumento de permeação de AmB e MTF na ordem de 6,2 e 3,5 vezes, resultados muito mais promissores quando comparados com as demais formulações do estudo.

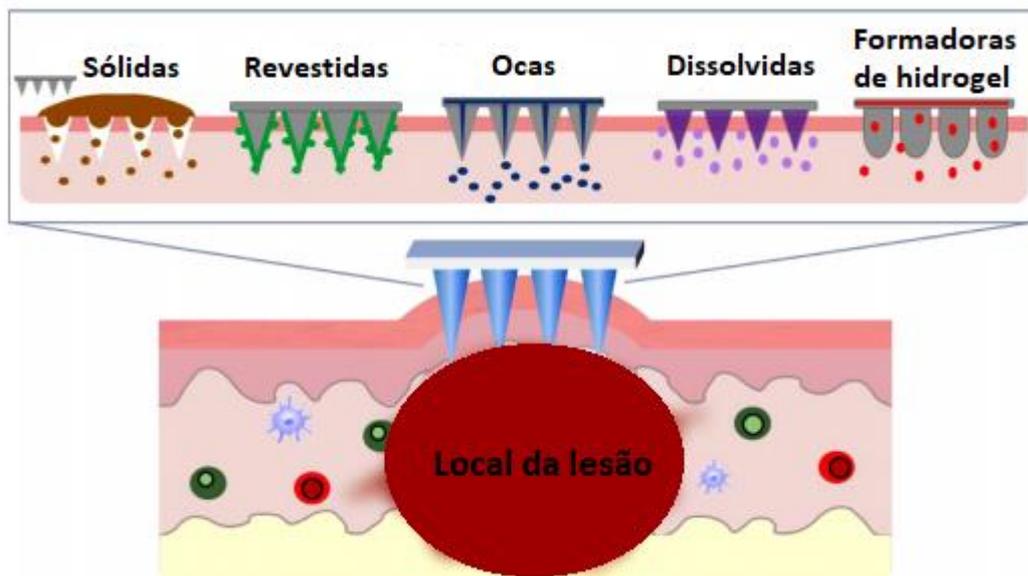
Finalmente, PAOLINO et al., 2008 desenvolveram *bola-surfactant niosomes* (termo em inglês), um tipo de lipossoma com modificações na vesícula contendo substâncias anfifílicas compostas por duas unidades de éter aza-coroa idênticas, ligadas a uma longa cadeia alquílica e representam uma nova classe de tensoativos não iônicos, que são capazes de se reunir em estruturas coloidais se associados ao colesterol, encapsulando 5FU para o tratamento do câncer de pele. Os resultados de citotoxicidade apresentados mostraram que em comparação com a solução de fármaco livre, o 5FU encapsulado foi pronunciadamente mais citotóxico na linhagem celular estudada.

No nosso presente trabalho contemplamos o desenvolvimento e caracterização físico-química de lipossomas contendo promotor de absorção, uma composição inovadora com o objetivo de melhorar a penetração nas camadas da pele, passivamente e aplicando métodos físicos, do fármaco 5-fluorouracil e avaliar seu potencial anticancerígeno na linhagem celular de SCC A431.

2.7 Métodos físicos para a entrega tópica de fármacos: microagulhas

As microagulhas (Figura 7) são estruturas pouco invasivas que possuem tamanho micrométrico que pode variar entre 25-900 μm de comprimento. Elas possuem capacidade de perfurar o estrato córneo e epiderme de modo a formar microporos por onde é possível que o fármaco penetre. As microagulhas têm tamanho suficiente para adentrar no estrato córneo, mas não tem capacidade para estimular as terminações nervosas, portanto, se trata de um método não doloroso (LI et al., 2020).

Figura 7. Esquema dos tipos de microagulhas adaptada de YANG et al., 2020



As microagulhas podem ser classificadas de acordo com alguns parâmetros como, modo de aplicação, material de composição, geometria da agulha, processo de fabricação. Podem ser

classificadas em cinco principais categorias: sólidos, revestidos, ocos, dissolventes e formadores de hidrogel (YANG et al., 2020).

Microagulhas sólidas podem ser fabricadas por diversos tipos de materiais, formatos e comprimentos de agulha. Podem ser cortadas diretamente de um material sólido utilizando corte a laser e corrosão mecânica/química ou a partir de um molde por fundição ou galvanoplastia. Os materiais utilizados para sua fabricação podem ser divididos principalmente em quatro grupos: metais, polímeros não-biodegradáveis, polímeros biodegradáveis e compostos solúveis em água (SABRI et al., 2020a).

As microagulhas revestidas são semelhantes as sólidas quando se trata do material da agulha e método de fabricação. Após finalizadas elas são revestidas com uma camada da solução formando uma fina película composta pela molécula terapêutica, esse revestimento pode ser feito por imersão em escala de micrometro ou tecnologia de impressão a jato de tinta. Quando esse tipo de agulha entra em contato com a pele, essa camada se desprende da agulha e dispersa o medicamento desejado (YANG et al., 2020).

As microagulhas ocas são a representação clássica das agulhas hipodérmicas convencionais quando essas foram reduzidas em tamanho e diâmetro. Pode ser utilizada uma única agulha ou um grupo de agulhas anexadas em uma placa, essa placa é ligada a um dispositivo que fornece energia externa capaz de injetar o fluxo de moléculas para a pele através dos orifícios formados. Permite o controle da dose injetada, a taxa de entrega e volume de solução administrados (SABRI et al., 2020a).

Já as microagulhas dissolventes são geralmente fabricadas com um polímero biodegradável onde o fármaco está encapsulado. Ao entrar em contato com a pele, o fármaco se desprende da agulha. Por ser um material biodegradável possui melhor adesão pelos pacientes ao tratamento, a liberação do fármaco pode variar de dias a horas, dependendo também da natureza da dissolução e do tipo de polímero utilizado (SHARMA et al., 2019). As microagulhas formadoras de hidrogel empregam um tipo de polímero capaz de absorver uma grande quantidade de água. Desse modo, ao entrar em contato com a pele os polímeros entumescem com a presença dos fluidos corporais e levam a formação de caminhos que permitem que a droga entre em contato com a microcirculação (SHARMA et al., 2019).

PERMANA et al., 2020 estudaram o sistema de liberação combinada de itraconazol (ITZ)-nanocristais (NCs) com microagulhas dissolventes para o tratamento da candidíase cutânea. O estudo dermatológico feito em pele de suíno mostrou que o ITZ-NCs com microagulhas obteve maior concentração na epiderme e derme quando comparado ao creme convencional e a adesivos sem agulha. A atividade antifúngica de ITZ-NCs com microagulhas em modelo *in vitro* de pele

íntegra de suíno mostrou que após 12 h de aplicação essa formulação foi capaz de reduzir a carga fúngica, e após 48 h toda carga fúngica foi eliminada.

SABRI et al., 2020b fabricaram microagulhas poliméricas para a entrega de imiquimod no tratamento do carcinoma basocelular. O estudo de penetração cutânea foi feito utilizando aparato da célula de Franz e pele de suíno. Os resultados demonstraram que a quantidade média do fármaco no estrato córneo foi maior com as microagulhas em comparação com o creme Aldara®. Foi observado que a quantidade de imiquimod no estrato córneo foi de 23,2 µg em pele tratada com microagulhas e de 8,6 µg para peles tratadas com creme Aldara™. Entretanto, ao analisar a pele remanescente, foi observado que a quantidade de fármaco extraído da pele tratada com microagulhas foi menor do que a quantidade de fármaco entregue com o creme Aldara™. Essa diferença não foi estatisticamente significativa, o que sugere que a quantidade de fármaco entregue por ambos sistemas de aplicação é semelhante, entretanto, o grande benefício do uso de microagulhas é fornecer uma aplicação simples e de única etapa de inserção na pele.

CAO et al., 2021 estudaram a aplicação de finasterida em nanopartículas lipídicas utilizando microagulhas como meio de melhorar a penetração cutânea do fármaco e aprimorar o tratamento da alopecia. Para os estudos de penetração cutânea *in vitro* foram utilizados pele de suíno e *in vivo* camundongos. Os resultados mostraram que houve maior retenção e permeação cutânea de finasterida quando utilizado nas microagulhas, em comparação com a nanopartícula e finasterida e a solução de finasterida, sendo os resultados de permeação foram de $5,10 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $3,50 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $2,57 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para microagulhas, nanopartícula + finasterida e solução de finasterida, respectivamente.

Na literatura podemos encontrar trabalhos que associam o tratamento cutâneo de 5-FU com a utilização de microagulhas, como pode ser observado em JHA; SONTALIA, 2019, que demonstram o uso do 5-FU como terapia adjuvante combinada às microagulhas no tratamento do vitiligo. A área a ser tratada foi previamente anestesiada, posteriormente ocorreu a aplicação das microagulhas e um adesivo oclusivo contendo 5% de creme de 5-FU tópico foi aplicado no local por 7 dias. O estudo concluiu que o tratamento combinado foi útil para repigmentar pequenas áreas de vitiligo. KUMAR; BHARTI; AGARWAL, 2019 estudaram a combinação de solução de 5-FU com microagulhas para o tratamento do vitiligo estável, após o tratamento da área com microagulhas, uma solução de 5-FU na concentração de 50 mg/mL foi borrifado no local, ao todo os pacientes realizaram 6 sessões. Em conclusão, ao usar o dermaroller e a solução tópica de 5-FU foi possível obter uma terapia rápida e reprodutível para o tratamento do vitiligo. Por fim, YANG et al., 2021 fabricaram microagulhas compostas por quitosana, dextrano, ácido hialurônico e hidroxipropilbeta-ciclodextrina para a liberação controlada de 5-FU e acetato de triancinolona no tratamento da

cicatriz hipertrófica. O estudo *in vivo* utilizando coelhos mostrou que quando os medicamentos foram injetados juntos, utilizando injeção intralesional, o tempo de ação foi curto e a eficácia terapêutica foi comprometida, em contrapartida, quando os fármacos foram aplicados com as microagulhas foi observado o prolongamento do tempo em que os fármacos coexistiram na cicatriz, melhorando a eficiência terapêutica.

Entretanto, não foram encontrados estudos que exemplificam a combinação entre lipossomas contendo promotor de penetração para encapsular 5-FU e a aplicação prévia de microagulhas como método físico visando a melhora da penetração e acúmulo do fármaco nas camadas da pele, trazendo assim o caráter de ineditismo do presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

Desenvolver, caracterizar e avaliar lipossomas convencionais e com promotores de penetração, comparando Tween 80, Span 60, Span 20 e ácido oleico, contendo 5-fluorouracil, associado ou não a microagulhas para liberação tópica no tratamento do câncer de pele.

3.2 Objetivos específicos:

- Encapsular 5-FU em lipossomas convencionais e com promotores de penetração e avaliar o efeito de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação;
- Investigar a morfologia dos sistemas desenvolvidos por microscopia de força atômica;
- Comparar a liberação de 5-FU a partir dos lipossomas com e sem Span 20;
- Avaliar a citotoxicidade em linhagem de câncer pele de solução de 5-FU e lipossomas, com e sem Span 20;
- Estudar o efeito de lipossomas com e sem Span 20 e a aplicação de microagulhas na penetração cutânea de 5-FU.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Acetato de amônio, Acetonitrila, Ácido acético, Ácido oleico, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT), 5-Fluorouracil, Colesterol, Dimetilsulfóxido (DMSO), DMEM de high glucose (Modificado por Dulbecco Eagle Médio, alta glicose) e Tripsina foram obtidos da Sigma-Aldrich. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) e 98% de fosfatidilcolina de soja (SPC) foram obtidos da Lipoid. O filtro PTFE (25 mm, 0,45 µm, Allcrom®) e o filtro PVDF (25 mm, 0,45 µm) foram obtidos da Allcrom®. Polissorbato 80 (Tween 80), sorbitano monolaurato (Span 20) e sorbitano monoestearato (Span 60) foram doações da Croda. A linha celular humana A431 SCC (ATCC® CRL1555™) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro

4.2 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados como descrito previamente em ELOY et al., 2016 através do método clássico de hidratação do filme lipídico. Na composição dos lipossomas primeiramente utilizamos DSPC e Colesterol na proporção de 55:45 e em outra etapa do trabalho SPC e Colesterol nas proporções de 55:45; 60:40 e 70:30. Os promotores de absorção estudados para o preparo dos lipossomas foram o Tween 80, Span 60, Span 20 e ácido oleico (AO) nas proporções de lipídio para tensoativo de 9:1. Os componentes foram pesados e dissolvidos em 2,5mL de clorofórmio em balão de fundo redondo, em seguida o balão foi colocado no rotaevaporador mediante as condições de 100 rpm, 65°C durante 30 minutos para total evaporação do solvente e formação de um filme lipídico, posteriormente a formulação foi submetida a hidratação com 5 mL de PBS (pH 7,4). Uma solução na concentração de 1,3 mg/mL de 5-fluorouracil (5-FU) foi preparada, a qual utilizamos uma alíquota de 1 ml para a hidratação do filme lipídico, sendo adicionada ao PBS mediante as condições de 100 rpm, 65°C durante 1 hora, ao final resultando em concentração de 260 µg/mL de 5FU no lipossoma. Em seguida a formulação foi submetida à sonicação em ultrassom de ponta (QSonica Sonicators Q500) mediante condições de 20% de amplitude, ausência de pulso e duração de 5 min. Os lipossomas foram identificados devidamente de acordo à sua composição.

Tabela 2. Identificação dos lipossomas desenvolvidos

Formulações	Identificação
DSPC:Col	Lipossoma convencional
DSPC:Col:Tween 80	Lipossoma com Tween 80 como promotor de penetração
DSPC:Col:Tween 80:5-FU	Lipossoma com Tween 80 como promotor de penetração contendo 5-FU
SPC:Col	Lipossoma branco convencional após substituição de DSPC por SPC
SPC:Col:5-FU	Lipossoma convencional com SPC e 5-FU
SPC:Col:Tween 80:5-FU	Lipossoma com SPC e Tween 80 como promotor de penetração contendo 5-FU
SPC:Col:Span 20:5-FU	Lipossoma com SPC e Span 20 como promotor de penetração contendo 5-FU
SPC:Col:Span 60:5-FU	Lipossoma com SPC e Span 60 como promotor de penetração contendo 5-FU
SPC:Col:AO:5-FU	Lipossoma com SPC e Ácido Oleico como promotor de penetração contendo 5-FU

4.3 Análise de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Para análise do tamanho de partícula e índice de polidispersividade foi retirada uma alíquota de 100 μ L e diluída em 900 μ L de Água MilliQ. As amostras foram analisadas pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). O potencial zeta foi avaliado pela técnica de microeletroforese de gotas dispersas em campo elétrico utilizando o mesmo equipamento e cubeta específica para a análise.

4.4 Eficiência de encapsulação de 5-FU

O fármaco 5-FU foi quantificado como descrito por PETRILLI et al., 2018b por espectrofotometria empregando o comprimento de onda 265 nm. Para isso uma curva de calibração foi preparada nas concentrações do fármaco de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 5,0 μ g/mL, diluídas a partir de uma solução de 5FU na concentração de 1,3 mg/mL, em tampão PBS pH 7,4. A linearidade foi avaliada a partir da equação da reta e coeficiente de correlação linear.

A eficiência de encapsulação foi calculada pelo método indireto pela técnica de ultrafiltração por meio da quantificação do fármaco total e fármaco livre. Para a quantificação do fármaco total

uma alíquota de 25µL das amostras foi coletada e adicionada a 25µL de DMSO em tubo falcon e agitada em vórtex por 2 min, posteriormente essas mesmas amostras foram submetidas a banho ultrassônico por 10 min. Após esse tempo, o volume foi completado para 5 ml com Água MilliQ e a amostra foi filtrada em PVDF com poro de 0,45µm.

Para quantificar o fármaco livre/purificado uma alíquota de 1000µL das amostras foi adicionada em tubo Amicon® com filtro de 50 kDa e foram centrifugadas a 3000 rcf/g por 15 min. Posteriormente, uma alíquota de 50µL foi coletada da alíquota centrifugada, transferida para tubo falcon e o volume foi completado para 5 mL com Água MilliQ, em seguida a amostra foi filtrada em filtro PVDF com poro de 0,45µm.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 265 nm, e o cálculo da eficiência de encapsulação (EE%) seguiu a Equação EE% 1:

$$EE\% = \frac{C5-FU\ TOTAL - C5-FU\ LIVRE}{C5-FU\ TOTAL} \times 100, \text{ equação 1}$$

Onde:

C 5-FU Total representa a concentração total de 5-FU empregado no preparo dos lipossomas e C 5-FU Livre representa a concentração do fármaco livre.

4.5 Estudo das amostras por Microscopia de Força Atômica (MFA)

As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:10, em água deionizada e homogeneizadas. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra e depositada em uma superfície de mica, em seguida foi deixada por 15 minutos em uma estufa a uma temperatura de 36 °C, para a secagem e realização da análise.

O equipamento utilizado para a análise foi o TT-AFM (AFM Workshop - EUA) no modo contato intermitente, utilizando as pontas de Silício da TED PELLA (TAP300-G10) em uma frequência de amplitude aproximadamente 237 kHz. O programa Gwyddion 2.45, foi utilizado para tratar as imagens e obter o tamanho (nanômetros) das nanopartículas. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism 6.

4.6 Liberação *in vitro*

Para o ensaio de liberação do fármaco 5-fluorouracil utilizamos o aparato da célula de Franz. Para tanto, o aparato foi montado e a membrana de diálise com porosidade de 12000-14000 Da foi posicionada entre o compartimento doador e receptor de célula de difusão de Franz. As amostras foram colocadas no compartimento doador, as células foram posicionadas em agitador orbital a

temperatura de 32°C e, em tempos determinados de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h, as amostras foram coletadas através do compartimento receptor, com reposição do meio tampão fostato (PBS pH 7,4). A porcentagem do fármaco que foi liberada quantificado por espectrofotometria, com leitura em 265 nm, o resultado foi representado em forma de gráfico onde o eixo Y representa a porcentagem de 5FU liberada (%) e eixo X o tempo (h) do experimento.

4.7 Citotoxicidade

Para esse ensaio seguimos o método empregado por PETRILLI et al., 2018b. Para tanto utilizamos as células A431 de carcinoma escamoso de pele, oriundas do banco de células do Rio de Janeiro, cultivadas em garrafas em meio DMEM high glucose, incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂. Primeiramente as células foram tripsinizadas e seguimos com o plaqueamento utilizando microplaca de 96 poços, de modo que em cada poço da microplaca contivesse um total de 10.000 células. Essas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂.

Posteriormente foi retirado todo o meio dos poços da microplaca com o auxílio de uma pipeta multicanal e aplicadas as soluções (150 µL por poço) de forma a obter uma curva com série de concentrações (1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 µM), seja de fármaco livre ou encapsulado, e como controle negativo foi empregado DMEM incompleto. As placas foram incubadas por 72h a 37°C na presença de 5% CO₂

Após 72 h de incubação foi retirado todo o conteúdo da microplaca, foi lavado com salina e descartado em seguida. Ao abrigo da luz, foi preparada uma solução de 250 µg/mL de MTT e foi adicionada a microplaca 150 µL em cada poço com o auxílio de uma pipeta multicanal, e então as placas foram incubadas por 4 horas. Após esse tempo, todo o conteúdo da microplaca foi descartado e 200 µL de DMSO foram pipetados em cada poço utilizando uma pipeta multicanal. As microplacas foram homogeneizadas em agitador de microplaca por 15 min e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm.

A partir das leituras foram geradas curvas de viabilidade celular, em porcentagem de células viáveis versus concentração 5-FU que foram usadas para o cálculo do IC₅₀, considerando sempre os poços das microplacas sem tratamento, usados como controle, com 100% de viabilidade celular.

4.8 Quantificação do 5-FU em pele de orelha de suíno por cromatografia líquida de alta eficiência

Com a finalidade de desenvolver um método bioanalítico para quantificar o 5-FU seguimos o método usado por PETRILLI et al., 2018b, com modificações. Para cada ponto da curva de calibração matrizada foi empregada um pedaço de pele de orelha de porco, com área de 0,95 cm².

A solução mãe na concentração de 125 µg/mL foi preparada e a partir dela foram preparados os 6 pontos da curva em triplicata nas concentrações de 0,3; 0,5; 1; 2; 4 e 6 µg/mL. Para isso, cada tubo falcon foi contaminado com uma concentração conhecida de 5-FU, e após secagem da solução de 5-FU na pele o mesmo foi extraído utilizando metanol. Nesse processo, as amostras foram submetidas a agitação por vórtex e posteriormente foram colocadas em ultraturrax por 2 min a 4000 rpm. As amostras foram filtradas com filtro PTFE 0,45 µm. Para a quantificação das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, da sigla em inglês) seguimos o método empregado por Amasya et al. 2018. Foi utilizada a coluna ZicHilic5µm 200Å 150x4,6 mm (Merck SA). A técnica HILIC pode ser definida como um método de separação que combina fases estacionárias normalmente usadas em fase normal e fases móveis usadas em separações de fase reversa, está sendo utilizada para a análise de compostos hidrofílicos, uma alternativa interessante para a análise de substâncias polares (AMASYA et al., 2018).

A fase móvel sob fluxo de 0,750 mL/min foi composta por acetonitrila e acetato de amônio 5 mM em proporção de 95:5, para ajuste do valor de pH para 6,8 empregando ácido acético. O volume de injeção de 50 µL foi empregado.

O cálculo da recuperação foi feito utilizando-se a área do 5-FU extraída da pele em relação à área do 5-FU no metanol. Os resultados foram apresentados em porcentagem de recuperação.

4.9 Quantificação do 5-FU nas camadas da pele e no compartimento receptor

A pele de orelha de suíno integra foi preparada retirando primeiramente o tecido subcutâneo com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Uma área de aproximadamente 0,95 cm² foi cortada e montada no aparato da célula de Franz (Figura 8) (n=5) com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e epiderme viável e derme voltadas para o compartimento receptor. Ambos os compartimentos, doador e receptor, foram preenchidos com PBS pH 7,4. Para que fosse possível determinar a resistividade da pele, os eletrodos foram inseridos no compartimento doador e receptor da Célula de Franz devidamente montada com a pele. O eletrodo presente no receptor foi ligado a um equipamento gerador de sinal e uma corrente alternada foi aplicada, a intensidade da corrente elétrica capaz de atravessar a pele foi então medida usando o eletrodo inserido no compartimento doador ligado a um multímetro. A resistência da pele foi calculada utilizando a Lei de Ohm (Figura 9) (TANG et al., 2001). As amostras (solução de 5-FU livre, lipossoma convencional e lipossoma com promotor de absorção, ambos carregados com 5-FU, todas as amostras contem concentração de fármaco de 780 µg/mL) foram adicionados ao compartimento doador (200 µL), o compartimento receptor foi preenchido com volume de 15 mL de PBS. As células de Franz devidamente montadas foram deixadas sob agitação magnética a 100 rpm por 24 horas a 32°C.

Figura 8. Aparato da Célula de Franz montado para o experimento de avaliação da penetração cutânea de 5-FU

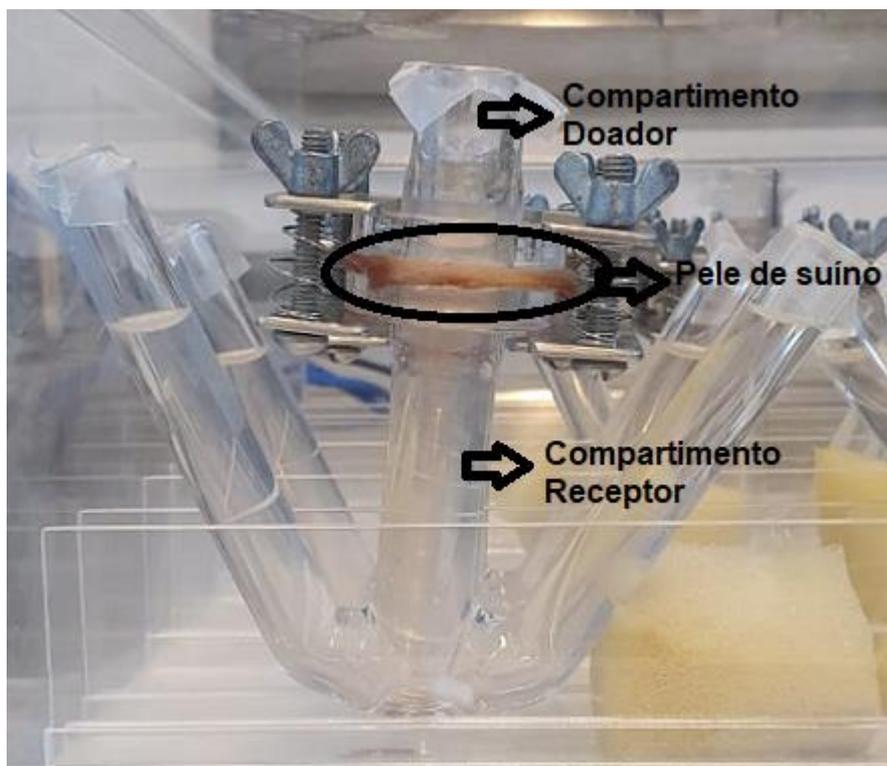
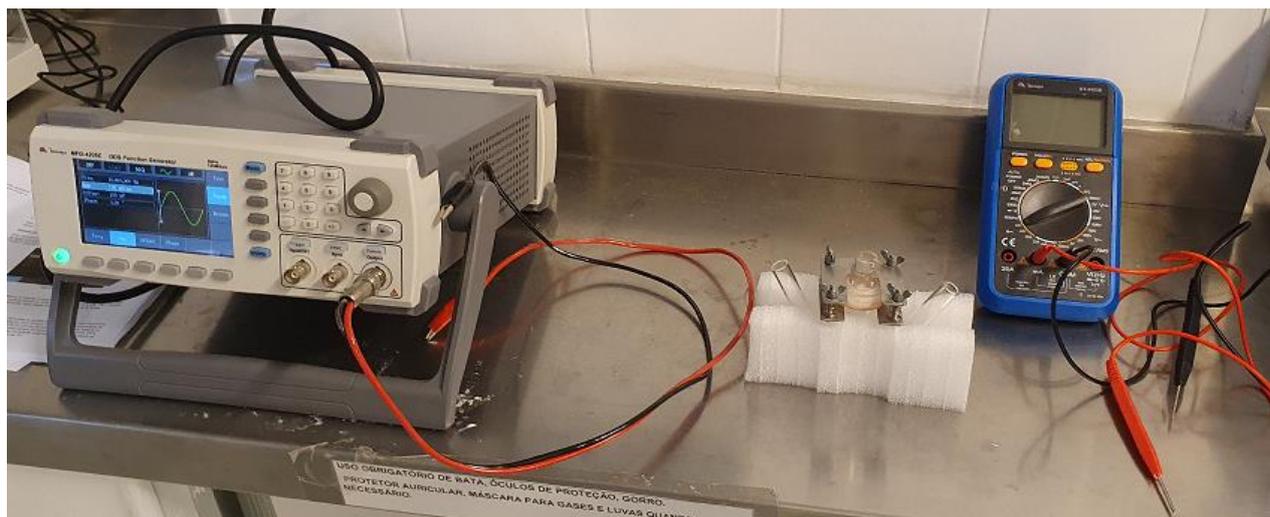


Figura 9. Aparato utilizado para medir a resistividade da pele de suíno



Ao final do experimento, as peles foram retiradas das células e lavadas rapidamente com água destilada, secas com auxílio de papel toalha e submetidas ao *tape stripping* utilizando fita Scott 3M. Para tanto, 15 pedaços de fita adesivas foram coladas ao estrato córneo e retiradas em seguida, descartamos sempre a primeira fita e as demais são adicionadas a tubo falcon contendo 5 mL de metanol, a pele remanescente (epiderme viável e derme) foram cortadas em pequenos pedaços que foram posteriormente colocados em tubo falcon com 5 mL de metanol. O compartimento receptor também foi coletado com o auxílio de uma cânula, as soluções foram filtradas e armazenados em tubo falcon.

Para quantificação do 5-FU todas as amostras foram agitadas em vórtex por 2 min, e as amostras de epiderme viável e derme foram submetidas à extração em ultraturrax por 2 min a 4000 rpm. Todas as amostras foram centrifugadas e filtradas em filtro PTFE 0,45 μm e armazenadas no congelador em frascos previamente higienizados. Todas as amostras foram quantificadas como descritas no tópico 4.8 (PETRILLI et al., 2018b).

4.10 Pré-tratamento da pele com microagulhas

A pele íntegra foi preparada retirando o tecido subcutâneo com o auxílio de uma tesoura, posteriormente a pele foi fixada com o auxílio de alfinetes em uma superfície de isopor. Utilizando o Dermalroller® (Smart Derma Roller, SKDR 540 0,20 mm), deslizamos o mesmo sob a superfície da pele por três vezes em quatro direções horizontais (BADRAN; KUNTSCHE; FAHR, 2009). As etapas de corte da pele, montagem da Célula de Franz, verificação da resistividade da pele, quantificação do 5-FU na pele seguiram conforme descrito no Tópico 4.9.

4.11 Análise Estatística

Os resultados *in vitro* de citotoxicidade e penetração cutânea foram analisados utilizando o GraphPad Prism 5 por one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$ foi considerado o valor mínimo de significância).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos lipossomas convencionais e com promotor de absorção por tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação

Para verificarmos os parâmetros ideais de desenvolvimento das vesículas lipossômicas contendo DSPC e colesterol, iniciamos nossos testes desenvolvendo os lipossomas brancos, ou seja, sem o fármaco e sem os promotores de absorção. A Tabela 3 exemplifica os resultados e as mudanças nos parâmetros que foram feitas ao longo dos resultados, a saber: volume de hidratação e condições de sonicação, de forma a padronizar o preparo dos lipossomas.

Tabela 3. Caracterização físico-química dos lipossomas brancos compostos por DSPC e colesterol (55:45), empregando diferentes condições de hidratação e sonicação.

					Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Parâmetros								
Volume de hidratação (mL)	Tempo (min)	Pulso (on/off)	Amplitude (%)					
5	2			DSPC:Col 01	822,7 ± 4,73	1 ± 0	- 4,08 ± 0,097	
	4			DSPC:Col 02	445,3 ± 33,75	0,953 ± 0,028	- 3,52 ± 0,144	
	6	5/2	40	DSPC:Col 03	450,8 ± 28,24	0,936 ± 0,017	- 3,59 ± 0,14	
	8			DSPC:Col 04	272,4 ± 14,15	0,746 ± 0,031	- 8,3 ± 0,428	
	10			DSPC:Col 05	272,4 ± 12,97	0,678 ± 0,027	- 5,44 ± 0,055	
	12			DSPC:Col 06	227,6 ± 2,64	0,764 ± 0,012	- 5,43 ± 0,2755	
10	2			DSPC:Col 07	635,5 ± 116	1 ± 0,059	- 6,35 ± 0,389	
	4			DSPC:Col 08	562, ± 73,82	1 ± 0,035	- 4,95 ± 0,233	
	6	5/2	40	DSPC:Col 09	320,02 ± 48,22	0,855 ± 0,059	- 4,24 ± 0,22	
	8			DSPC:Col 10	329 ± 15,55	0,840 ± 0,024	- 4,19 ± 0,171	
	10			DSPC:Col 11	262,9 ± 12,35	0,880 ± 0,076	- 4,17 ± 0,131	
	12			DSPC:Col 12	243,5 ± 25,53	0,716 ± 0,068	- 4,45 ± 0,175	

Ao final da etapa de hidratação do filme lipídico tem-se a formação dos lipossomas, no entanto, essa etapa tende a formar vesículas multilamelares de tamanho grande, assim algumas técnicas são aplicadas para a redução do tamanho e formação de vesículas unilamelares (CARITA et al., 2018). No presente trabalho utilizamos a técnica de aplicação do ultrassom de ponta, onde ondas ultrassônicas formam bolhas de cavitação que se dissipam na solução de lipossomas quebrando as vesículas multilamelares, dando origem a vesículas unilamelares com tamanho reduzido. Para aplicação de ultrassom, parâmetros como amplitude, tempo e frequência são relevantes para o sucesso da técnica (PEREIRA; RAMOS; LOPEZ, 2017). Como pode ser observado na Tabela 3, para as amostras o parâmetro tempo variou entre 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min. Com o aumento do tempo de sonicação pode ser observado que o tamanho das vesículas diminuiu, como pode ser observado para as amostras DSPC:Col 01, 03 e 06 (todas com volume de hidratação de 5 mL) que apresentaram tamanho de partícula de $822,7 \pm 4,73$, $450,8 \pm 28,24$ e $227,6 \pm 2,64$ nm, respectivamente, e com entre as amostras DSPC:Col 07, 09 e 12 (todas com volume de hidratação de 10 mL), apresentando tamanho de partícula de $635,5 \pm 116,32$, $320,02 \pm 48,22$ e $243,5 \pm 25,53$ nm, respectivamente.

O potencial zeta é um dos parâmetro que reflete a estabilidade coloidal das nanopartículas, representando a medida da carga superficial da nanopartícula, desse modo representa o nível de repulsão eletrostática que é significativo para evitar a agregação entre as nanopartículas, refletindo na estabilidade da dispersão durante o tempo (AL-MAGHRABI et al., 2020). Idealmente espera-se que uma nanodispersão estável eletrostaticamente possua valores de potencial zeta próximos de 30 mV, em módulo (COVIELLO et al., 2015). A composição do lipossoma está diretamente relacionado com essa medida. Na Tabela 3 podemos observar que o valor do potencial Zeta não teve variação significativa pois se trata da análise das formulações compostas pelos mesmos componentes, Colesterol e DSPC.

Na literatura podemos encontrar estudos que utilizando a mesma composição para a formulação de lipossomas, como no trabalho de BRIUGLIA et al., 2015 que desenvolveram lipossomas utilizando o método de hidratação do filme lipídico, compostos por colesterol e DSPC em diferentes proporções. Os tamanhos de partículas foram $362,7 \pm 5,6$ nm para a proporção de 50:50 DSPC:Colesterol, na proporção 80:20 (DSPC:Col) o tamanho ficou em $360,6 \pm 6,7$ nm. A investigação do valor de potencial zeta mostrou que quando as nanopartículas foram preparadas apenas com DSPC os valores ficaram próximos de zero e passam para valores ligeiramente negativos quando a quantidade de colesterol é aumentada, respectivamente, DSPC, $0,79 \pm 0,11$ mV, DSPC:Col (70:30) $-0,71 \pm 0,18$ mV. SMITH et al., 2017 desenvolveram lipossomas, contendo

DSPC, colesterol e lipídio pequilado (LP) em diferentes proporções. Os resultados de potencial zeta para as proporções 55:44.8:0.2, 55:43:2, 55:42:3, 55:35:10 (DSPC:Col:LP) foram de -9 ± 1 , -10 ± 1 , -9 ± 1 e -11 ± 1 mV, respectivamente.

O Índice de Polidispersão (PDI) é um parâmetro que reflete a distribuição de tamanho da dispersão das nanopartículas, PDI com valores próximos de 1 demonstram uma grande heterogeneidade na distribuição de tamanho, o que pode acarretar agregação entre as moléculas e interferir na estabilidade da dispersão (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016). Idealmente busca-se valores abaixo de 0,3, pois demonstram a existência de uma população única e homogênea na dispersão das nanopartículas (COVIELLO et al., 2015). Como pode ser observado na Tabela 3, o PDI dos lipossomas ficou em valores próximos de 1, indicando que temos distribuições de lipossomas com tamanhos distintos, com distribuição muito heterogênea. Todavia, notou-se que com o aumento do tempo de sonicação, os valores de PDI diminuíram, como pode ser observado entre as amostras DSPC:Col 01 e 05 (ambas com hidratação do filme lipídico de 5 mL), apresentando valores de PDI equivalentes a 1 ± 0 e $0,678 \pm 0,027$, respectivamente, e entre DSPC:Col 07 e 12 (ambas com hidratação do filme lipídico de 10 mL), com valores de $1 \pm 0,059$ e $0,716 \pm 0,068$, respectivamente.

Diante do exposto podemos observar que a formulação DSPC:Col 05 foi a que obteve as condições que resultaram nos melhores resultados (volume hidratação: 5mL; Tempo: 10min; Pulso: 5/2; Amplitude: 40%) onde conseguimos estabelecer parâmetros para dar continuidade ao estudo com o tensoativo Tween 80, com potencial efeito de promotor de penetração cutânea, trabalhando em três proporções lipídeo:Tween 80, sendo elas 9:1, 8:2 e 7:3. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização físico-química dos lipossomas branco compostos por DSPC e colesterol com Tween 80 como promotor de absorção

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
DSPC:Col:Tween 80 (5.5:4.5:1)	$155,9 \pm 0,6$	$0,354 \pm 0,003$	$- 5 \pm 0,126$
DSPC:Col:Tween 80 (5.5:4.5:2)	$126,1 \pm 0,822$	$0,275 \pm 0,018$	$- 5,95 \pm 0,057$
DSPC:Col:Tween 80 (5.5:4.5:3)	$151,7 \pm 1,955$	$0,606 \pm 0,021$	$- 6,6 \pm 0,211$

De acordo com os resultados exemplificados na Tabela 4 podemos observar que obtivemos uma melhora significativa nos parâmetros físico-químicos de tamanho de partícula e PDI ao

adicionar na formulação o tensoativo Tween 80, nas proporções 9:1 e 8:2 (lipídeo:Tween 80), quando comparamos aos resultados do lipossoma convencional (Tabela 3). O resultado correspondeu ao esperado, pois o uso de tensoativo melhora a hidratação da bicamada lipídica e sua estrutura morfológica. As mudanças na carga superficial visualizadas após a adição de Tween 80 não foram significativas, visto que se trata de um tensoativo não-iônico. ALOMRANI et al., 2014 desenvolveram lipossomas utilizando o método clássico de hidratação do filme lipídico, com diferentes componentes e utilizando Tween 80, os resultados de caracterização físico química de tamanho, PDI e potencial zeta para as formulações contendo PC:Coolesterol e PC:Tween 80:Coolesterol, foram, respectivamente, 234 ± 9 nm, 0.26 ± 0.03 , -2.3 ± 0.6 mV e 146 ± 19 nm, 0.23 ± 0.06 , -7.5 ± 1.4 mV. Os resultados foram muito semelhantes aos encontrados no presente estudo, já que também houve uma diminuição de tamanho das nanopartículas mostrando que a presença do tensoativo foi capaz de reduzir a tensão superficial, resultando em um melhor rearranjo dos fosfolipídeos na bicamada.

Desse modo estabelecemos duas proporções otimizadas de Tween 80, 9:1 e 8:2, total de lipídeos em relação ao tensoativo, para que pudéssemos encapsular o fármaco 5-fluorouracil (5FU).

Tabela 5. Caracterização físico-química dos lipossomas compostos por DSPC, coolesterol, Tween 80 e 5-FU

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
DSPC:Col:Tween 80:5-FU (5.5:4.5:1)	$139,3 \pm 0,644$	$0,324 \pm 0,011$	$- 3,35 \pm 0,086$	<LQ
DSPC:Col:Tween 80:5-FU (5.5:4.5:2)	$128,9 \pm 0,733$	$0,322 \pm 0,008$	$- 4,57 \pm 0,137$	<LQ

#LQ: limite de quantificação

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 podemos perceber que houve uma redução e um pequeno aumento de tamanho dos lipossomas com tensoativo nas proporções 5.5:4.5:1 e 5.5:4.5:2, respectivamente, ao adicionar o 5-FU. Os valores de PDI não sofreram um aumento não-significativo. Em conclusão, a proporção 5.5:4.5:2 se mostrou com os melhores resultados de tamanho de partícula e PDI para o lipossoma com promotor de absorção. Por outro lado, os valores de eficiência de encapsulação na presença do promotor de absorção ficaram abaixo do limite de quantificação.

Muitos fosfolipídios podem ser utilizados no desenvolvimento de lipossomas, por exemplo DSPC e coolesterol, empregados nessa etapa. Os fosfolipídeos possuem uma temperatura de transição de fase, T_m , que influencia diretamente em alguns parâmetros do lipossoma, dentre eles está sua fluidez. Fosfolipídios com temperatura de transição de fase mais baixa possuem uma melhor fluidez

a temperatura ambiente, como é o caso do DSPC (fosfatidilcolina de soja, sigla do inglês) (ELOY et al., 2014). Diante disso, fizemos a alteração na composição de DSPC para SPC, pois consideramos esse último uma escolha mais adequada para o desenvolvimento de lipossomas com promotor de absorção.

A escolha do SPC como componente de lipossomas com maior flexibilidade de membrana pode ser exemplificada no trabalho de LEE et al., 2020 que trabalharam com lipossomas ultradeformáveis para o tratamento tópico de inflamação cutânea encapsulando monóxido de carbono. O efeito anti-inflamatório foi expressivamente melhor observado após o tratamento com os lipossomas, em comparação com as demais formulações analisadas. MONTANARI et al., 2010 estudaram o uso de terapia fotodinâmica utilizando lipossomas ultradeformáveis contendo SPC e Zn fitalocianina no tratamento de *Leishmania braziliensis*, concluindo que o tratamento com lipossomas ultradeformáveis se mostrou 100% eficaz na atividade anti-promastigota e uma maior internalização celular em comparação com demais formulações.

Tabela 6. Caracterização físico-química de lipossomas compostos por SPC, colesterol e 5-FU

Amostras	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
SPC:Col (55:45)	106,7 ± 2,177	0,335 ± 0,038	- 8,96 ± 0,448	-
SPC:Col(55:45):5-FU	131 ± 2,488	0,476 ± 0,011	- 5,2 ± 0,137	61,57 ± 0,675
SPC:Col (60:40)	144 ± 8,37	0,456 ± 0,053	- 5,58 ± 1,23	-
SPC:Col(60:40):5-FU	148,7 ± 3,4	0,569 ± 0,025	- 5,2 ± 0,431	59,07 ± 0,54
SPC:Col (70:30)	124,6 ±	0,536 ± 0,034	- 6,21 ± 0,106	-
SPC:Col(70:30):5-FU	97,2 ± 1,25	0,52 ± 0,047	- 5,72 ± 0,935	61,73 ± 0,65

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 6 podemos observar que após a substituição de DSPC por SPC a eficiência de encapsulação pôde ser quantificada, sendo encontrados valores de 61.57 ± 0,675, 59.07 ± 0,54 e 61.73 ± 0,65 % para as proporções de 55:45, 60:40 e 70:30 (SPC:Colesterol), respectivamente. Os valores de eficiência de encapsulação foram considerados elevados, considerando o desafio de encapsular uma molécula tão pequena e caráter hidrofílico como é o 5-FU, mostrando o papel fundamental do lipídeo SPC em comparação ao lipídeo DSPC para a encapsulação de 5-FU. As mudanças nas proporções de lipídeos não trouxeram

alterações significativas para o parâmetro de eficiência de encapsulação, já os valores de PDI para a proporção de 55:45 foi o mais aceitável pois fica próximo ao valor ideal para uma dispersão com homogeneidade de tamanho. Os valores de potencial zeta também não sofreram alterações significativas entre as amostras, ficando todas em valores negativos. Analisando os resultados apresentados a proporção de 55:45, SPC:Coolesterol, foi a escolhida para das continuidade aos experimentos.

Alguns parâmetros influenciam na encapsulação de fármacos hidrofílicos. Nesse sentido, a bicamada lipídica possui diferentes graus de fluidez a temperatura ambiente, isso está relacionado a composição de fosfolipídeos e suas temperaturas de transição de fase (T_m). Uma bicamada composta por um único fosfolipídeo se encontra na fase de gel, com baixa T_m , o que configura uma bicamada mais rígida, não sendo favorável a encapsulação de fármacos, principalmente de caráter hidrofílico. Desse modo, idealmente, ocorre uma combinação com dois ou mais fosfolipídeos para compor a bicamada, de modo que a T_m se encontre na fase cristalina, o que configura uma bicamada mais fluida e mais susceptível a encapsulação de fármacos hidrofílicos (CARITA et al., 2018). A escolha do colesterol se baseia no fato de que ele possui a propriedade de regular a fluidez da membrana e melhorar a estabilidade do lipossoma. As cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídeos tem sua liberdade de rotação diminuída pelo colesterol, fato que estabiliza a bicamada lipídica e diminui a permeabilidade passiva da água e moléculas hidrofílicas através da membrana, favorecendo a encapsulação de fármacos hidrofílicos (CARITA et al., 2018; ELOY et al., 2014). Como pode ser observado no trabalho de Guinedi et al. 2005 que desenvolveram niossomas pelo método de evaporação em fase reversa, contendo span 40, span 60 e colesterol em diferentes proporções (7:4, 7:6 e 7:7), para encapsular acetazolamida. Os resultados de eficiência de encapsulação mostraram que a incorporação de colesterol na composição da bicamada lipídica aumentou a eficiência de encapsulação do fármaco nas proporções de 7:4 e 7:6. Ao observar a proporção 7:7 a eficiência de encapsulação diminuiu, mostrando que existe um limite ótimo a ser utilizado de colesterol nas formulações.

Conforme evidenciado na Tabela 7, além de Tween 80, testamos outros promotores de absorção, como Ácido oleico, Span 60 e Span 20. Neste sentido, trabalhos prévios utilizaram promotores de absorção para obter melhores resultados de penetração cutânea, como Maheshwari et al. 2012 que desenvolveram lipossomas ultradeformáveis utilizando Span 80 e etosomos para veiculação de clotrimazol via transdérmica. Os etosomos foram mais promissores em comparação com o lipossoma ultradeformável, mas o uso de Span 80 como promotor de absorção também obteve resultados satisfatórios. ALMEIDA et al., 2018 desenvolveram nanopartículas lipídicas contendo ftalocianina de cloroalumínio e incorporaram ácido oleico (AO) na sua matriz lipídica a fim de

estudar melhora na penetração, efeito antitumoral e efeito fotossensibilizante. Os resultados mostraram que o uso AO aumentou a retenção do fármaco na epiderme viável + derme e potencializou o efeito tumoral. FANG et al., 2001 desenvolveu lipossomas e utilizou Span60 e 40 para desenvolver niosomos para veicular inoxacina. Os resultados mostraram melhora da permeação transdérmica e partição nas camadas da pele quando o fármaco foi encapsulado nos niosomos em comparação com as demais formulações de lipossoma convencional e fármaco livre.

Tabela 7. Caracterização físico-química de lipossomas compostos por SPC, colesterol, 5-FU, Tween80, Ácido Oleico (AO), Span 60 e Span 20, na proporção, lipídeos:promotor, de 9:1

Amostras	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
SPC:Col:Tween 80	87,41 ± 0,52	0,254 ± 0,007	- 1,53 ± 0,24	-
SPC:Col:Tween 80:5-FU	82,06 ± 0,322	0,251 ± 0,008	- 4,95 ± 0,08	16,01 ± 0,785
SPC:Col:AO	93,29 ± 0,76	0,254 ± 0,021	- 9,61 ± 0,341	-
SPC:Col:AO:5-FU	79,53 ± 0,695	0,257 ± 0,009	- 20,3 ± 0,8	13,45 ± 2,695
SPC:Col:Span 60	108,05 ± 1,48	0,881 ± 0,014	- 17,1 ± 1,69	-
SPC:Col:Span 60:5-FU	184,4 ± 15,88	0,322 ± 0,044	- 14,7 ± 0,244	22,68 ± 1,15
SPC:Col:Span 20	107,7 ± 2,57	0,321 ± 0,006	-14,1 ± 0,66	-
SPC:Col:Span 20:5-FU	122,8 ± 0,555	0,169 ± 0,039	- 8,75 ± 0,80	38,65 ± 6,35

De acordo com os resultados observados na Tabela 7 podemos verificar que os parâmetros de tamanho e PDI foram excelentes para todas as amostras analisadas, visto que os valores ficaram entre 79,53 – 122,8 nm e <0,4, respectivamente. Podemos observar que o potencial zeta com o valor mais negativo veio com a adição de ácido oleico a formulação, um resultado já esperado visto a sua carga superficial negativa. A eficiência de encapsulação teve valores bastantes diversificados conforme o promotor de absorção de escolha nas formulações, variando de 16,01 ± 0,785 a 38,65 ± 6,35%. O comprimento da cadeia de hidrocarbonetos dos constituintes da bicamada lipídica estão também relacionados com a eficiência de encapsulação, principalmente de moléculas que tenham caráter hidrofílico, dessa forma, valores elevados de encapsulação foram observados quando empregaram constituintes com cadeias menores (ELOY et al., 2014; LÓPEZ et al., 2000). Como pode ser observado na Tabela 7, as composições de bicamada lipídica variam com os promotores de absorção escolhidos, fica evidente que o melhor resultado na porcentagem de encapsulação foi obtido com o Span 20 na composição dos lipossomas, esse composto contém uma cadeia C12, em

comparação ao Span 60 possui uma cadeia C18, de elevada lipofilicidade. Assim, o Span 20, mais hidrofílico favoreceu a encapsulação de 5-FU.

Nesse contexto, o Span 20, na proporção 9:1, foi o tensoativo escolhido para as etapas subsequentes do presente trabalho, pois diante dos resultados apresentados na Tabela 7 foi o qual trouxe os resultados mais promissores, principalmente de tamanho de partícula e PDI, correspondendo a $122,8 \pm 0,555$ nm e 0,169, respectivamente. Podemos observar que os valores de eficiência de encapsulação ficaram muito baixos, para todas as amostras estudadas, desse modo buscamos investigar o efeito do aumento da potência da sonicação (de 125W para 500W) no aumento do encapsulação do 5-FU.

Tabela 8. Caracterização físico-química do lipossoma convencional e com promotor de absorção, compostos por SPC, colesterol, Span20 e 5-FU. Os lipossomas foram preparados em ultrassom de ponta com potência de 500W.

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
Ultrassom de ponta 500watz; Tempo: 5 min; Pulso: 0; Amplitude: 20%;				
SPC:Col:5-FU	$106,3 \pm 1,35$	$0,287 \pm 0,01$	$-15 \pm 0,62$	$59,07 \pm 0,54$
SPC:Col	$124,7 \pm 0,86$	$0,202 \pm 0,006$	$-12,1 \pm 0,511$	-
SPC:Col:Span 20:5-FU	$88,08 \pm 1,05$	$0,169 \pm 0,006$	$-12,3 \pm 1,04$	$50,20 \pm 10,20$
SPC:Col:Span 20	$107,7 \pm 2,57$	$0,321 \pm 0,006$	$-14,1 \pm 0,66$	-

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 8 podemos observar que a incorporação do fármaco 5-FU, bem como do Span 20 em razão molar 9:1, não altera de forma significativa os valores físico-químicos da nanopartícula quanto ao tamanho e índice de polidispersão, demonstrando ótima homogeneidade dos resultados com tamanhos nanométricos ideais para a veiculação tópica e baixos valores de índice de polidispersão. Para o potencial zeta, podemos observar que tanto ao adicionar o Span 20 como ao adicionar o 5-FU não houve modificação significativa no seu valor, permanecendo com carga negativa. Observando a eficiência de encapsulação, percebemos que o aumento da potência na etapa de sonicação dos lipossomas aumentou a porcentagem de encapsulação do 5-FU. Houve uma diferença não significativa na eficiência de encapsulação do lipossoma sem e com Span 20, permanecendo a porcentagem de encapsulação com um resultado bastante promissor.

Com relação a outros estudos previamente realizados para encapsulação de 5-FU, HANDALI et al., 2019 observaram resultados similares aos obtidos nesse estudo para tamanho de partícula e eficiência de encapsulação de 104,8 nm e 60,7%, respectivamente, para lipossoma convencional carreando 5-FU, tendo em sua composição folato-PEG-DSPE. Já nos estudos de MOGHIMIPOUR et al., 2018b, utilizando diferentes proporções, 0,5:1, 1:1 e 2:1, entre colesterol e fosfatidilcolina, foram obtidos resultados de eficiência de encapsulação de 5-FU entre 20,61 – 58,66%, sendo a proporção de 2:1 a que obteve o melhor resultado e tamanho de partícula em torno de 107 nm. SEN; BANERJEE; MANDAL, 2019 trabalhando com lipossomas convencionais carreando 5-FU obtiveram tamanho da nanopartícula de 95,97 nm \pm 0,14; e eficiência de encapsulação de 5-FU de 38,6% \pm 3,18.

5.2 Caracterização dos lipossomas por microscopia de força atômica (MFA)

A MFA é uma das técnicas empregadas para a visualização da morfologia de nanopartículas e outros materiais. É muito versátil, uma vez que tem a capacidade de analisar amostras nas mais variadas condições ambientais, possui uma rápida e fácil preparo de substância e permite que o mesmo seja preservado no seu estado nativo (RUOZI et al., 2007).

Figura 10. Imagem da morfologia dos lipossomas com SPC:Col:Span 20:5-FU 3D 10x10 μ m (A), 2D 10x10 μ m (B) e 2D 2x2 μ m (C); e dos lipossomas com SPC:Col:5-FU 3D 10x10 μ m (D), 2D 10x10 μ m (E) e 2D 2x2 μ m (F). Imagens com resolução de 512 pixels.

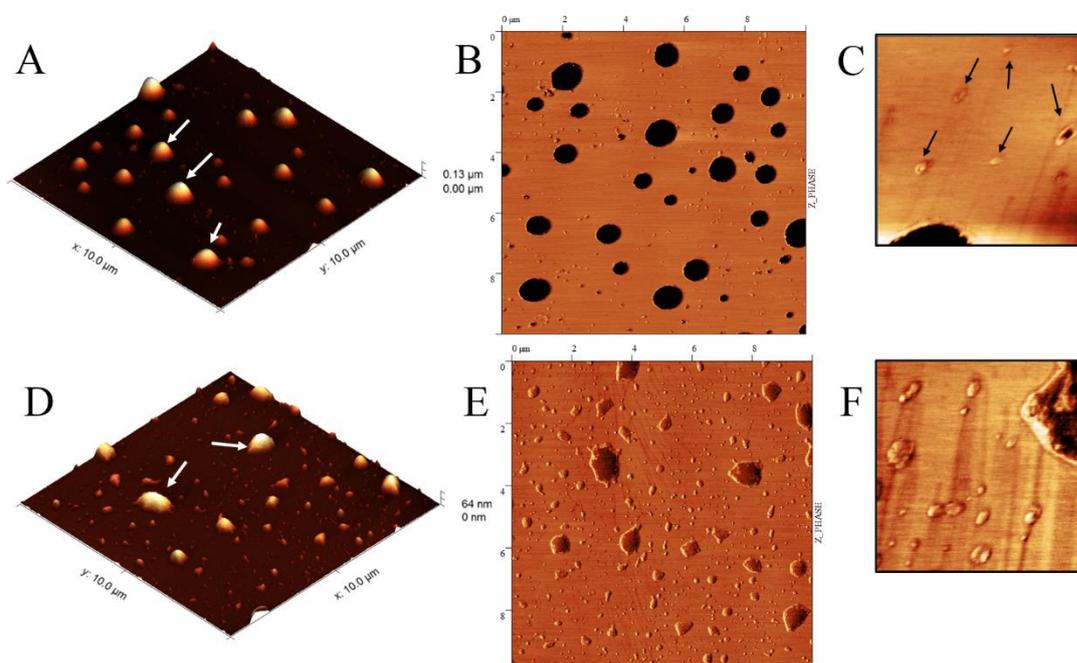


Figura 11. Imagem da morfologia do lipossoma com SPC:Col:Span 20:-FU 2D 10x10 μm (A), 2D 2x2 μm (C) e lipossoma com SPC:Col:5-FU 2D 10x10 μm (B), 2D 2x2 μm (D). Imagens com resolução de 512 pixels.

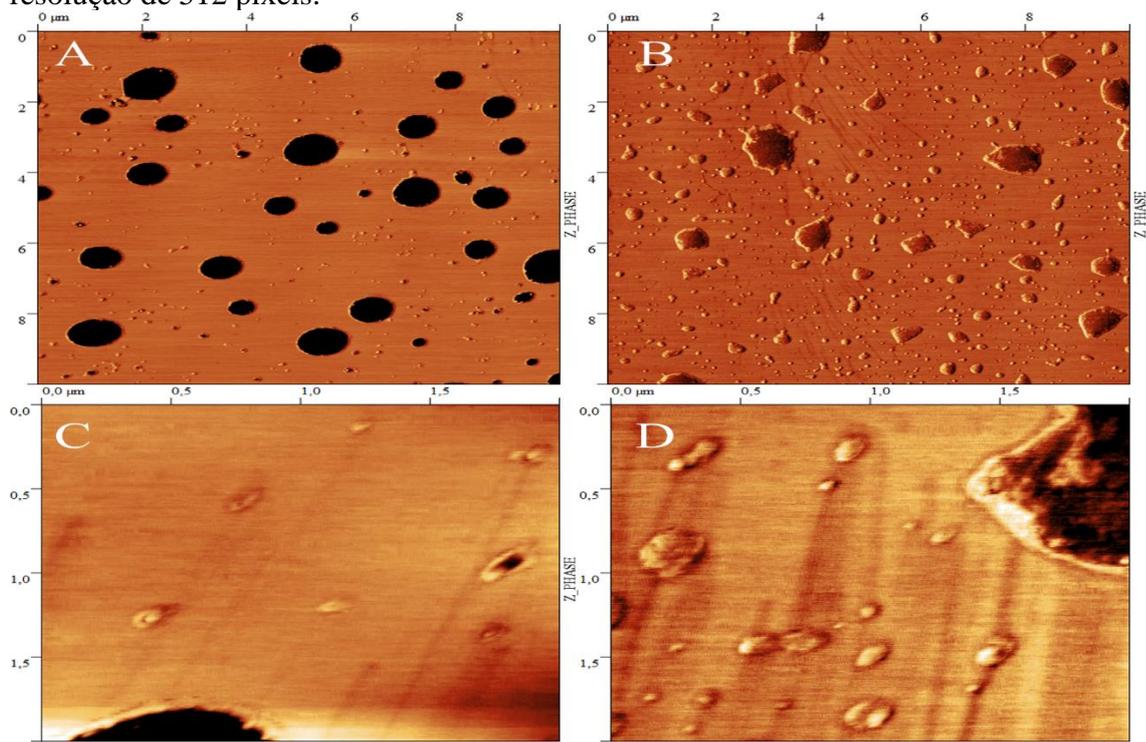


Figura 12. Histograma das rugosidades evidenciadas no lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU (A) e lipossoma com SPC:Col:5-FU (B)

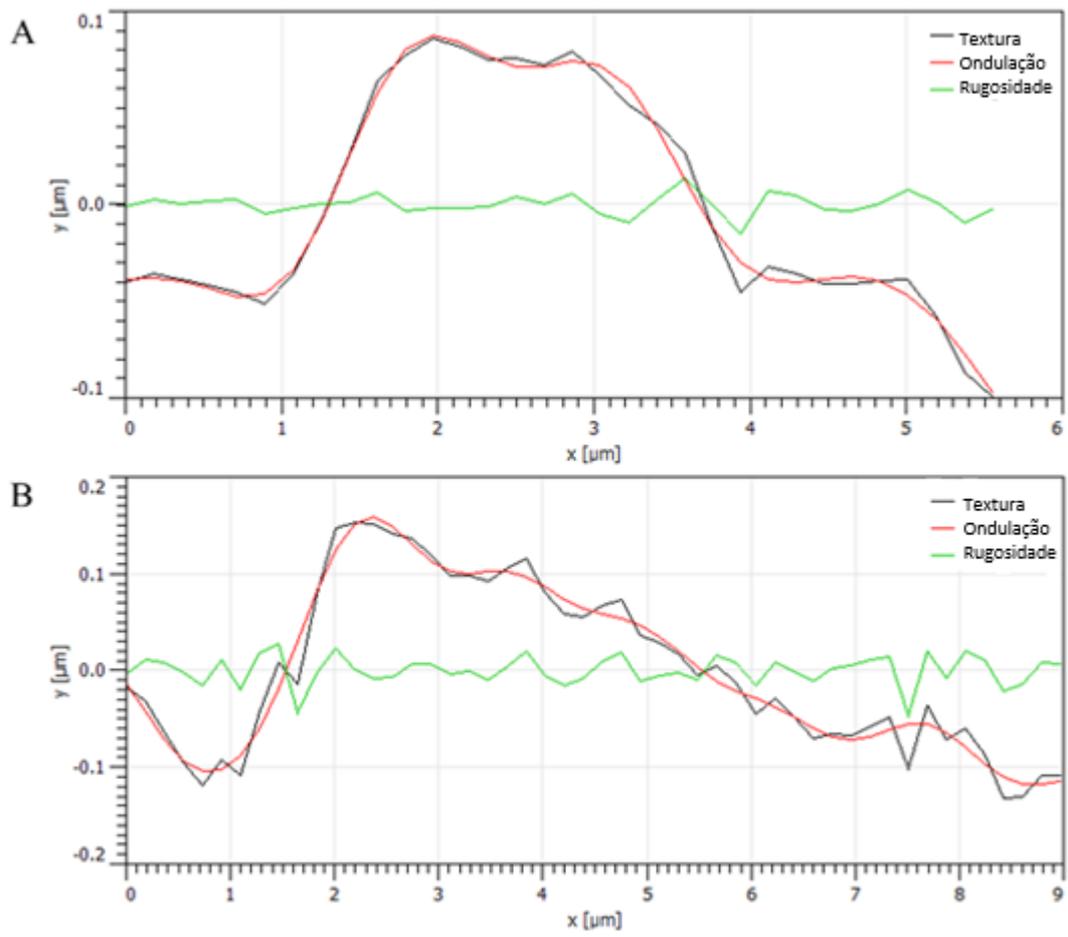


Figura 13. Gráfico de tamanho médio para os lipossomas com SPC:Col:5-FU e lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU. Barras expressam tamanho máximo e mínimo

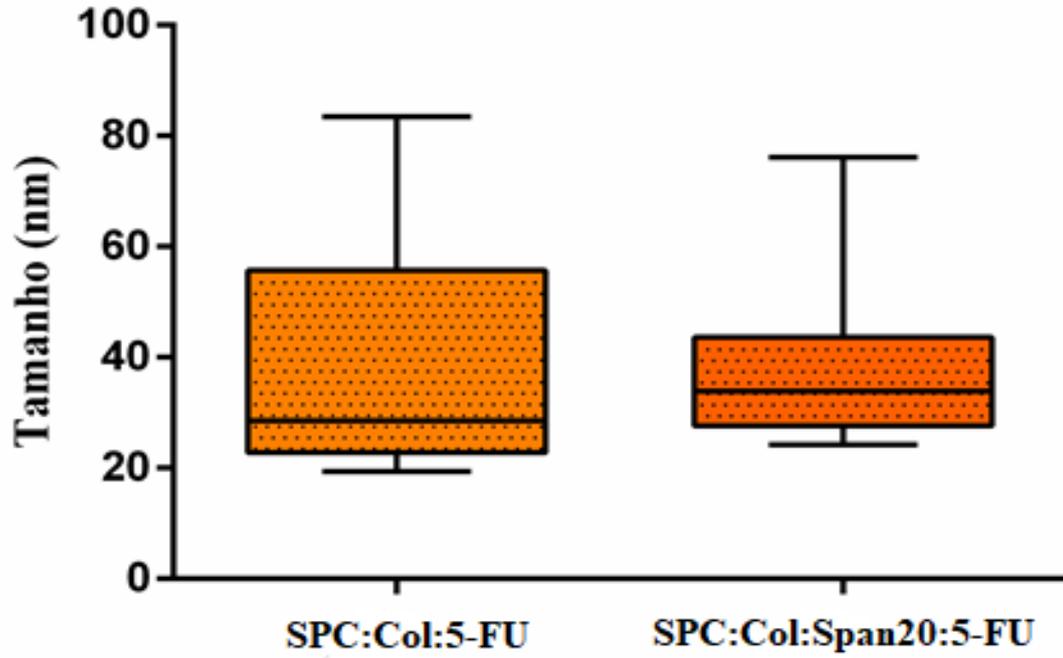


Figura 14. Gráfico de distribuição por tamanho de partícula da amostra lipossoma com SPC:Col:5-FU.

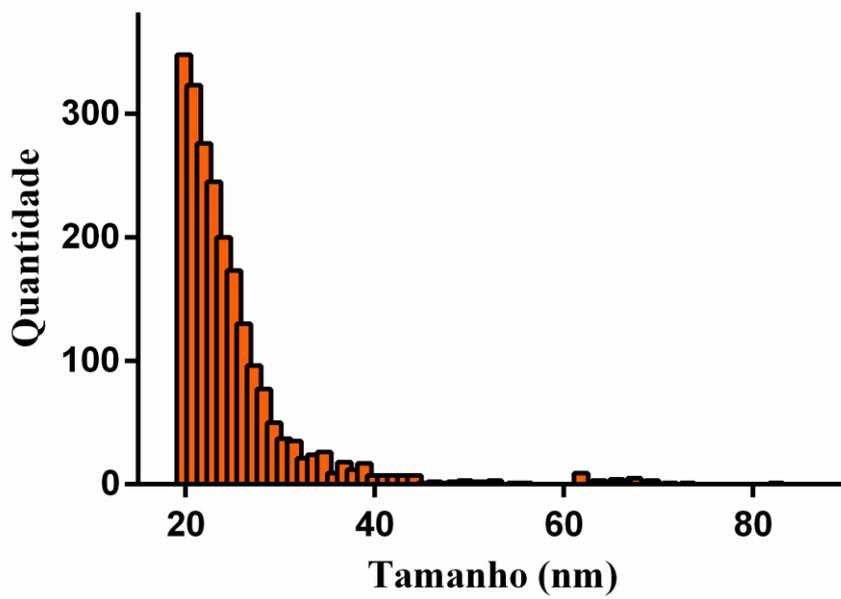


Figura 15. Gráfico de distribuição por tamanho de partícula da amostra lipossoma com SPC:Col:Span 20:5-FU.

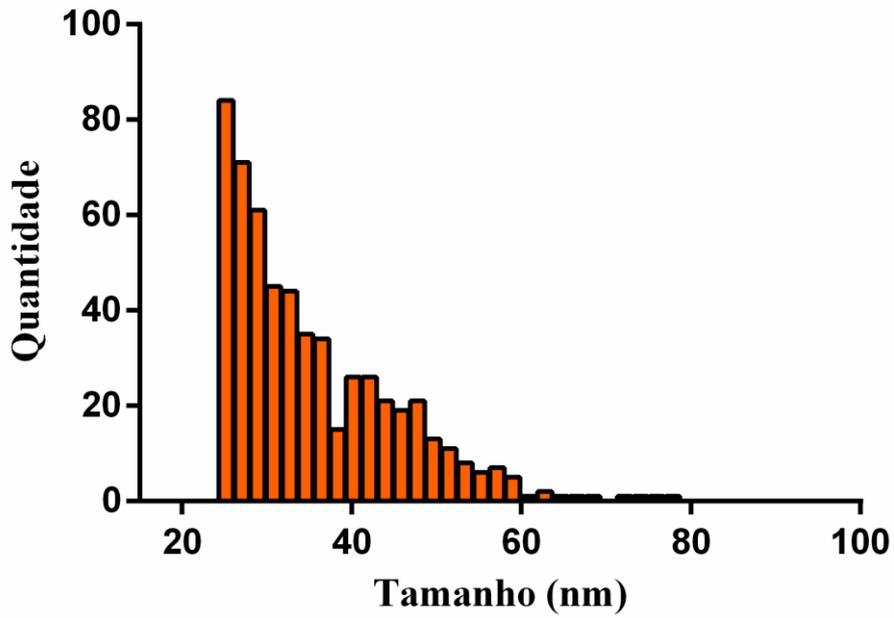


Figura 16. Gráfico da distribuição de tamanho por DLS dos lipossomas com SPC:Col:5-FU

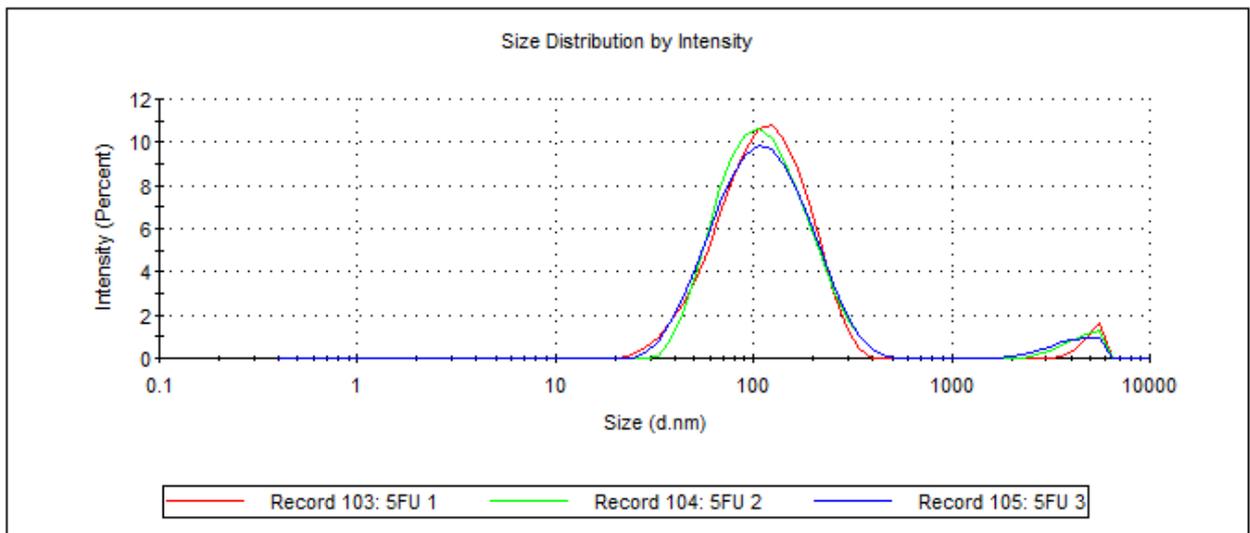
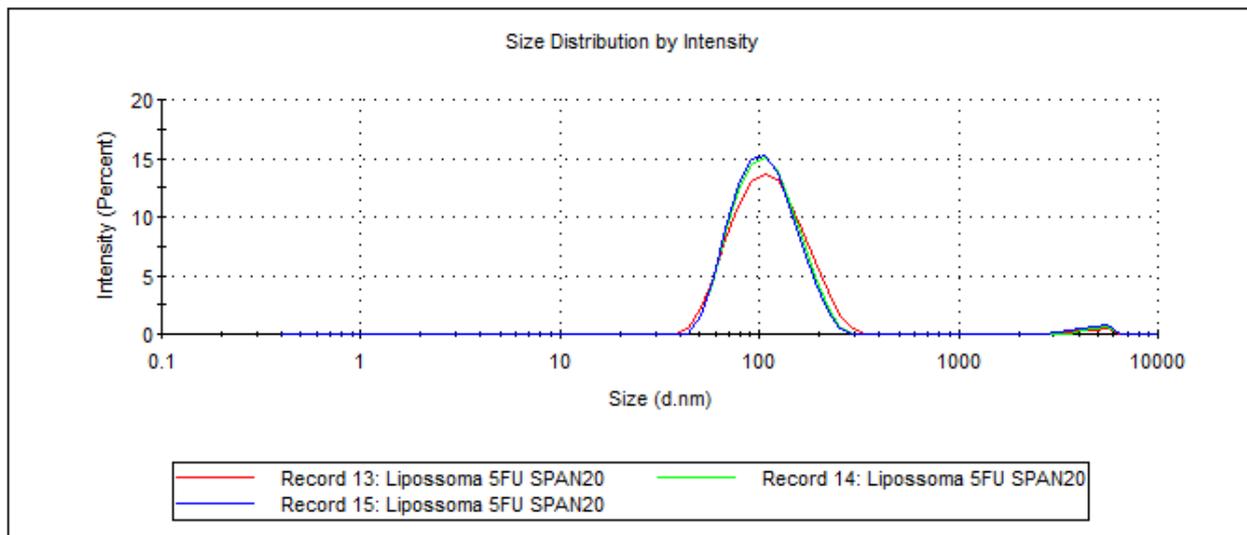


Figura 17. Gráfico da distribuição de tamanho por DLS dos lipossomas com SPC:Col:Span 20:5-FU



As Figuras 10 e 11 nos mostram a morfologia dos lipossomas por microscopia de força atômica, nas quais é possível observar a estrutura esférica e rugosidades das membranas dos lipossomas convencionais. As imagens também evidenciam como o uso do Span20 como promotor de absorção melhora a circunferência dos lipossomas, de maneira que temos vesículas mais concêntricas e organizadas. Esse fato é esperado, visto que a presença de ativadores de borda podem melhorar a organização da bicamada lipídica (ZHOU et al., 2014). A Figura 12 mostra o histograma das rugosidades presentes nos lipossomas com Span 20 e sem Span 20, a linha preta representa a textura do contorno das nanopartículas, a linha em vermelho são as ondulações representadas, por meio dessas ondulações, a soma dos picos e vales é feita e assim é traçado uma linha média no qual é representada a rugosidade (linha verde). Os parâmetros de amplitude são indicadores das diferentes profundezas dos vales ou tamanho dos picos do perfil de rugosidade superficial, ou seja, as variações das reentrâncias e saliências. A linha média é uma linha compreendida paralelamente ao comprimento do perfil, que serve de referência e divide o perfil da rugosidade, de modo que a soma das áreas inferiores (vales) seja igual à soma das áreas superiores (picos) (OLIVEIRA; ALBUQUERQUE; CRUZ, 2012; PETROPOULOS; PANDAZARAS; DAVIM, 2010). Como representado acima pela figura, o lipossoma com Span 20 apresenta um menor perfil de rugosidade em comparação ao lipossoma sem Span 20, na qual demonstra maior variação das reentrâncias e saliências em sua superfície.

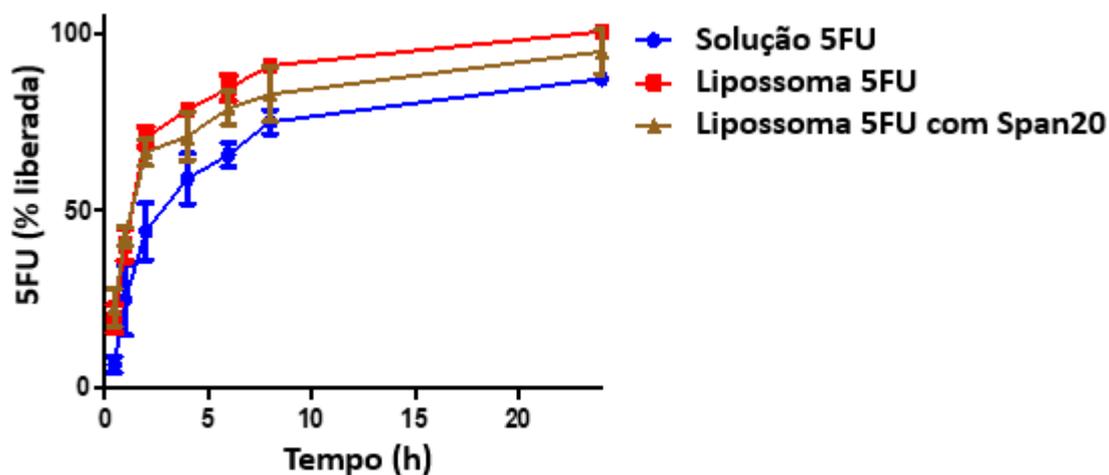
A Figura 13 mostra o gráfico de tamanho médio dos lipossomas, na qual pode-se observar que lipossoma com Span 20 possui uma melhor distribuição de tamanho em comparação ao lipossoma convencional, com menor variação em relação à média. Os valores de tamanho de

partícula dos lipossomas segundo à caracterização por MFA foram menores em relação aos alcançados com a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), como pode ser observado nas figuras 14 e 15. Como comparação, os lipossomas convencional e com Span 20 apresentaram valores de tamanho de partícula equivalentes a $106,3 \pm 1,35$ nm e $88,08 \pm 1,05$ nm, respectivamente, por DLS. Por outro lado, os valores de tamanho de partícula para lipossoma convencional e com Span 20 foram de 20 – 35 nm e 35 – 45 nm, respectivamente, pela técnica de MFA. Os resultados diferentes se justificam porque a técnica de DLS avalia o diâmetro hidrodinâmico, ao passo que a microscopia de força atômica revela o tamanho real das nanoestruturas. Finalmente, as figuras 16 e 17 ratificam a melhor distribuição das populações de tamanho do lipossoma com Span 20.

5.3 Liberação passiva *in vitro* de 5-FU

A Figura 18 mostra a liberação de 5-FU em solução, lipossoma 5-FU e lipossoma com Span20, em estudo empregando membrana de diálise.

Figura 18. Liberação em porcentagem de 5-FU em célula de Franz a 32°C e 100 rpm após 24 h



Observou-se que não existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre solução 5-FU versus Lipossoma 5-FU e solução 5-FU versus Lipossoma 5-FU com Span 20. De acordo com a figura, podemos perceber que em todas as amostras o fármaco é liberado mais de 85% em um período de 24 h.

Podemos observar que em todas as amostras houve uma rápida liberação do fármaco nas primeiras horas, e depois ocorreu uma estabilização nas porcentagens liberadas no compartimento receptor. Atribui-se esse fato à quantidade de 5-FU livre nas vesículas lipossômicas, visto que praticamente metade do fármaco se encontra não encapsulado, rapidamente atingindo um equilíbrio entre os dois compartimentos. Por este motivo, não foi possível observar diferença entre a solução

e lipossomas contendo 5-FU. Tal comportamento é esperado visto que estamos trabalhando com uma substância pequena e de caráter hidrofílico (ALOMRANI et al., 2019).

PETRILLI et al., 2018c desenvolveram lipossomas e imunolipossomas para o tratamento do câncer de pele. No estudo de liberação passiva *in vitro* a solução aquosa de 5-FU e os lipossomas foram colocadas em contato com tampão fosfato (PBS pH 7,4), na solução o fármaco foi totalmente liberado, já no lipossoma, cerca de 50% do fármaco se encontrava não encapsulado e foram quantificados nos primeiros minutos do experimento, enquanto outros 10% foram quantificados após algumas horas e o restante do fármaco não foi quantificado, ou seja, não houve liberação do interior dos lipossomas.

ALOMRANI et al., 2019 no estudo de liberação *in vitro* de 5-FU, em solução e nos lipossomas com promotor de absorção Tween80, utilizaram a técnica do saco de diálise imerso em tampão fosfato (PBS pH 7,4) observaram que a solução aquosa do fármaco apresentou perfil de liberação rápido, onde nas primeiras horas houve cerca de 70% de 5-FU liberado no compartimento receptor, enquanto que nos lipossomas a liberação variou entre 43,6 – 54,1% nas primeiras 2 horas.

5.4 Avaliação da citotoxicidade de 5-FU e lipossomas em linhagem de câncer de pele

Para esse estudo utilizamos o ensaio quantitativo de MTT, que é colorimétrico e baseado na capacidade das enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células vivas em reduzir o MTT, substrato solúvel em água de cor amarela, a cristais de formazan que são revelados na cor púrpura quando entram em contato com DMSO (RATA et al., 2020).

As amostras de solução de 5-FU, lipossomas com e sem Span20, contendo ou não 5-FU foram avaliados na linhagem celular A431, de carcinoma celular escamoso de pele.

Figura 19. Viabilidade celular pelo ensaio do MTT da célula A431 após incubação com solução 5-FU, lipossoma convencional contendo 5-FU e branco, lipossoma com Span 20 contendo 5-FU e branco.

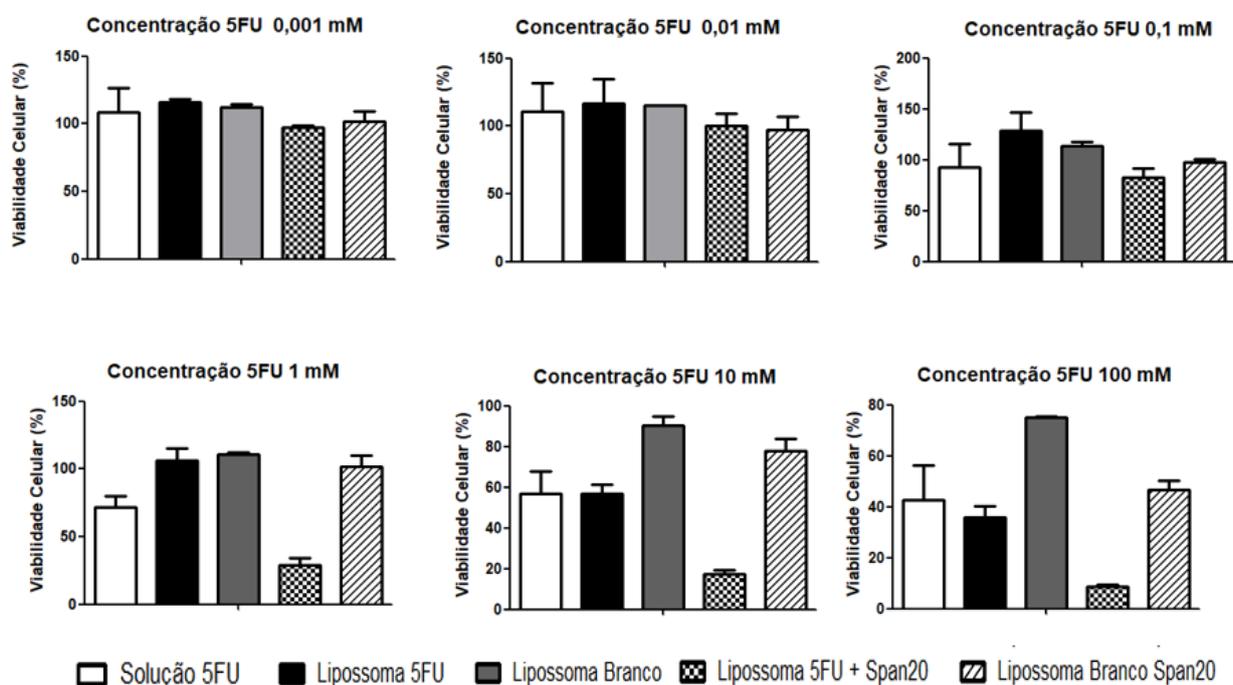


Tabela 9. Valores do IC₅₀ para a solução de 5-FU, lipossoma 5-FU e lipossoma com Span 20 e 5-FU

Grupos	IC ₅₀
Solução 5-FU	24,65 ± 18,49
SPC:Col:5-FU	30,52 ± 6,21
SPC:Col:Span 20:5-FU	0,62 ± 0,26

Como podemos observar na Tabela 9 de acordo com os resultados o lipossoma sem Span 20 foi a amostra que obteve maior valor de IC₅₀ de 5-FU, ou seja, apresentando menor citotoxicidade, seguido de solução 5-FU e por fim o lipossoma com Span 20 foi a amostra mais citotóxica, com valor de IC₅₀ equivalente a 0,62 ± 0,26, o que significa que é necessário uma concentração muito baixa dessa amostra para reduzir a viabilidade celular da linhagem A431. Isso pode indicar que o Span 20, como agente promotor de absorção, foi capaz de melhorar a captação do fármaco nas células cancerígenas, o que será investigado em futura etapa de continuação do trabalho, com a avaliação da captação celular.

A Figura 19 mostra a viabilidade das células A431 na presença das diferentes amostras, solução de fármaco ou lipossomas. Podemos observar que a citotoxicidade do fármaco é concentração dependente. Por exemplo, nas concentrações do fármaco de 1, 10 e 100 µg/mL o

Lipossoma 5-FU com Span 20 foi mais citotóxico em comparação com as demais formulações testadas, onde a viabilidade celular obteve valores de 29,21, 17,52 e 8,85% respectivamente. Já na solução do fármaco e no lipossoma convencional, os valores de viabilidade celular, para as mesmas concentrações, foram 65,83, 48,85, 52,41% e 106,58, 56,90, 35,75%, respectivamente.

As formulações branco de lipossomas foram estudadas como controle. A formulação branco de lipossoma com Span 20 foi também testada com o intuito de excluir a citotoxicidade relacionada ao uso do tensoativo. Devido à sua estrutura anfifílica essas substâncias podem vir a interagir com a bicamada da célula e levar a sua degradação (AMASYA et al., 2019). A viabilidade celular das formulações lipossoma branco convencional e com Span 20 foram de, respectivamente 110,84, 90,50, 75,23% e 102, 77,95, 46,79%, para as três concentrações mais elevadas de formulação, portanto a citotoxicidade evidenciada foi principalmente atribuída ao fármaco e não à formulação, como evidenciado pela Figura 19.

PETRILLI et al., 2018c desenvolveram lipossomas convencionais e imunolipossomas com cetuximabe encapsulando 5FU para o tratamento do câncer de pele, com avaliação mesma linhagem celular, A431, empregada no presente trabalho. No estudo de citotoxicidade com teste do MTT, os autores observaram que o tratamento com lipossomas foi mais eficaz em diminuir a viabilidade celular em comparação com o controle. Apesar disso, a viabilidade celular ainda foi considerada alta, sendo que o lipossoma e imunolipossoma resultaram em valores de viabilidade celular de $78,4 \pm 4$ e $80,8 \pm 3$, após 24 horas de tratamento.

AMASYA et al., 2019 estudaram o efeito do 5-FU encapsulado em nanopartículas lipídicas (NLC) no tratamento do câncer de pele. No estudo de citotoxicidade, utilizando o teste do MTT e a linhagem celular A431, observaram que a viabilidade celular de A431 quando foram tratadas com NLC com 5FU foi muito menor quando comparada a solução livre de 5-FU e a NLC branco, onde os resultados foram de $33,9 \pm 0,34\%$, $55,6 \pm 0,56\%$ e $63,6 \pm 0,68\%$, respectivamente.

CALIENNI et al., 2018 desenvolveram formulações com lipossomas ultradeformáveis, compostos por SPC e NaC (colato de sódio). A linhagem celular de melanoma humano SK-Mel-28 foi empregada nos estudos de citotoxicidades seguindo o teste do MTT. Os resultados mostraram que o lipossoma ultradeformável foi mais citotóxico para a linhagem celular em comparação com a solução de 5-FU livre, onde a viabilidade celular foi reduzida em 70% após 24 horas de experimento.

Finalmente, no estudo de AMIRI et al., 2016 podemos verificar a utilização do span 20 como componente de niosomas, juntamente com colesterol, e polietilenoglicol 2000 (PEG-2000) para encapsular silibinina e verificar sua eficácia contra a linhagem de células de carcinoma de mama, T47D. O teste de citotoxicidade foi feito com MTT e os resultados mostraram que os niosomas

obtiveram um IC₅₀ menor e foram mais eficazes em diminuir a viabilidade celular, de forma dose dependente, em comparação com a solução da droga livre.

5.5 Avaliação de penetração cutânea de 5-FU em solução ou lipossomas de forma passiva ou com aplicação de microagulhas

Primeiramente, para a quantificação de 5-FU em pele utilizamos a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, para separar o fármaco dos interferentes de pele. Empregou-se a coluna Zic-Hilic, que tem sido utilizada para análise de substâncias hidrofílicas. Contém uma fase estacionária hidrofílica e fases estacionárias do tipo zwitterion, sendo sua fase móvel composta por um porcentagem elevada de solvente orgânico. Pode-se dizer que é uma combinação definida de fase normal e fase reversa (AMASYA et al., 2018).

Os resultados seguintes estão relacionados ao desenvolvimento do método bioanalítico de quantificação do 5FU em pele de orelha de suíno, empregando curva matrizada.

Tabela 10. Recuperação (%) de 5-FU em pele de orelha de suíno

Concentração (µg/ml)	Banho Ultrassônico	Ultraturrax
0,3	59,13	182,93
0,5	<LQ	98,41
1	72,74	96,30
2	80,85	92,40
4	85,28	94,47
6	90,98	96,14

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 podemos verificar que a recuperação do fármaco 5-FU utilizando metanol como agente extrator, obteve melhores resultados quando utilizamos o equipamento Ultraturrax, em comparação com o banho ultrassônico, e podemos observar que os dados foram mais lineares. LEITE et al., 2021 desenvolveram um modelo ex-vivo para verificar a capacidade em acumular dacarbazina na pele ao longo do experimento, e utilizaram equipamento semelhante para extrair o fármaco da pele e quantificaram as amostras das camadas da pele em HPLC.

Considerando os resultados das porcentagens de recuperação do 5-FU podemos observar que obtivemos resultados muito satisfatórios a partir da concentração de 0,5 µg/mL. Os resultados deste estudo de extração de 5-FU foram plotados (concentração de 5-FU vs. área), resultando em resposta linear, com coeficiente de correlação linear equivalente a 0,9979 e 0,9991, respectivamente, para extração com banho ultrassônico e ultraturrax (Figura 20).

Figura 20. Gráficos das curvas de calibração analisadas em HPLC para desenvolvimento do método bioanalítico utilizando banho ultrassônico (A) e ultraturrax (B) para extração do fármaco da pele.

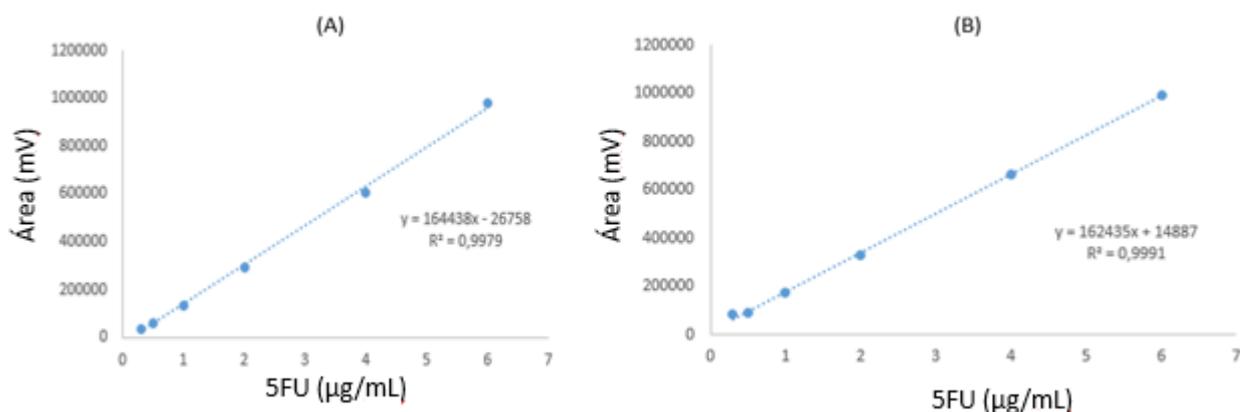
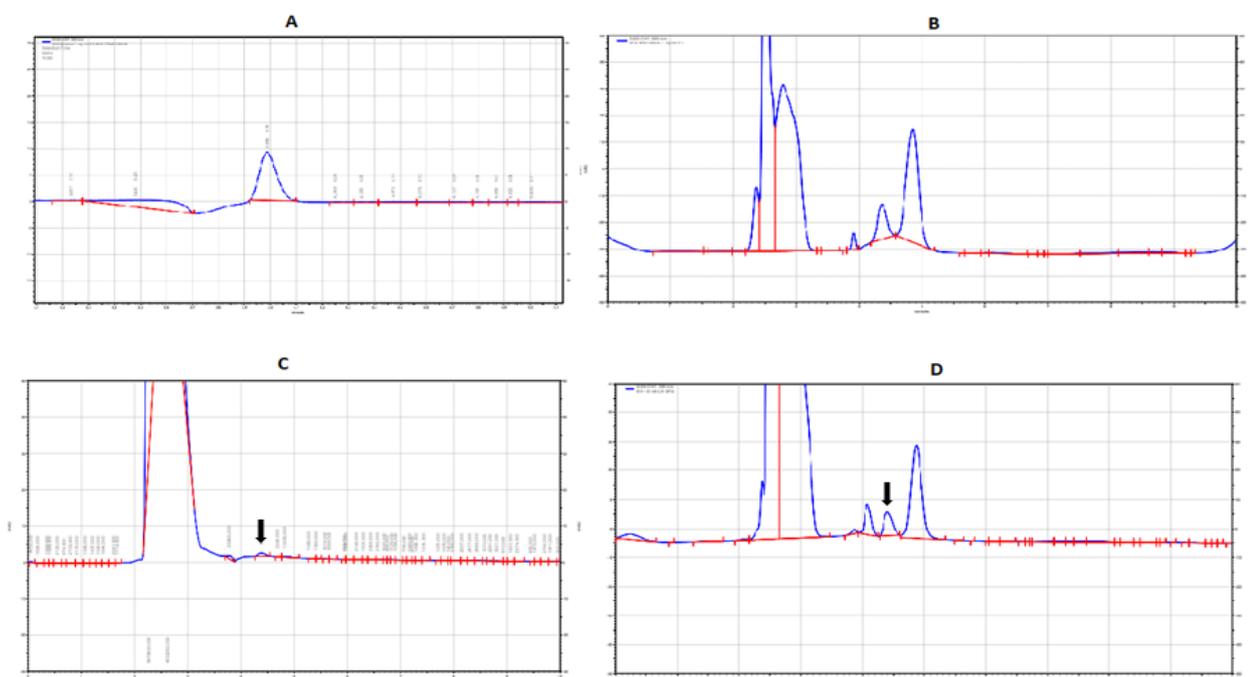


Figura 21. Imagens dos cromatogramas referentes ao estudo de penetração cutânea do lipossoma convencional com 5-FU quantificados por HPLC. A equivale a 5-FU com metanol na concentração de 1 µg/mL, B equivale a 5-FU em pele com metanol na concentração de 1 µg/mL



Na figura 21 temos a representação dos cromatogramas do estudo de penetração cutânea de 5-FU. Em A e B temos, respectivamente, ambos em concentração do fármaco de 1 µg/mL, a representação do 5-FU com metanol e 5-FU na pele extraído com metanol, o primeiro nos permite observar com precisão o tempo de retenção do fármaco, enquanto que no segundo conseguimos observar e identificar o pico de 5-FU apesar dos inúmeros interferentes existentes na pele, mostrando que existe a separação com precisão do fármaco, que elui em 4,5 min. Em C e D temos,

respectivamente, a quantificação do fármaco no estrato córneo e na epiderme viável, no primeiro conseguimos ver um grande pico, o mesmo é referente a cola remanescente a fita utilizada no tape stripping. O pico do fármaco nessa região da pele é bastante discreto, apesar desse fato conseguimos quantificar o 5-FU. Em D identificamos de forma inequívoca o fármaco na epiderme viável e derme, e diferente do estrato córneo, podemos observar um pico de fácil visualização. Torna-se evidente que a utilização da coluna ZicHilic, 5 μ m 200Å 150x4,6 mm, específica para a quantificação de fármacos que tenham caráter hidrofílico, que foi de grande valia para o sucesso dessa etapa de trabalho, de separação de 5-FU dos interferentes da pele.

Após a padronização do método, iniciamos os experimentos com célula de Franz para quantificação do fármaco nas camadas da pele de orelha de suíno (extrato córneo e epiderme viável/derme) com solução de 5-FU livre, lipossoma convencional e lipossoma com Span 20, todos com concentração do 5-FU de 780 μ g/mL com volume de injeção de 50 μ L.

A medida da resistividade da pele é um parâmetro indicativo de como se encontra a estrutura do estrato córneo. De modo que uma diminuição nesse valor demonstra que existe uma maior permeabilidade na pele ou a presença de alguma alteração estrutural, de modo que facilite a penetração cutânea de fármacos (PETRILLI, 2016).

No presente trabalho a medida da resistividade da pele foi feita antes da aplicação do tratamento utilizando PBS nos compartimentos doador e receptor, e a Lei de Ohm foi utilizada no cálculo da resistividade da pele. No grupo SPC:Col:Span 20:5-FU a medida da resistividade na aplicação passiva foi de 106,1 k Ω .cm² esse resultado mostra que a estrutura do estrato córneo estava completamente íntegra antes de aplicarmos os lipossomas, desse modo, nenhum fator que pudesse melhorar a permeação do 5-FU foi utilizado nessa etapa. De modo oposto, ao medir a resistividade da pele utilizando as microagulhas o valor encontrado no cálculo foi de 2,5 k Ω .cm², o que mostrou uma queda considerável, um percentual de 97,5%, na resistividade da pele, demonstrando que nessa etapa a utilização de microagulhas foi capaz de modificar a estrutura do estrato, através da criação de microporos, córneo de modo a facilitar a permeação do 5-FU nas camadas da pele.

Tabela 11. Quantificação do 5-FU em solução, lipossoma convencional com 5-FU, lipossoma com Span 20 e 5-FU em estrato córneo (EC) e epiderme viável e derme (EV + D) de pele de orelha de suíno após estudo de penetração por 24h

	Passivo			Microagulhas		
	Estrato Córneo (ng/cm ²)	Epiderme Viável + Derme (ng/cm ²)	Receptor	Estrato Córneo (ng/cm ²)	Epiderme Viável + Derme (ng/cm ²)	Receptor
Solução 5-FU	298,25 ± 206,57	1997,71 ± 530,18	<LQ	127,83 ± 75,66	3214,07 ± 1510,63	<LQ
SPC:Col:5-FU	211,08 ± 48,29	1842,20 ± 716,98	<LQ	13,13 ± 4,08	2342,84 ± 990,83	<LQ
SPC:Col:Spa n20:5-FU	314,93 ± 59,64	2585,49 ± 275,98	<LQ	549,12 ± 120,33	5018,05 ± 1696,52	<LQ

A Tabela 11 mostra um comparativo entre as 3 amostras utilizadas no estudo de penetração cutânea passiva e com microagulhas. Podemos observar que nos resultados de penetração passiva o uso do Span 20 como promotor de absorção aumentou a concentração do fármaco nas camadas da pele em comparação com as demais amostras, principalmente a epiderme viável, local onde se localiza o carcinoma celular escamoso. Como comparação, os valores de concentração de 5-FU em ng/cm² para solução de 5-FU, lipossoma sem Span 20 e lipossoma com Span 20 corresponderam a, respectivamente 1997,71 ± 530,18, 1842,20 ± 716,98 ng/cm² e 2585,49 ± 275,98 ng/cm², na epiderme viável e derme. Além disso, os dados apresentados mostram a acumulação preferencial do fármaco na epiderme viável e derme em relação ao estrato córneo, que apresenta natureza lipofílica, em contraste ao fármaco que é hidrofílico.

A acumulação passiva de 5-FU em pele já foi demonstrada nos trabalhos de PETRILLI et al. 2018 que desenvolveram solução, lipossoma e imunolipossoma com 5-FU e mostraram que após 6h de penetração passiva, com pele de porco, não houve alteração na penetração do fármaco na epiderme viável quando comparados a solução, de forma passiva. Utilizando pele humana, CALIENNI et al., 2018 estudaram a penetração de 5-FU com lipossoma ultradeformável, comparando os grupos estudados, não foi possível quantificar o fármaco quando em solução, enquanto que os resultados obtidos com o lipossoma ultradeformável mostraram que o 5-FU foi quantificado em quantidade 7,2 vezes maior nas camadas da pele, e o lipossoma convencional correspondeu a apenas 3,9 vezes de aumento. AMASYA et al., 2018 avaliaram a penetração cutânea do 5-FU encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) + Transcutol®, utilizando pele da região abdominal de ratos fêmeas utilizando célula de Franz. Foi observado melhora na penetração dérmica do 5-FU quando encapsulado em NLC em comparação ao SLN, isso em virtude do uso do Transcutol®, que é um promotor de penetração. Nenhum fármaco foi quantificado no compartimento receptor. COSCO et al., 2015 co-encapsularam 5-FU e resveratrol em lipossomas ultradeformáveis e estudaram a

penetração cutânea em pele humana utilizando célula de Franz. Os resultados mostraram que ao encapsular o 5-FU houve melhora na sua penetração nas camadas da pele na ordem de 6,2 vezes, esse achado foi corroborado pela avaliação quantitativa do fármaco através do fluxo do fármaco livre e encapsulado que foi de, respectivamente, $0.67 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$ e $5.89 \pm 0.42\text{mg}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$.

A utilização da aplicação prévia de microagulhas como método físico para melhorar a penetração do 5-FU nas camadas da pele nos permitiu obter resultados promissores, visto que, em todas as amostras estudadas, houve aumento da penetração do 5-FU na epiderme viável + derme, em valores para solução 5-FU, lipossoma sem Span 20 e lipossoma com Span 20, respectivamente, de 3214.07 ± 1510.63 , 2342.84 ± 990.83 , $5018.05 \pm 1696.52 \text{ ng}/\text{cm}^2$, aumentos na ordem de 1,60; 1,27 e 1,94 vezes, respectivamente, em relação à administração passiva. Não foi possível quantificar o fármaco no compartimento receptor, um ponto muito relevante pois mostra, que mesmo utilizando as microagulhas, o fármaco não mostrou ação transdérmica e sim ação tópica. Considerando o estrato córneo como uma barreira limitante para a penetração de fármacos, principalmente os que possuem caráter hidrofílico, de acordo com nossos resultados a utilização das microagulhas forneceram uma melhora significativa na penetração do 5-FU nas camadas da pele através da formação de microporos ou orifícios que permitem uma desestabilização do estrato córneo com, conseqüentemente, melhora na concentração do fármaco na epiderme viável (NAGUIB; KUMAR; CUI, 2014).

Trabalhos prévios evidenciaram o papel de promoção da penetração cutânea de 5-FU com microagulhas. Por exemplo, NAGUIB; KUMAR; CUI, 2014, testaram a utilização de microagulhas sólidas para melhorar a penetração tópica de 5-fluorouracil e sua atividade antitumoral *in vitro* em pele de camundongo utilizando o aparato de célula de Franz e *in vivo* em camundongos. Os resultados mostraram que a permeabilidade do 5-FU em solução foi 4,5 vezes maior em pele pré-tratadas com microagulhas em comparação com pele de camundongo que não foi pré-tratada. A avaliação da eficácia antitumoral foi feita através da regressão tumoral de células B16-F10 em camundongos, com aplicação de creme com 5% de 5-FU na pele não tratada e na pele pré-tratada com microagulhas. A regressão tumoral foi maior quando as microagulhas foram previamente aplicadas. HAO et al., 2020 desenvolveram nanopartículas contendo 5-fluorouracil e indocianina verde fotossensíveis e integraram a um sistema de microagulhas solúveis com ácido hialurônico (5-Fu-ICG-MPEG-PCL@HA MN) para o tratamento do câncer de pele. A capacidade antitumoral *in vivo* foi estudada utilizando camundongos com tumor de linhagem celular de A431 e A375. Os resultados mostraram que a aplicação de 5-Fu-ICG-MPEG-PCL@HA MN seguida da terapia com laser resultou em maior capacidade de reduzir o volume tumoral em comparação aos outros grupos

testados, mostrando que a terapia combinada de microagulhas e laser possui um grande potencial quimioterápico.

Figura 22. Representação gráfica de quantificação de 5-FU (780 µg/ml) de forma passiva e com microagulhas no estrato córneo em solução, lipossoma convencional e lipossoma com Span 20

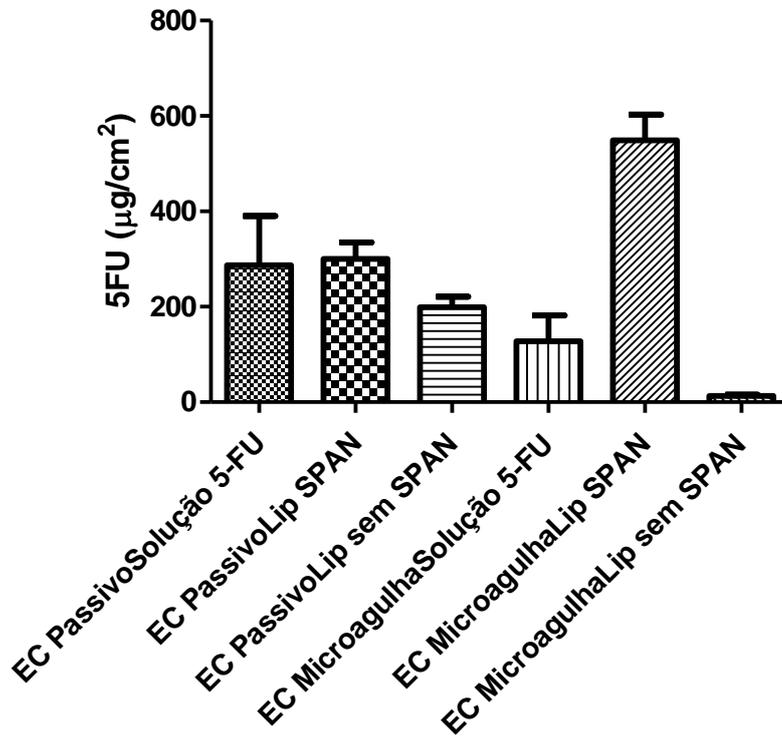
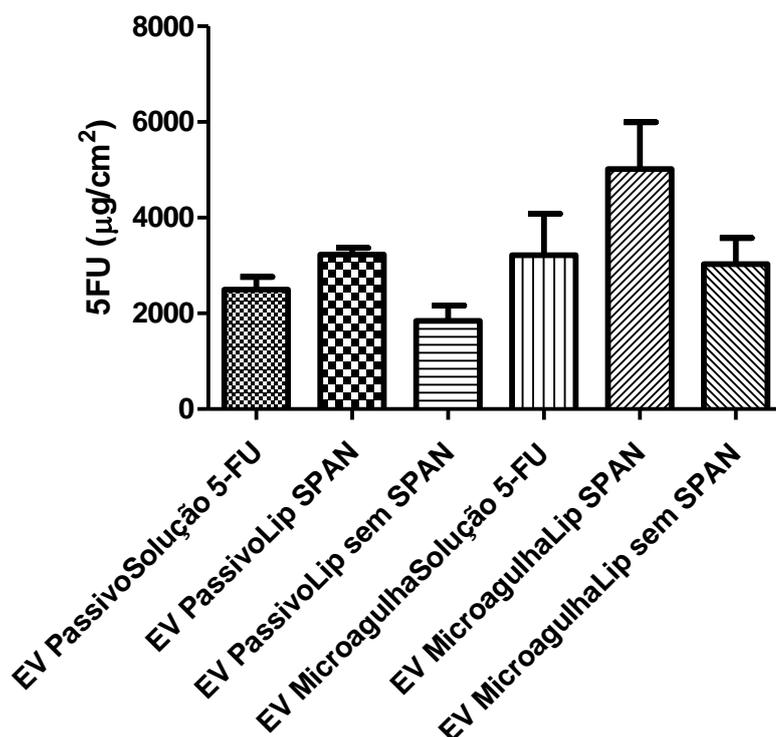


Figura 23. Representação de quantificação de 5-FU (780 µg/ml) de forma passiva e com microagulhas na epiderme viável + derme em solução, lipossoma convencional e lipossoma com Span 20



Do mesmo modo as Figuras 22 e 23 reiteram os resultados mostrados na Tabela 11, observamos visivelmente que o 5-FU se acumula em maior quantidade na epiderme viável + derme quando comparado com o estrato córneo, em todas as amostras testadas, tanto na penetração passiva como com as microagulhas. Os resultados mostram que a utilização do Span 20 em lipossomas proporcionou melhor acúmulo do fármaco nas camadas da pele, tanto na permeação passiva quanto utilizando as microagulhas como método físico.

Tabela 12. Avaliação estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados na penetração cutânea de 5-FU

Grupos estudados	Valor de $p < 0,05$
EcPassivoSolução5FU vs EcMicroagulhaLipSpan	*
EcPassivoLipsemSpan vs EcMicroagulhaLipSpan	**
EcMicroagulhaSolução5FU vs EcMicroagulhaLipSpan	**
EcMicroagulhaLipSpan vs EcMicroagulhaLipsemSpan	***
EvPassivoLipsemSpan vs EvMicroagulhaLipSpan	*

A Tabela 12 demonstra a diferença estatística entre os grupos estudados na penetração passiva e com a utilização de microagulhas. Podemos observar que existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no estrato córneo mais evidentemente entre microagulhas lipossoma com Span 20 e microagulhas com lipossoma sem Span 20. Na epiderme viável + derme existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre penetração passiva e com microagulhas para lipossoma sem Span 20 e lipossoma com Span 20. Esses resultados reiteram, novamente, que a utilização de Span 20 no lipossoma combinado com microagulhas foi muito favorável para a melhora na penetração do fármaco e acúmulo do mesmo na epiderme viável e derme.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de lipossomas com promotor de absorção se mostrou eficiente, visto que conseguimos produzir nanopartículas com tamanho ideal nanométrico e baixo índice de polidispersão, com eficiência de encapsulação elevada para um fármaco hidrofílico, dentro dos valores encontrados na literatura. No ensaio de citotoxicidade o lipossoma com promotor de absorção, Span 20, potencializou a citotoxicidade frente a linhagem de células A431 em comparação com a solução do fármaco livre e o lipossoma convencional. No ensaio de liberação *in vitro* com membrana de celulose obtivemos resultados com mais de 85% liberação do fármaco durante o período de 24 horas. Os estudos com pele mostraram que os lipossomas com promotor de absorção Span 20 são muito eficientes para a melhora da penetração cutânea passiva do fármaco nas camadas da pele após 24 horas de experimento, possibilitando o acúmulo do 5-FU na epiderme viável + derme em maior quantidade quando comparado ao estrato córneo. Utilizando as microagulhas como método físico podemos observar que houve aumento da penetração do fármaco nas camadas da pele em todas as amostras testadas, mostrando a grande eficácia das microagulhas em desestabilizar o estrato córneo e melhorar a penetração do fármaco nas camadas da pele, particularmente com o lipossoma com Span 20. Tanto na penetração passiva como com a utilização de microagulhas não foi observado fármaco no compartimento receptor, o que mostra que não há efeito transdérmica. Desse modo, os lipossomas com promotor de absorção, compostos por SPC: Colesterol: Span 20, em associação as microagulhas desenvolvidos nesse estudo se mostraram promissores para a veiculação e entrega tópica do fármaco 5-fluorouracil com perspectiva para utilização no tratamento do câncer de pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAGHRABI, P. M. et al. Influence of formulation variables on miconazole nitrate-loaded lipid based nanocarrier for topical delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 111046, 2020.

ALMEIDA, E. D. P. et al. Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, n. August, p. 262–273, 2018.

ALOMRANI, A. et al. The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 603–611, 2019.

ALOMRANI, A. H. et al. Itraconazole-hydroxypropyl- β -cyclodextrin loaded deformable liposomes: In vitro skin penetration studies and antifungal efficacy using *Candida albicans* as model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 74–81, 2014.

AMASYA, G. et al. Development of a HILIC method for the determination of 5-fluorouracil from nano drug delivery systems and rat skin extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 285–293, 2018.

AMASYA, G. et al. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 563, n. March, p. 110–121, 2019.

AMIRI, B. et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of silibinin-containing nanoniosomes in T47D human breast carcinoma cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 8, p. 3833–3836, 2016.

ASCENSO, A. et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: Transfersomes, ethosomes, and transethosomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5837–5851, 2015.

BADRAN, M. M.; KUNTSCHKE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4–5, p. 511–523, 2009.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016.

BAHRAMIZADEH, M. et al. Development, characterization and evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. August, p. 118623, 2019.

BAROLI, B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 7, p. 2271–2280, 2010.

BRIUGLIA, M. L. et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 231–242, 2015.

BRUCH, G. E. et al. Liposomes for drug delivery in stroke. **Brain Research Bulletin**, v. 152, n. June, p. 246–256, 2019.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018.

CALIENNI, M. N. et al. Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: Skin penetration, in vitro, and in vivo toxicological evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 3, p. 496–514, 2018.

Câncer de pele não-melanoma. **Instituto Nacional do Câncer (INCA)**, 2020. Disponível em < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em 14 de outubro de 2020.

CAO, S. et al. Microneedles mediated bioinspired lipid nanocarriers for targeted treatment of alopecia. **Journal of Controlled Release**, v. 329, n. November 2020, p. 1–15, 2021.

CARITA, A. C. et al. Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 606–635, 2018.

Cirurgia Micrográfica de Mohs. **Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD)**, 2020. Disponível em: < <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/procedimentos/cirurgia-micrografica-de-mohs/25/>>. Acesso em 14 de outubro de 2020.

CHACKO, I. A. et al. Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, n. July, p. 111262, 2020.

CHOUDHARY, V.; SHIVAKUMAR, H.; OJHA, H. Curcumin-loaded liposomes for wound healing: Preparation, optimization, in-vivo skin permeation and bioevaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, p. 683–691, 2019.

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.

COVIELLO, T. et al. Gel-embedded niosomes: Preparation, characterization and release studies of a new system for topical drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 291–299, 2015.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 1, p. 156–166, 2019.

DAR, M. J. et al. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis with novel amphotericin B-miltefosine co-incorporated second generation ultra-deformable liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, n. October 2019, p. 118900, 2020.

ELOY, J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

EWERT DE OLIVEIRA, B. et al. 5-Fluorouracil, innovative drug delivery systems to enhance bioavailability for topical use. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. July, 2020.

EYERICH, S. et al. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 4, p. 315–327, 2018.

FANG, J. Y. et al. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, n. 1–2, p. 61–72, 2001.

GUAN, Y. et al. Unraveling cancer lineage drivers in squamous cell carcinomas. **Pharmacology and Therapeutics**, p. 107448, 2019.

GUINEDI, A. S. et al. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, n. 1–2, p. 71–82, 2005.

GÜNGÖR, S.; KAHRAMAN, E. Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 105638, 2020.

HANDALI, S. et al. New folate receptor targeted nano liposomes for delivery of 5-fluorouracil to cancer cells: Strong implication for enhanced potency and safety. **Life Sciences**, v. 227, n. March, p. 39–50, 2019.

HAO, Y. et al. Near-infrared responsive 5-fluorouracil and indocyanine green loaded MPEG-PCL nanoparticle integrated with dissolvable microneedle for skin cancer therapy. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 3, p. 542–552, 2020.

HOGUE, L.; HARVEY, V. M. Basal Cell Carcinoma, Squamous Cell Carcinoma, and Cutaneous Melanoma in Skin of Color Patients. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 4, p. 519–526, 2019.

JAIMES-LIZCANO, Y. A.; LAWSON, L. B.; PAPADOPOULOS, K. D. Oil-Frozen W1/O/W2 Double Emulsions for Dermal Biomacromolecular Delivery Containing Ethanol as Chemical Penetration Enhancer. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, p. 1398–1406, 2011.

JHA, A. K.; SONTHALIA, S. 5-Fluorouracil as an adjuvant therapy along with microneedling in vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. e75–e76, 2019.

JOSE, A. et al. Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 166–175, 2018.

JUNYAPRASERT, V. B. et al. Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 303–311, 2012.

KORNEK, T.; AUGUSTIN, M. Skin Cancer: Prevention. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 481, p. 28–31, 2013.

- KRISHNAN, V.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles for topical drug delivery: Potential for skin cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 87–108, 2020.
- KUMAR, A.; BHARTI, R.; AGARWAL, S. Microneedling with Dermaroller 192 needles along with 5-fluorouracil solution in the treatment of stable vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 3, p. e67–e69, 2019.
- LAKKADWALA, S.; SINGH, J. Dual Functionalized 5-Fluorouracil Liposomes as Highly Efficient Nanomedicine for Glioblastoma Treatment as Assessed in an In Vitro Brain Tumor Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 11, p. 2902–2913, 2018.
- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 12–21, 2013.
- LARRUCEA, E. et al. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 113–119, 2001.
- LEE, G. Y. et al. CORM-2-entrapped ultradeformable liposomes ameliorate acute skin inflammation in an ear edema model via effective CO delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 12, p. 2362–2373, 2020.
- LEITE, M. N. et al. Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 160, n. October 2020, 2021.
- LI, D. et al. Progress and perspective of microneedle system for anti-cancer drug delivery. **Biomaterials**, v. 264, n. May 2020, p. 120410, 2020.
- LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 640–653, 2019.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.
- LÓPEZ-CASTELLANO, A. et al. The influence of Span®20 on stratum corneum lipids in Langmuir monolayers: Comparison with Azone®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1–2, p. 245–253, 2000.
- LÓPEZ, A. et al. Comparative enhancer effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, n. 1–2, p. 133–140, 2000.
- LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.
- 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.

- MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C.; ALISTAIR, F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)**, v. 27, n. 3, p. 35–42, 2012.
- MIKESH, L. M. et al. Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 190–200, 2013.
- MOGHIMIPOUR, E. et al. Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5-fluorouracil. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. September 2017, p. 166–174, 2018a.
- MOGHIMIPOUR, E. et al. Transferrin targeted liposomal 5-fluorouracil induced apoptosis via mitochondria signaling pathway in cancer cells. **Life Sciences**, v. 194, n. October 2017, p. 104–110, 2018b.
- MONTANARI, J. et al. Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, n. 1–2, p. 183–194, 2007.
- MONTANARI, J. et al. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 3, p. 368–376, 2010.
- MORSE, L. G. et al. Treatment of Squamous Cell Carcinoma With Intralesional 5-Fluorouracil. **Dermatologic Surgery**, v. 29, n. 11, p. 1150–1153, 2003.
- NAGUIB, Y. W.; KUMAR, A.; CUI, Z. The effect of microneedles on the skin permeability and antitumor activity of topical 5-fluorouracil. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 94–99, 2014.
- NANCE, E. Careers in nanomedicine and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2019.
- O’SULLIVAN, D. E. et al. Indoor tanning and skin cancer in Canada: A meta-analysis and attributable burden estimation. **Cancer Epidemiology**, v. 59, n. January, p. 1–7, 2019.
- OLIVEIRA, R. R. L. DE; ALBUQUERQUE, D. A. C.; CRUZ, T. G. S. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications. 2012.
- PAOLINO, D. et al. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 233–242, 2008.
- PARK, S. N.; JO, N. R.; JEON, S. H. Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1481–1485, 2014.
- PEREIRA, T. A.; RAMOS, D. N.; LOPEZ, R. F. V. Hydrogel increases localized transport regions and skin permeability during low frequency ultrasound treatment. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–10, 2017.
- PERMANA, A. D. et al. Dissolving microneedle-mediated dermal delivery of itraconazole nanocrystals for improved treatment of cutaneous candidiasis. **European Journal of**

Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 154, n. July, p. 50–61, 2020.

PETRILLI, R. Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe : efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele. **Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências**, p. 151, 2016.

PETRILLI, R. et al. Cetuximab Immunoliposomes Enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 301–308, 2017.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. June, p. 151–162, 2018a.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. v. 283, n. June, p. 151–162, 2018b.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, n. June, p. 151–162, 2018c.

PETROPOULOS, G. P.; PANDAZARAS, C. N.; DAVIM, J. P. Surface texture characterization and evaluation related to machining. **Surface Integrity in Machining**, p. 37–66, 2010.

PLEGUEZUELOS-VILLA, M. et al. A novel ultradeformable liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 265–270, 2018.

RANA, K.; SHARMA, R.; PREET, S. Augmented therapeutic efficacy of 5-fluorouracil in conjunction with lantibiotic nisin against skin cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 520, n. 3, p. 551–559, 2019.

RATA, D. M. et al. Topical formulations containing aptamer-functionalized nanocapsules loaded with 5-fluorouracil - An innovative concept for the skin cancer therapy. **Materials Science & Engineering C**, v. 119, n. 11, p. 111591, 2020.

RUOZI, B. et al. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 12–22, 2007.

SABRI, A. H. et al. Intradermal and transdermal drug delivery using microneedles – Fabrication, performance evaluation and application to lymphatic delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, p. 195–215, 2020a.

SABRI, A. H. et al. Intradermal delivery of imiquimod using polymeric microneedles for basal cell carcinoma. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, n. May, p. 119808, 2020b.

SALA, M. et al. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018.

- SEN, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, M. Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, n. March, p. 9–22, 2019.
- SHARMA, S. et al. Recent advances in microneedle composites for biomedical applications: Advanced drug delivery technologies. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. March, p. 109717, 2019.
- SINGH, S. P. et al. NIR triggered liposome gold nanoparticles entrapping curcumin as in situ adjuvant for photothermal treatment of skin cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 375–382, 2018.
- SMITH, M. C. et al. Zeta potential : a case study of cationic , anionic , and neutral liposomes. p. 5779–5787, 2017.
- SOUTH, A. P. et al. NOTCH1 Mutations Occur Early during Cutaneous Squamous Cell Carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 10, p. 2630–2638, 2014.
- STRATI, F. et al. Non-ionic surfactants as innovative skin penetration enhancers: insight in the mechanism of interaction with simple 2D stratum corneum model system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 157, n. August 2020, 2021.
- TANG, H. et al. Theoretical description of transdermal transport of hydrophilic permeants: Application to low-frequency sonophoresis (Journal of Pharmaceutical Sciences (2001) 90, (545-568)). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, p. 3878, 2001.
- THOMAS, A. M. et al. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 2, p. 212–219, 2011.
- TOSATO, M. G. et al. Comparative study of transdermal drug delivery systems of resveratrol: High efficiency of deformable liposomes. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, n. August 2017, p. 356–364, 2018.
- TRAN, S. et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 1, 2017.
- TSENG, C. L. et al. Development of lattice-inserted 5-Fluorouracil-hydroxyapatite nanoparticles as a chemotherapeutic delivery system. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 30, n. 4, p. 388–397, 2015.
- WALDMAN, A.; SCHMULTS, C. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2019.
- WIKONKAL, N. M.; BRASH, D. E. Ultraviolet Radiation Induced Signature Mutations in Photocarcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 6–10, 1999.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012.

WOLFRAM, J.; FERRARI, M. Clinical cancer nanomedicine. **Nano Today**, v. 25, p. 85–98, 2019.

WRIGHT, K. D. et al. Phase i study of 5-fluorouracil in children and young adults with recurrent ependymoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 12, p. 1620–1627, 2015.

YAMASHITA, F. et al. Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, n. 2, p. 173–179, 1995.

YANG, B. et al. Bilayer dissolving microneedle array containing 5-fluorouracil and triamcinolone with biphasic release profile for hypertrophic scar therapy. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 8, p. 2400–2411, 2021.

YANG, D. et al. Microneedle-mediated Transdermal Drug Delivery for Treating Diverse Skin Diseases. **Acta biomaterialia**, n. xxxx, 2020.

ZHANG, N. et al. Skin Cancer Diagnosis Based on Optimized Convolutional Neural Network. **Artificial Intelligence in Medicine**, p. 101756, 2019.

ZHOU, W. et al. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 330–337, 2014.

.