



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARÍLIA EVELLYN DE SANTANA DIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DA β -LAPACHONA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
INCORPORADOS EM HIDROGEL**

Recife-PE

2017

MARÍLIA EVELLYN DE SANTANA DIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO E PERMEACÃO
CUTÂNEA DA β -LAPACHONA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
INCORPORADOS EM HIDROGEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle de Medicamentos

Orientador (a): Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Recife-PE

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

D541a Dias, Marília Evellyn de Santana.

Avaliação *in vitro* da cinética de liberação e permeação cutânea da β -lapachona encapsulada em lipossomas incorporados em hidrogel / Marília Evellyn de Santana Dias. – Recife: o autor, 2017.
80 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências.

1. Lipossomas. 2. Cromatografia. 3. Polímeros. 4. β -lapachona. 5. Cinética de liberação. I. Magalhães, Nereide Stela Santos. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 291)

MARÍLIA EVELLYN DE SANTANA DIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DA β -LAPACHONA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
INCORPORADOS EM HIDROGEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 22/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Leila Bastos Leal (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Danielle Cristine Almeida Silva de Santana (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife-PE

2017

À minha família, alicerce da minha vida e alegria dos meus dias!

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria pelo dom da vida e pela força através da qual eu acordo todos os dias em busca da minha felicidade.

À minha mãe Rosa Dias pelo amor incondicional e pelos ensinamentos que impulsionam meus dias.

A meu pai Divaldo Dias que com sua doçura e esperança me deu suporte nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs Marianne Dias e Milena Dias pelas horas de descontração e por todo o apoio e palavras de carinho. À minha sobrinha Júlia que mesmo tão pequenina me faz tão feliz!

Ao meu namorado Jaime Cabral pelo apoio e paciência. Eu te amo!

As minhas amigas de vida e de alma Janira, Renata, Shirliane, Suellen e Waleska. A felicidade fica mais perto e nosso caminho se torna mais fácil, quando temos pessoas assim em nossa vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela grande oportunidade e ensinamentos.

A todos os técnicos e funcionários do LIKA que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Dr. Anivaldo Pereira Duarte Júnior por sua grande colaboração nos ensaios *in vitro* e análises em HPLC, serei eternamente grata por sua ajuda.

À doutoranda Danielle Rocha, amiga que o mestrado me trouxe, pela companhia, contribuições e pelos momentos agradáveis.

Ao Dr. Humberto Xavier Júnior pela orientação e auxílio nos experimentos.

A doutoranda Sarah Palácio pelo incentivo, contribuições e palavras de apoio desde o tempo da iniciação científica até a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do SLC, Laís Macedo, Maria Clara Barros, Bárbara Nayane, Vanderval Oliveira, Cybelle Tavares e Daniel Charles pela companhia, carinho e pelas boas risadas de nosso convívio.

Às colegas do SLC, Rafaela, Isabella, Milena e Marcela pelas técnicas passadas e por torcerem por mim.

Aos colegas do PPGCF Isabelle, Maira e Elisson pela ajuda com o Microette.

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Lipossomas multilamelares (MLV's) são vesículas compostas por diversas bicamadas de fosfolípidios circundando um compartimento aquoso interno e gerando espaços aquosos interlamelares com potencial uso em medicamentos por via tópica. A β -lapachona (β -lap) é uma orto-naftoquinona com atividade promissora na cicatrização de lesões cutâneas, quando utilizada em baixas concentrações. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o perfil da cinética de liberação *in vitro* e permeação cutânea *ex vivo* da β -lap encapsulada em lipossomas multilamelares incorporados em hidrogel de biopolímero produzido pela *Zoogloea sp.* Lipossomas contendo β -lap (β -lap-lipo) foram incorporados em hidrogel de biopolímero (ZBP) e hidroxietilcelulose (HEC) a diferentes concentrações do fármaco (β -lap-lipo, β -lap/ZBP-HEC e β -lap-lipo/ZBP-HEC 15, 30 e 60 $\mu\text{g/g}$). A cinética de liberação *in vitro* da β -lap, utilizando membrana de acetato de celulose, e os estudos de permeação cutânea em pele de orelha de porco foram realizados em células de difusão vertical de Franz a partir das diferentes formulações (β -lap-lipo, β -lap/ZBP-HEC, β -lap-lipo/ZBP-HEC e β -lap-lipo/ZBP-HEC 15, 30 e 60 $\mu\text{g/g}$). Uma metodologia analítica de quantificação da β -lap por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV foi validada apresentando parâmetros de validação adequados. Os lipossomas (β -lap-lipo) apresentaram tamanho de vesículas de 1040 ± 20 nm, índice de polidispersão de $0,408 \pm 0,017$, potencial zeta de $-2,41 \pm 0,49$ mV e eficiência de encapsulação (EE%) de $97,58 \pm 1,65\%$. β -lap-lipo/ZBP-HEC mostrou um perfil de liberação mais controlado com relação a β -lap/ZBP-HEC e β -lap-lipo. Os dados da cinética foram ajustados pelo modelo de Higuchi apresentando velocidades de $5,498 \pm 0,485$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$ ($r^2=0,981$), $2,866 \pm 0,288$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$ ($r^2=0,965$) e $4,402 \pm 0,265$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$ ($r^2=0,939$) para β -lap-lipo, β -lap-lipo/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC, respectivamente. De acordo com o método analítico utilizado, os ensaios de permeação cutânea não permitiram detectar no meio receptor a presença de β -lap liberada a partir das formulações testadas. A formulação com uma concentração de β -lap de 60 $\mu\text{g/g}$ apresentou menor retenção cutânea em camadas mais profundas da pele. Desta forma, os resultados demonstram que a β -lap-lipo/ZBP-HEC60 constitui uma formulação de liberação controlada mais adequada a aplicações em lesões cutâneas para cicatrização.

Palavras-chave: Lipossomas. Cromatografia. Polímeros. β -lapachona. Cinética de liberação. Permeação cutânea.

ABSTRACT

Multilamellar liposomes (MLV's) are vesicles composed of several phospholipid bilayers surrounding an internal aqueous compartment and generating interlamellar aqueous spaces with potential use in topical medications. β -lapachone (β -lap) is an ortho-naphthoquinone with promising activity in the healing of cutaneous lesions when used in low concentrations. The present work aims to evaluate the *in vitro* release and permeation / penetration kinetics profile of β -lap encapsulated in multilamellar liposomes incorporated in biopolymer hydrogen produced by *Zoogloea* sp. Liposomes containing β -lap (β -lap-lipo) were incorporated into biopolymer hydrogel (ZBP) and hydroxyethylcellulose (HEC) at different concentrations of drug (β -lap lipo, β -lap / ZBP-Lipo / ZBP-HEC 15,30 and 60 $\mu\text{g} / \text{g}$). The kinetics of *in vitro* release of β -lap, using cellulose acetate membrane, skin permeation/penetration studies in ear skin were performed in Franz vertical diffusion cells from the different formulations (β -lap-lipo, β -lap / ZBP-HEC, β -lap lipo / ZBP-HEC and β -lap lipo / ZBP-HEC 15, 30 and 60 $\mu\text{g} / \text{g}$). An analytical methodology for quantification of β -lap in high performance liquid chromatography coupled to a UV-detector. Liposomes (β -lap-lipo) showed vesicles size of 1040 ± 20 nm, polydispersity index of $0,408 \pm 0,017$, zeta potential of -2.41 ± 0.49 mV and encapsulation efficiency (EE%) of $97,58 \pm 1.65$ %. All kinect data were adjusted by the Higuchi's model presenting k of $5.498 \pm 0.485 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{h}^{-0,5}$ ($r^2=0,981$), $2.866 \pm 0.288 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{h}^{-0,5}$ ($r^2 = 0.965$) e $4.402 \pm 0.265 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{h}^{-0,5}$ ($r^2 = 0.939$) for β -lap-lipo, β -lap-lipo/ZBP-HEC and β -lap/ZBP-HEC, respectively. According to the analytical method used, cutaneous permeation assays did not detect any receptor media in the presence of β -lap released from the formulations tested. The formulation with a concentration of 60 $\mu\text{g}/\text{g}$ showed lower cutaneous retention in deeper layers of the skin, thus the results demonstrate that β -lap-lipo/ZBP-HEC60 is a controlled release formulation more suitable for applications in cuts for healing.

Keywords: Liposomes. Chromatography. Polymers. β -lapachone. Kinetics of release. Skin permeation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Pele e seus estratos	18
Figura 2 -	Desenho esquemático da pele, das camadas que constituem a pele e as rotas de permeação cutânea.....	20
Figura 3 -	Estrutura química da β -lap	22
Figura 4 -	Diferentes tipos de lipossomas baseados no tamanho e lamelaridade. Porção da bicamada lipídica com uma multifuncional superfície para modificação	25
Figura 5 -	Células de difusão vertical do tipo Franz automatizadas.....	31
Figura 6 -	Desenho esquemático de uma célula de difusão vertical do tipo Franz	32
Figura 7 -	(a) Membranas de biopolímero e (b) hidrogel após trituração	38
Figura 8 -	Posicionamento da pele de orelha de porco na célula de difusão	49
Figura 9 -	β -lap-lipo após sonicação.....	51
Figura 10 -	Fotomicrografia da blenda polimérica (ZBP-HEC) (a) e fotomicrografia do β -lap-lipo/ZBP-HEC30 (b). Seta em vermelho mostra os lipossomas MLV's dispersos no gel	53
Figura 11 -	Cromatogramas obtidos de amostras de lipossoma branco (a), β -lap-lipo na concentração de 1 μ g/mL de β -lap (b), EC branco (c), EC contaminado com β -lap na concentração de 0,6 μ g/mL (d), EP+D branco (e) e EP+D contaminada com β -lap na concentração de 0,6 μ g/m	56
Figura 12 -	Curva analítica da β -lap no intervalo entre 0,2 μ g/mL e 2 μ g/mL	54
Figura 13 -	Cromatogramas obtidos através da curva analítica da β -lap no intervalo entre 0,2 μ g/mL e 2 μ g/mL.....	55
Figura 14 -	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da β -lap a partir de diferentes formulações. Estes valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 5).....	60
Figura 15 -	Avaliação da penetração cutânea em pele de orelha de porco para diferentes formulações e percentagem de β -lap quantificada em diferentes estratos da pele: estrato córneo (EC) e pele remanescente (epiderme e derme – EP+D). Os dados médios com letras diferentes são significativamente diferentes usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (p <0,01). Estes valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 5).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos lipossomas	24
Tabela 2 -	Obtenção das formulações para os ensaios <i>in vitro</i>	39
Tabela 3 -	Doseamento da β -lap nas formulações utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i>	40
Tabela 4 -	Pontos da curva analítica de β -lap e respectivas alíquotas de solução de trabalho e fase móvel.	42
Tabela 5 -	Volumes e concentrações β -lapachona contidos nas soluções metanólicas adicionadas às fitas adesivas contendo EC.	44
Tabela 6 -	Variações de $\pm 5\%$ em três parâmetros analíticos (temperatura, fluxo da fase móvel e proporção da fase móvel).	45
Tabela 7 -	Quantidades (μg) de β -lap inseridas no compartimento doador da célula de Franz	46
Tabela 8 -	Caracterização dos lipossomas obtidos	52
Tabela 9 -	Valores do pH das formulações com diferentes concentrações de β -lap	53
Tabela 10 -	Exatidão do método analítico para quantificação de β -lap estrato córneo e pele remanescente.....	57
Tabela 11 -	Precisão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) para quantificação de β -lap em estrato córneo (EC) e pele remanescente (EP+D).	57
Tabela 12 -	Robustez do método analítico para quantificação de β -lap	58
Tabela 13 -	Teor (%) de β -lap nas formulações utilizadas nos ensaios de liberação <i>in vitro</i>	58
Tabela 14 -	Teor (%) de β -lap nas formulações utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i>	58
Tabela 15 -	Diferenças estatísticas da liberação da β -lap entre as formulações avaliadas	61
Tabela 16 -	Coefficiente de determinação segundo o modelo de Higuchi, fluxo de liberação e t_{Lag} da β -lap a partir das formulações β -lap-lipo e β -lap/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC.....	62
Tabela 17 -	Permeação e penetração cutânea <i>ex vivo</i> da β -lap, a partir de diferentes formulações, através da pele intacta.....	63
Tabela 18 -	Teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey entre os grupos avaliados.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CH	Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DP	Desvio Padrão Relativo
EC	Estrato córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
EP+D	Epiderme + derme
FDA	Food and Drug Administration
HEC	Hidroxietilcelulose
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de quantificação
Min	Minuto
MLV's	Multilamelares
NaCl	Cloreto de sódio
PC	Fosfatidilcolina
PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RPM	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
ZBP	Biopolímero de <i>Zoogloea</i> sp.
β -lap	β -lapachona
β -lap-lipo	Lipossoma contendo β -lapachona
β -lap-lipo/ZBP-HEC	Lipossomas contendo β -lapachona incorporados em hidrogel

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
cm	Centímetro
Da	Dalton
g	Gramma
h	Hora
Hz	Hertz
J	Fluxo
m	Massa
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivolts
°C	Graus Celsius
RPM	Rotação por minuto
s	Segundo
T	Temperatura
v	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A PELE.....	18
2.1.1	A pele humana	18
2.1.1.1	Permeabilidade cutânea	20
2.1.2	A pele animal	21
2.2	β -LAPACHONA	22
2.3	LIPOSSOMAS	23
2.3.1	Aplicação tópica dos lipossomas	27
2.4	HIDROGÉIS	29
2.5	MODELOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>EX VIVO</i>	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS.....	34
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	34
4.3	MÉTODOS	35
4.3.1	Obtenção de lipossomas MLV's contendo β-lap (β-lap-lipo)	35
4.3.2	Caracterização dos lipossomas	36
4.3.2.1	Determinação do tamanho de partícula e PDI	36
4.3.2.2	Determinação do potencial Zeta	36
4.3.2.3	Determinação do teor	36
4.3.2.4	Determinação da eficiência de encapsulação (EE)	37
4.3.3	Obtenção da blenda polimérica	37
4.3.3.1	Obtenção do hidrogel (ZBP).....	37
4.3.3.2	Obtenção da blenda polimérica (ZBP-HEC).....	38
4.3.4	Incorporação do β-lap-lipo na blenda polimérica	38

4.3.4.1	Determinação do pH das formulações.....	39
4.3.4.2	Microscopia óptica da blenda polimérica ZBP-HEC e do β -lap-lipo/ZBP-HEC30	39
4.3.4.3	Doseamento de β -lap formulações.....	39
4.3.5	Metodologia analítica para quantificação da β-lap	40
4.3.6	Validação do método analítico para extração e quantificação da β-lap em lipossomas e em matriz biológica	41
4.3.6.1	Seletividade	41
4.3.6.2	Linearidade	42
4.3.6.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	42
4.3.6.4	Exatidão	42
4.3.6.5	Precisão.....	43
4.3.6.6	Robustez	44
4.3.7	Liberação <i>in vitro</i> da β-lap	44
4.3.7.1	Montagem das células de Franz.....	44
4.3.7.2	Quantificação das amostras	45
4.3.7.3	Análise da liberação <i>in vitro</i> da β -lap.....	46
4.3.8	Permeação cutânea <i>ex vivo</i> da β-lap	47
4.3.8.1	Preparo das peles de orelha de porco.....	47
4.3.8.2	Avaliação da permeação cutânea <i>ex vivo</i> da β -lap.....	48
4.3.9	Análises estatísticas.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	50
5.2	pH DAS FORMULAÇÕES.....	51
5.3	MICROSCOPIA ÓPTICA DA BLENDAS POLIMÉRICAS ZBP-HEC E DO β -lap-lipo/ZBP-HEC30.....	52
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	52
5.4.1	Seletividade.....	52
5.4.2	Linearidade	54
5.4.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	55
5.4.4	Exatidão	55
5.4.5	Precisão	56
5.4.6	Robustez.....	57
5.5	DOSEAMENTO DAS FORMULAÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES <i>IN VITRO</i>	57

5.6	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA β -lap	58
5.7	PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA da β -lap	62
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo fornecendo uma grande área de superfície para aplicação de fármacos. A administração transdérmica de fármacos tem muitas vantagens em relação a outras vias de administração. Estas incluem a prevenção do efeito de primeira passagem hepática, efeitos gastrointestinais indesejáveis, melhoria na adesão do paciente, entre outras. Várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar a permeação cutânea. Estas incluem o uso de agente promotores de permeação, otimização química do fármaco, o uso da iontoforese e a incorporação do fármaco em sistemas de liberação controlada e direcionada (MAGHRABY; WILLIAMS, 2009).

Diante deste contexto os sistemas de administração de fármacos vesiculares tais como lipossomas se destacam por proporcionar uma administração direcionada e segura de fármacos em concentração terapêutica, restringindo o acesso a áreas não-alvo e maximizando assim a eficácia (RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012).

Os lipossomas têm sido profundamente estudados desde a sua descoberta na década de 60 e continuam a constituir um campo de intensa pesquisa. Os lipossomas são valorizados pelas suas vantagens biológicas e tecnológicas além de serem considerados como sistema de carreamento de fármacos mais bem-sucedido conhecido até a presente data (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Os lipossomas são vesículas esféricas, biocompatíveis, formados por uma membrana composta por uma bicamada de fosfolipídio e colesterol e uma cavidade aquosa interna. Os lipossomas podem ser classificados de acordo com seu tamanho, número de bicamadas e sua composição (KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007; RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012).

As vantagens dos lipossomas incluem a promoção de uma maior solubilidade dos fármacos, a prevenção da degradação química e biológica sob condições diversas de armazenamento e durante a administração, a redução dos efeitos secundários não específicos e da toxicidade de fármacos melhorando a sua eficácia e índice terapêutico (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Devido a essas características os lipossomas podem exercer diferentes funções após aplicação tópica. Entre elas é válido destacar a deposição dos lipossomas nas camadas da pele reduzindo a absorção sistêmica e assim minimizando os efeitos colaterais (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A β -lapachona é um derivado natural do lapachol, presente em pequenas quantidades na casca da árvore *Tabebuia spp* (Bignoniaceae). A β -lapachona pertence a classe das

ortonaftoquinonas obtido em larga escala através da semi-síntese do lapachol (MATA-SANTOS et al., 2015; TSENG et al., 2013). β -lapachona apresenta diversas atividades biológicas entre elas a cicatrização de feridas (KUNG et al., 2008; FU et al., 2011). Entretanto é uma molécula pouco solúvel em água (0,038 mg /ml) e fotoinstável limitando a sua ampla aplicação terapêutica (CUNHA-FILHO; MARTINEZ-PACHECO; LANDIN, 2013). Dessa forma sua incorporação em um sistema de liberação controlada como os lipossomas é altamente viável, tornando-a candidata a se tornar um fármaco administrado pela via tópica.

As formas farmacêuticas semissólidas são os principais veículos de escolha para administração tópica de fármacos. As características que justificam isto são que quando em contato com a pele apresentam boa espalhabilidade, permanecendo aderidos a pele até serem removidos por transpiração ou agentes externos. Com o avanço no entendimento das propriedades e fatores que controlam a permeação de fármacos, das propriedades físico-químicas dos excipientes em uma formulação, exige-se produtos dermatológicos físicos, químicos e biologicamente mais estáveis e com eficácia melhorada (MIERS, 2015).

A bactéria *Zoogloea* sp. produz um polissacarídeo extracelular celulósico a partir do melão de cana-de-açúcar. Este biopolímero é capaz de formar uma matriz gelatinosa, com características de hidrogel (PATERSON-BEEDLE et al., 2000). Biopolímero oriundo da *Zoogloea* sp. (ZBP) tem sido utilizado para muitas aplicações biológicas entre elas a cicatrização de feridas. Estudos têm demonstrado que o filme de polissacarídeo celulósico de *Zoogloea* sp. Pode reduzir o tempo de cicatrização e controlar a infecção local, sendo uma terapia adjuvante eficaz para o tratamento de feridas (DE LUCENA et al., 2015).

Portanto este trabalho propõe avaliar a cinética de liberação *in vitro* e realizar estudos de permeação cutânea *ex vivo*, através da pele da orelha de porco, da β -lapachona (β -lap) encapsulada em lipossomas multilamelares (MLV's) e incorporados em uma blenda polimérica composta por um biopolímero natural oriundo da bactéria *Zoogloea* sp. (ZBP) e um polímero sintético, a hidroxietilcelulose (HEC).

2 REVISÃO DE LITERATURA

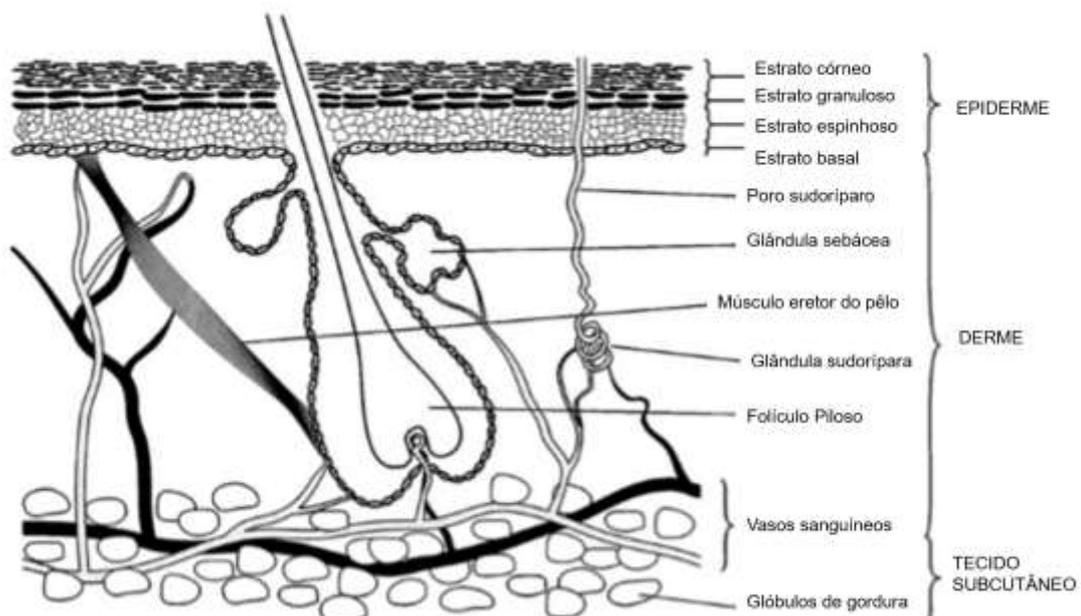
2.1 A PELE

A pele é o mais extenso órgão do corpo humano, aproximadamente 10% da massa corporal, e o único que interage intimamente com o ambiente externo. Muitas das funções da pele, como proteção e manutenção da homeostase, podem ser classificadas como essenciais para a sobrevivência humana (WALTERS, 2002). O pH da pele está entre 5,5 e 7. Esse valor varia de acordo com a região do corpo, sendo mantido por um sistema tampão de ácido láctico/lactato pelos ácidos do suor, sebo e elementos ácidos da queratina (PRISTA et al., 2003).

2.1.1 A pele humana

A pele humana possui origem ectodérmica (por exemplo, queratinócitos e melanócitos) e mesodérmica (leucócitos e fibroblastos e vasos). A pele regula a temperatura corporal e o equilíbrio dos fluidos, atua no metabolismo (síntese de vitamina D) e serve como barreira contra infecções e injúrias (SPELLBERG, 2000). Este órgão apresenta três camadas: a epiderme (tecido epitelial), a derme (tecido conjuntivo) e a hipoderme (tecido adiposo) (Figura 1).

Figura 1 – Pele e seus estratos.



Fonte: Adaptado (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008)

Na epiderme, a camada mais superficial é o estrato ou camada córnea. Mais abaixo se encontram as camadas granulosa, espinhosa e basal. (DANGELO & FATTINI, 2005).

A epiderme não possui vasos sanguíneos e a manutenção de sua vitalidade se dá pela difusão de nutrientes e resíduos através da junção dérmico-epidérmica. É formada por cinco camadas, que são: o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (EC). Uma vez que as células do EC estão mortas, a epiderme sem EC é normalmente denominada epiderme viável (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

O estrato córneo (EC) representa a principal barreira física da pele limitando a permeação de substâncias e a difusão de água para fora da pele. Sua estrutura, corneócitos ricos em queratina que estão embutidos na matriz intercelular rica em lipídios, forma uma estrutura frequentemente denominada de “tijolos e argamassa” (PROW et al., 2011). Devido a sua estrutura há uma dificuldade na entrada de fármacos aplicados topicamente, com exceção dos que são lipossolúveis e de baixo peso molecular. Isto representa um desafio significativo para a administração de medicamentos através desta via (PRAUSNITZ et al., 2008).

A derme é composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um mucopolissacarídeo, o ácido hialurônico, que forma o componente de gel da matriz. O ácido hialurônico é composto por glicosaminoglicano e carrega uma forte carga negativa devido aos seus numerosos grupos laterais hidroxila e carboxila. Sangue e vasos linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas também estão presentes. (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; SPELLBERG, 2000). A hipoderme é a camada mais interna da pele, sendo composta principalmente por adipócitos. As principais funções desta camada são proteção mecânica e isolamento térmico (SILVA, 2016).

A pele apresenta inúmeras vantagens em relação a outras vias convencionais tais como administração oral e injeções intravenosas e subcutâneas, pois são em grande parte menos invasivas, amplamente aceitas pelos pacientes e não requerem formação especializada para a sua administração (BOAKYE; PATEL; SINGH, 2008). Além disso, a pele como via de administração tópica, tem um elevado potencial na terapêutica porque exhibe uma grande área superficial e permite liberação controlada de substâncias ativas. Evita-se com isto uma grande variação na concentração plasmática do ativo com conseqüente diminuição da quantidade de administrações e também do efeito de primeira passagem hepática, melhorando a biodisponibilidade do fármaco (ZHAI; ZHAI, 2014).

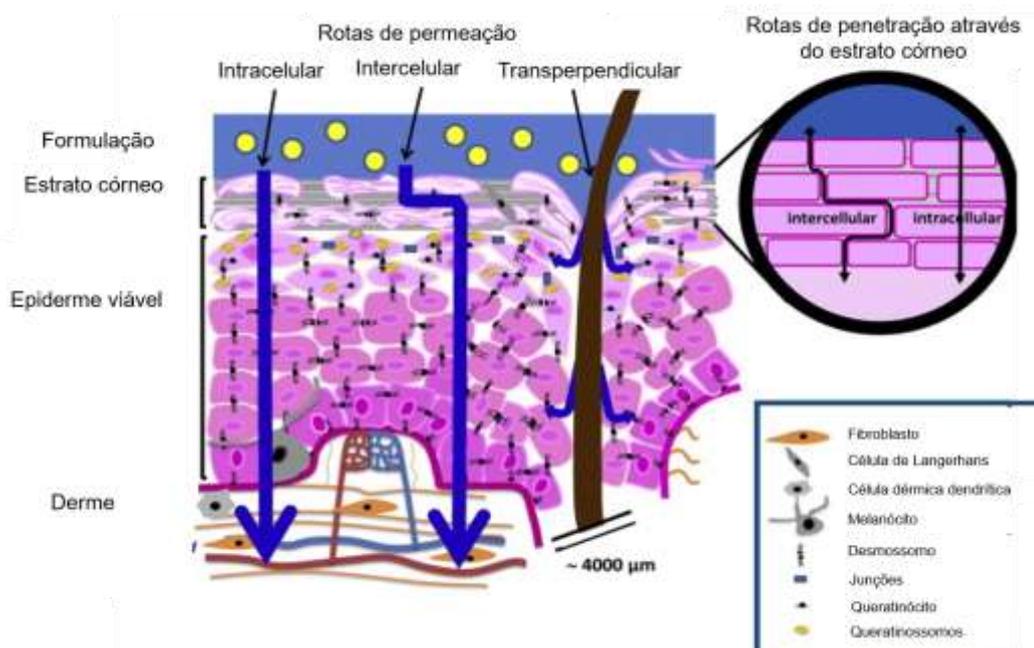
2.1.1.1 Permeabilidade cutânea

A eficácia dos fármacos aplicados topicamente é, muitas vezes, limitada pela sua baixa capacidade de penetração na pele. Existem muitos métodos para melhorar a administração cutânea de fármacos que se baseiam na utilização de substâncias químicas que intensificam a penetração cutânea, sistemas de liberação controlada de fármacos ou estratégias físicas tais como a iontoforese (MOSER et al., 2001).

Observa-se que a passagem de fármacos através da pele pode ser dividida em três etapas: a) penetração, que corresponde a entrada de uma substância para uma camada específica da pele, b) permeação, a penetração de uma camada para a outra, e, c) absorção, quando o fármaco atinge o sistema vascular (BOLZINGER et al., 2012).

A permeação do fármaco através da pele inclui a difusão deste através da epiderme intacta e através dos apêndices da pele, ou seja, folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Em contrapartida a penetração do fármaco é normalmente limitada pelo estrato córneo. Os possíveis mecanismos de permeação de um fármaco através da pele são o transcelular (entre dos lipídios do EC), intercelular (através dos lipídios do EC) e transperpendicular (através das glândulas e folículos) (MOSER et al., 2011; SILVA et al., 2010). A Figura 2 apresenta um esquema da pele (epiderme e derme) com as possíveis rotas de permeação cutânea.

Figura 2 - Desenho esquemático da pele, das camadas que constituem a pele e as rotas de permeação cutânea.



Fonte: Adaptado (BOLZINGER, 2012)

2.1.2 A pele animal

Os estudos de permeação cutânea de fármacos desempenham um papel fundamental na seleção de sistemas candidatos a administração dérmica ou transdérmica de ativos. Esta avaliação é geralmente realizada em células de difusão cujos compartimentos doador e receptor são separados por uma membrana. A pele humana, excisada de cirurgias ou obtida de cadáveres, é a membrana de escolha, porém espécimes de tamanho e qualidade suficientes para os estudos de penetração não são facilmente acessíveis à maioria dos pesquisadores. Com isso, modelos animais, utilizando pele excisada de ratos, coelhos e porcos, para estudos de permeação cutânea são investigados e amplamente utilizados, apesar das diferenças existentes entre a pele animal e a pele humana em vários níveis. (CILURZO; MINGHETTI; SINICO, 2007; SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001).

A pele excisada da orelha do porco é um modelo bem aceito e prontamente disponível para estes estudos e é frequentemente utilizado para avaliar a penetração de formulações farmacêuticas tópicas. A espessura da epiderme, a composição lipídica, as características morfológicas e fisiológicas e a permeabilidade da membrana a diversos compostos, tornou a pele de orelha de porco cada vez mais utilizada em aplicações *ex vivo* (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; SONGKRO et al., 2003).

Estudos relatam que a espessura do estrato córneo, e alguns parâmetros como a difusividade e o coeficiente de permeabilidade da água através da pele do porco *in vitro* e da pele humana *in vivo* são correlacionáveis (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002). Além disso a pele de porco é facilmente obtida a partir de matadouros e suas propriedades bioquímicas e histológicas foram repetidamente demonstradas como semelhantes à pele humana (GODIN; TOUITOU, 2007).

A pele a ser utilizada em modelos de penetração cutânea *in vitro* pode ser fresca ou congelada. A preparação da pele envolve vários processos. A pele obtida por tais processos pode se apresentar como: pele íntegra (*full thickness*), epiderme separada por calor ou estrato córneo isolado. A pele íntegra é obtida pela separação da mesma do tecido subcutâneo e a espessura apresentada após a remoção tem correlação com a penetração e/ou permeação do fármaco na pele (HEARD; SCREEN, 2008; FRIEND, 1992).

A permeação de fármacos através das rotas disponíveis pode ser aumentada através de três mecanismos: aumento da difusão do fármaco através da pele, aumento da solubilidade do fármaco na pele e aumento do grau de saturação do fármaco na formulação (MOSER et al., 2001). O estrato córneo é a principal barreira à penetração na pele de diversos fármacos. Dessa

forma aplica-se a primeira Lei de Fick (Equação 1) para descrever o processo de difusão do fármaco nesta camada (WALTERS, 2002):

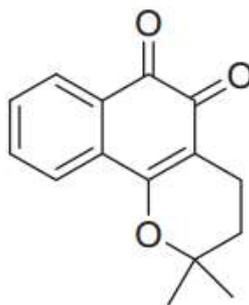
$$J = \frac{D_m C_{s,m}}{L} \times \frac{C_v}{C_{s,v}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde J é o fluxo de fármaco através do estrato córneo, D_m é o coeficiente de difusão do fármaco, $C_{s,m}$ é a solubilidade do fármaco, L é a espessura da membrana (pele), C_v é a concentração de fármaco dissolvido no veículo e $C_{s,v}$ é a solubilidade do fármaco no veículo. Sendo assim pode-se afirmar que o fluxo de fármaco através da pele, J , aumenta com o aumento do coeficiente de difusão do fármaco na barreira (D_m), com a solubilidade do fármaco na barreira ($C_{s,m}$), o aumento de concentração de fármaco no veículo (C_v) ou ainda com o decréscimo da sua solubilidade no veículo ($C_{s,v}$) (MARTINS; VEIGA, 2002).

2.2 β -LAPACHONA

A β -lapachona é uma orto-naftoquinona (Figura 3), um derivado natural do lapachol, presente em pequenas quantidades na casca da árvore *Tabebuia sp* (Bignoniaceae). A β -lapachona é sintetizada em larga escala pelo tratamento com ácido sulfúrico do lapachol e possui uma ampla gama de atividades biológicas (MATA-SANTOS et al., 2015; TSENG et al., 2013).

Figura 3 – Estrutura química da β -lapachona.



Fonte: TSENG et al. (2013)

A β -lapachona é considerada uma molécula promissora por exibir atividades biológicas importantes tais como as antiesquistosomais (AIRES et al., 2014), antifúngica (BRILHANTE et al., 2016), antimicrobiana (CAVALCANTI et al., 2015), antineoplásica (LI et al., 2014),

antiinflamatória (TSENG et al., 2013; SITONIO et al., 2013) e na cicatrização de feridas (KUNG et al., 2008; FU et al., 2011).

Esta molécula possui características físico-químicas interessantes para permeação e penetração através da pele tais como seu baixo peso molecular (242,3 Da) e adequado log de P (2,5) (MORENO et al., 2015). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a eficácia da β -lapachona como promotor da cicatrização de feridas (KUNG et al., 2008; FU et al., 2011).

Fu et al. (2011) verificou a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo* que a β -lapachona possui a capacidade de acelerar a cicatrização de queimaduras de segundo grau em ratos, aumentando a secreção de fatores de crescimento por macrófagos. Kung e colaboradores (2008) realizaram estudos *in vivo* e concluíram que a β -lapachona é um potencial agente na cicatrização de feridas por promover a proliferação e migração de células envolvidas no processo de cicatrização, acelerando a reparação tecidual.

Entretanto, a β -lapachona é pouco solúvel em água (0,038 mg /ml) e fotoinstável o que torna problemático seu uso pela via tópica (CUNHA-FILHO; MARTINEZ-PACHECO; LANDIN, 2013). Por estas razões a encapsulação desta molécula em sistemas de liberação controlada de fármacos é válida pois implica na localização seletiva e eficaz do ingrediente ativo além de restringir o seu acesso a áreas não alvo e conferir proteção a molécula.

2.3 LIPOSSOMAS

Um dos mais estudados sistemas em nanomedicina são os lipossomas. Descritos primeiramente nos anos 60 por Bangham (1965) e entendido como um sistema de liberação potencial de fármacos. No início dos anos 70, os lipossomas tornaram-se parte integrante da pesquisa e das aplicações no campo da nanomedicina. Durante quase cinco décadas de pesquisas ficaram evidenciados os potenciais benefícios médicos e cosméticos deste sistema. Várias moléculas ativas promissoras que anteriormente eram consideradas inúteis devido a problemas de estabilidade, solubilidade e toxicidade inespecífica, puderam ser entregues aos locais de ação pretendidos com a ajuda dos lipossomas (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

A palavra “lipossoma” é derivada do grego cujo prefixo “lipo” refere-se a sua constituição lipídica e “soma” remete a sua estrutura. Consiste em uma vesícula esférica com uma membrana composta por uma bicamada de fosfolipídio e colesterol e uma cavidade aquosa interna (KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007; RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012).

Os lipossomas são compostos de fosfolípidos de ocorrência natural e/ou sintéticos tais como a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina e fosfatidilglicerol. Uma das características mais importantes destes fosfolípidos é a temperatura de transição de fase (T_F). Os lípidos existem tanto num estado de fluido ($T > T_F$) como num estado de gel ($T < T_F$), dependendo temperatura em que se encontram. O estado fluido dos lípidios é mais permeável à água e pode ser explorado para encapsular fármacos durante a produção de lipossomas. Porém, na temperatura corporal (aproximadamente 37 °C), por exemplo, o seu estado fluido pode expulsar o fármaco aprisionado antes de atingir o local de ação. Assim, a escolha de fosfolípidos com estados de gel em condições fisiológicas é muitas vezes desejável para estabilizar lipossomas (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Para estabilizar a bicamada lipídica, o colesterol é geralmente adicionado às formulações lipossomais. A adição de colesterol em diferentes concentrações tem vários efeitos sobre a capacidade dos lipossomas de aprisionar e entregar um fármaco. O colesterol aumenta a rigidez das membranas no estado “cristal-líquido” e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel” (FRÉZARD et al., 2005).

Os lipossomas podem ser classificados de várias maneiras dependendo do seu tamanho, número de bicamadas e sua composição (Tabela 1).

Tabela – 1 Classificação dos lipossomas

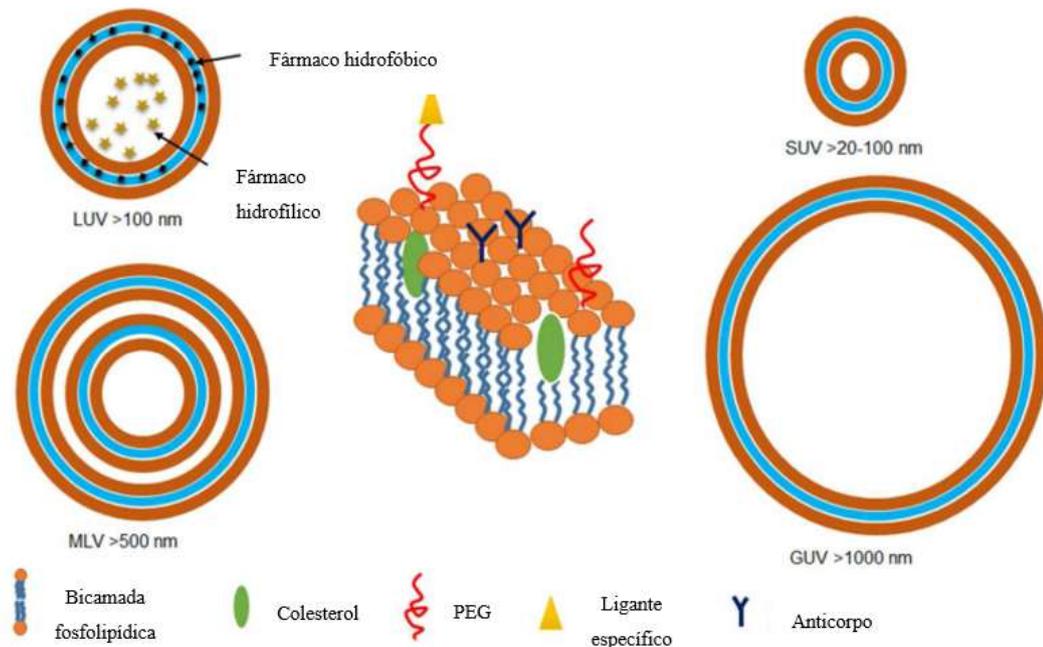
Lamellaridade e tamanho	Composição
Vesículas unilamelares pequenas (SUV); 20-100 nm	Lipossomas convencionais
Vesículas unilamelares grandes (LUV); > 100 nm	Lipossomas de longa circulação
Vesículas unilamelares gigantes (GUV); > 1000 nm	Lipossomas catiónicos
Vesículas oligolamelares (OLV); 100-1000 nm	Lipossomas estímulo-sensíveis (pH, temperatura)
Vesículas multilamelares (MLV); > 500nm	Imunolipossomas

Fonte: Adaptado (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015)

Essas diferentes características são importantes para selecionar uma via de administração adequada bem como para avaliar o destino farmacocinético após sua administração. A natureza anfifílica dos fosfolípidios resulta em conchas polares quando em soluções aquosas (Figura 4) devido ao efeito com o meio aquoso circundante. Dessa forma os lipossomas são uma formação termodinamicamente favorável reforçada por ligações de

hidrogênio, forças de van der Waals e outras interações eletrostáticas (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Figura 4 – Diferentes tipos de lipossomas baseados no tamanho e lamelaridade. Porção da bicamada lipídica com uma multifuncional superfície para modificações.



Fonte: Adaptado (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015)

A quantidade de bicamadas influencia diretamente na capacidade de aprisionamento das moléculas ativas, na sua estabilidade física e nas condições de armazenamento. Além disso a composição lipídica, o tamanho, carga superficial dos lipossomas e a solubilidade do fármaco afetam a estabilidade e os perfis farmacocinéticos desses sistemas (PLESSIS et al., 1996; RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012).

Em geral, os métodos de preparação dos lipossomas incluem a hidratação de um fino filme lipídico, que pode ser efetuada com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa. Este filme é formado através da dissolução dos lipídios em solvente orgânico, seguido da evaporação do solvente. A última etapa consiste na sonicação ou extrusão para redução do tamanho das vesículas através de processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

Em consequência de suas propriedades biológicas os lipossomas possuem inúmeras aplicações clínicas. Eles possuem propriedades atraentes e o sucesso alcançado por muitas formulações têm alimentado investigações sobre seu uso. Algumas de suas propriedades são a

biocompatibilidade, a capacidade de veicular agentes farmacêuticos solúveis em água (hidrofílicos) no seu compartimento aquoso interno ou fármacos insolúveis em água (hidrofóbicos) na sua membrana, a proteção dos fármacos incorporados aos lipossomas contra o efeito inativador de condições externas e não causam reações secundárias indesejáveis, proporcionam o direcionamento de fármacos para células ou compartimentos celulares individuais e algumas propriedades como o tamanho e a carga de superfície dos lipossomas podem ser facilmente mudadas adicionando componentes à mistura lipídica antes da preparação dos lipossomas e/ou variação dos métodos de preparação (TORCHILLIN, 2005).

Dessa forma os lipossomas podem ser administrados por várias rotas, tais como oral, parenteral e através da pele, bem como podem ser utilizados para diversos fins médicos (TORCHILLIN, 2005). Dentre elas pode-se destacar as mais recentes como os aerossóis lipossômicos (NAHAR et al., 2016; RIVKIN et al., 2016), lipossomas para o sistema linfáticos (WANG et al., 2014; RYAN et al., 2013), lipossomas na terapia combinada (ELDAR-BOOCK et al., 2013; XU et al., 2015), vacinas (HANSON et al., 2015; ZHANG et al., 2014), lipossomas para diagnóstico por imagem (BEZIERE et al., 2015; PARK et al., 2014) e aplicações tópicas (DARAEI et al. 2014; ELNAGGAR et al., 2014). Esta última tem merecido destaque devido ao aumento do interesse por esta via de administração e a busca por novas técnicas para o melhoramento da absorção de fármacos através da pele (PIERRE; COSTA, 2011).

A utilização de lipossomas na encapsulação de moléculas para aplicação tópica tem sido reportada desde a década de 80 (MEZEI; GULASEKHARAM, 1980). Thirumaleshwar et al. (2012) verificaram que os lipossomas MLV's são importantes para promover uma maior deposição de fármacos na pele. De modo semelhante, Ciobanu et al. (2014) verificou que a utilização de lipossomas MLV's para o tratamento de cicatrização de feridas está relacionada com um melhor perfil de liberação do fármaco promovido por estas vesículas, devido à sua estabilidade melhorada proporcionada pelas múltiplas camadas, que possibilita uma liberação controlada do fármaco.

Portanto quando administrados por via tópica, as formulações contendo lipossomas demonstraram um aumento significativo na atividade do fármaco em detrimento da formulação não-lipossômica e, além disso, o uso de lipossomas em géis ou cremes ajuda a fixar ingredientes ativos nas camadas mais externas da pele como é desejado, por exemplo, para produtos cosméticos (RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012).

2.3.1 Aplicação tópica dos lipossomas

A pele, o maior órgão do corpo, oferece uma superfície facilmente acessível para administração de medicamentos, tornando-se um local atraente tanto pela via tópica quanto sistêmica de fármacos (ZHANG et al., 2016). Entretanto a pele é composta por uma barreira principal que está localizada em sua camada mais externa, o estrato córneo. O estrato córneo oferece resistência à penetração de moléculas ativas e é o passo limitante da taxa de absorção percutânea. (SHARMA; SHARMA, 1997; BOAKYE; PATEL; SINGH, 2015).

Assim os lipossomas podem exercer diferentes funções após aplicação tópica. Uma das principais funções é aumentar a deposição do fármaco nas camadas da pele onde objetivo é reduzir a absorção sistêmica e assim minimizar os efeitos colaterais. Em contrapartida os lipossomas podem possuir a capacidade de administração transdérmica, através dos apêndices da pele, isto é, aumentar a absorção sistêmica (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). As vantagens do uso tópico dos lipossomas são (KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007):

- Possuem estrutura semelhantes às membranas biológicas;
- Podem carrear substâncias solúveis em água e/ou lipofílicas;
- São biodegradáveis e não tóxicos;
- Possuem ação hidratante e restauradora dos lipídios constitutivos da pele;
- Podem atuar como depósitos de fármacos na pele e nos apêndices da pele, aumentando o índice terapêutico do fármaco no local alvo.

Uma das principais indicações dos lipossomas como carreadores de fármacos são os efeitos de oclusão da pele provocados pelo depósito do filme de fosfolipídio na superfície da pele levando a uma maior hidratação da mesma. Os lipossomas fornecem matéria-prima valiosa para a regeneração da pele por reabastecimento das moléculas lipídicas. Os lipídios do estrato córneo quando estão bem hidratados, mesmo na ausência de ingredientes ativos é, muitas vezes, suficiente para melhorar a elasticidade da pele e a função barreira (RAHIMPOUR; HAMISHEHKAR, 2012). Maghraby, Barry e Williams (2008), também observaram em seus estudos com estradiol carreado em lipossomas que a avaliação da permeação cutânea em condições oclusivas promovem uma maior hidratação e conseqüentemente um aumento do tamanho das células. Assim, esses fatores diminuiram o fluxo transepidermal de estradiol aumentando sua deposição nas camadas mais superficiais da pele.

Fresta e Puglisi (1996) demonstraram a potencialidade de se obter maiores reservatórios de fármaco no estrato córneo, na epiderme e na derme com lipossomas de composição similar

ao estrato córneo do que os lipossomas à base de outros fosfolipídios, e ainda mais do que formas de dosagem tópicas convencionais. De maneira semelhante Betz et al. (2005) fez um estudo comparativo entre formulações de lipossomas preparadas com fosfolipídios de diferentes origens (ovo e soja). Foi constatado que as formulações de lipossomas preparadas a partir de fosfolipídios de ovo apresentaram efeitos de hidratação significativamente mais elevados na pele humana em comparação com formulações de lipossomas preparadas a partir de fosfolipídios de soja.

Em relação a deposição de fármacos nos diversos estratos da pele Gillet et al. (2011a) observou que os lipossomas clássicos não permanecem intactos quando penetram nas camadas mais profundas da pele. Em seu estudo foi concluído que a betametasona (fármaco antiinflamatório utilizado como modelo) é primeiramente liberada das vesículas e logo após as moléculas do fármaco livre difundem-se através do estrato córneo e são particionadas nos estratos da pele. Em estudo recente, Boakye, Patel e Singh (2015) observaram que lipossomas clássicos não penetram profundamente a pele, mas permanecem confinado em suas camadas mais superiores.

Estas investigações acerca da deposição de fármacos nas diferentes camadas da pele são importantes, por exemplo, quando se trata da administração tópica dos lipossomas para tratamento de feridas. Quando há injúria ao tecido da pele o reparo ocorre em uma sequência de eventos que envolvem que envolve a inflamação, proliferação e migração de diferentes tipos de células. A medida que estes eventos ocorrem há a produção de uma matriz extracelular amorfa denominada matriz provisória. Esta matriz contribui para a formação de tecido de granulação, sendo um suporte para a migração e ativação de fibroblastos (JUDITH et al., 2010).

Com isso o efeito dos lipossomas neste processo de cicatrização pode ser visualizado nos estudos de Beukelman et al. (2008) onde um hidrogel lipossômico com polividona-iodo a 3% demonstrou efeito clínico benéfico em situações em que a inflamação e /ou espécies reativas de oxigênio impedem a cicatrização de feridas (por exemplo, queimaduras, feridas crônicas e fumantes). Em estudo recente Li et al. (2016) utilizou lipossomas contendo madecassoside (MA) para cicatrização no leito da ferida. Foi observado que a formulação de lipossomal foi aplicável e promissora por aumentar a liberação de MA no leito da ferida e melhorar o progresso da cicatrização. Além disso Ferreira et al. (2015) observou um aumento na quantidade de diclofenaco liberado a partir de lipossomas multilamelares para tratamento de lesões crônicas verificando a importância das características dos lipossomas para aplicação tópica. Em estudos semelhantes Shailesh e Kulkarni (2014) observaram que hidrogéis lipossômicos carregados

com mupirocina para feridas diabéticas possui propriedades benéficas em relação a liberação prolongada de fármacos.

Portanto observa-se que, para que a aplicação tópica de lipossomas seja eficaz, além das características intrínsecas dos lipossomas é essencial que as propriedades reológicas e/ou mucoadesivas da dispersão lipossomal sejam consideradas e ajustadas adequadamente, pois o comportamento reológico e a bioadesão das formulações auxiliam a prolongar a liberação do fármaco no local de aplicação, apresentando vantagens em termos de facilidade de aplicação (MOURTAS et al., 2008). Este ajuste pode ser realizado incorporando-se agentes gelificantes nas dispersões lipossomais, formando um complexo fármaco- lipossoma- gel (PAVELIC; SKALKO-BASNET; JALSENJAK, 2005).

2.4 HIDROGÉIS

A Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), define preparações tópicas semissólidas como específicas para aplicação na pele ou em certas mucosas para ação local ou penetração percutânea de fármacos, ou ainda por sua ação emoliente ou protetora. Assim, as formas farmacêuticas semissólidas são os principais veículos de escolha para administração tópica de fármacos. Quando em contato com a pele deva apresentar boa espalhabilidade, permanecendo aderidos a pele até serem removidos por transpiração ou agentes externos. Com o avanço no entendimento das propriedades da pele, dos fatores que controlam a permeação de fármacos, das propriedades físico-químicas dos excipientes em uma formulação, exige-se produtos dermatológicos físicos, químicos e biologicamente mais estáveis e com eficácia melhorada (MIERS, 2015).

Dentre as diversas apresentações semissólidas podem-se destacar os géis, que são preparações normalmente formadas por água, álcool ou mistura hidro alcóolica e um agente gelificante à base de derivados de celulose, polímeros polissacarídeos ou polímeros acrílicos (BRASIL, 2010).

Os hidrogéis são redes de polímeros tridimensionais com amplo uso tópico devido a sua biocompatibilidade e semelhança com os tecidos biológicos. Sistemas baseados em hidrogéis possuem a característica de intumescer as redes poliméricas quando em contato com soluções aquosas. À medida que a água penetra no interior da rede polimérica, a temperatura de transição vítrea do polímero diminui e o hidrogel torna-se elástico (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2006).

Muitos microrganismos têm a habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares ou excretados como polímeros solúveis ou insolúveis. A *Zoogloea sp.*, é uma bactéria gram-negativa capaz de produzir um polissacarídeo extracelular de elevado peso molecular que responsável por formar soluções viscosas e géis em meio aquoso mesmo em baixas concentrações. As membranas poliméricas produzidas por este microrganismo possuem características de hidrogéis. Este hidrogel pode ser obtido a partir do melão, um subproduto da produção de açúcar, e sua estrutura química consiste na polimerização estável de açúcares (COELHO JUNIOR et al., 2015).

Esse biopolímero pode ser aplicado para o desenvolvimento de formas farmacêuticas com a incorporação de fármacos, entre outras aplicações na área médica, devido a sua biocompatibilidade (NÉRIS, 2007; COELHO et al., 2002). Pita et al. (2015) avaliaram a biocompatibilidade e a reação de sensibilidade local ao hidrogel de celulose bacteriana implantado no tecido subcutâneo de coelhos. Os resultados obtidos demonstraram que o hidrogel bacteriano de celulose é biocompatível, integrando o tecido subcutâneo de coelhos e induzindo a remodelação tecidual.

Dentre as aplicações terapêuticas tópicas deste biopolímero destacam-se sua ação na cicatrização de feridas. Estudos demonstram que ele pode reduzir o tempo de cicatrização e controlar a infecção local, sendo uma terapia coadjuvante eficaz para o tratamento de feridas (COELHO et al., 2002). Da mesma forma, De Lucena et al. (2015) demonstraram que a película do biopolímero celulósico de ZBP tem a capacidade de integração e estimulação de tecidos endógenos responsáveis pelo reparo tecidual, bem como a produção de fibras de colágeno. Essa remodelação do tecido induzida acelerou o processo de cicatrização em modelos animais.

2.5 MODELOS DE PERMEACÃO CUTÂNEA *EX VIVO*

Os estudos de permeação cutânea podem ser realizados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo* fornecem informações farmacocinéticas, enquanto que os métodos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a permeação de fármacos na pele (OECD, 2004).

As análises *ex vivo* de permeação cutânea mais comuns envolvem o uso de células de difusão verticais de Franz (Figura 5). Uma quantidade conhecida de fármaco é colocada em uma formulação adequada e aplicada sobre a pele colocada no compartimento doador. Em intervalos regulares, volumes conhecidos de fluido receptor (do compartimento receptor), são

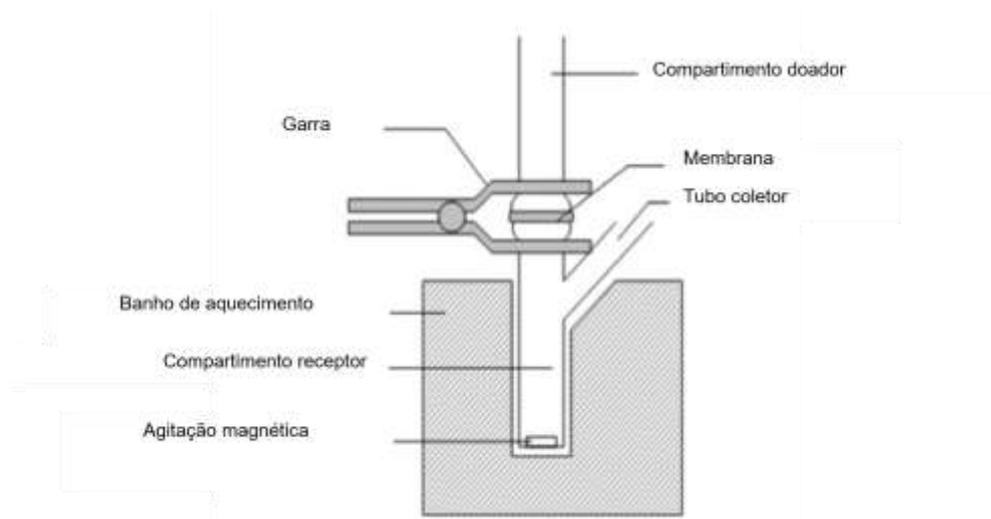
coletados e analisados para quantificação do fármaco, por métodos analíticos tais como CLAE, no teste de permeação cutânea (Figura 6). A etapa posterior é a separação das camadas da pele para saber, através de métodos de quantificação, qual a concentração do fármaco retido nelas (RAI et al., 2010).

Figura 5 – Células de difusão vertical do tipo Franz automatizadas.



Fonte: <https://hansonresearch.com/diffusion-testing/vision-microette>

Figura 6 – Desenho esquemático de uma célula de difusão vertical do tipo Franz.



Fonte: Adaptado (NG et al., 2010)

A técnica utilizada para quantificação do fármaco presente no estrato córneo é conhecida como *tape stripping*, que consiste na remoção progressiva do estrato córneo com o uso de fitas adesivas. A quantificação do fármaco a cada remoção pode determinar a difusão do mesmo através das camadas do estrato córneo (BRONAUGH; HOWARD; MAIBACH, 1999).

Neste contexto, a utilização de células de difusão de Franz evoluiu para uma metodologia de pesquisa, fornecendo *insights* importantes sobre as relações entre pele, fármaco e formulação. Além disso estes testes são extremamente úteis para a concepção e desenvolvimento de novas formulações, (NG et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o perfil cinético de liberação *in vitro* e permeação cutânea *ex vivo* da β -lapachona (β -lap) encapsulada em lipossomas multilamelares (MLV's) incorporados em blenda polimérica (ZBP-HEC) formada por um hidrogel de biopolímero produzido pela *Zoogloea sp.* (ZBP) e um polímero sintético, a hidroxietilcelulose (HEC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter lipossomas MLV's contendo β -lap (β -lap-lipo) e caracterizá-los de acordo com tamanho e distribuição das vesículas além da carga de superfície das vesículas;
- Incorporar os lipossomas obtidos em hidrogel formado por blenda polimérica (ZBP-HEC);
- Validar metodologia analítica por CLAE para quantificação da β -lap em lipossomas e em matriz biológica (pele de orelha de porco).
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* da β -lap em membrana de acetato de celulose utilizando célula de difusão de Franz;
- Avaliar a permeação cutânea *ex vivo* da β -lap em pele de orelha de porco a partir de formulações com diferentes concentrações de β -lap utilizando célula de difusão de Franz;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- A β -lapachona, obtida através da semi-síntese do lapachol, foi fornecida pelo Prof^o Dr. Alexandre Góes do Departamento de Antibióticos da UFPE (Recife, Brasil);
- As membranas de celulose, produzidas pela *Zoogloea sp.* (97,7%), fornecidas pela POLISA-Biopolímeros para a saúde LTDA (Carpina, Brazil);
- A hidroxietilcelulose (HEC), os conservantes metilparabeno e propilparabeno, e o propilenoglicol foram adquiridos de (Henrifarma®, São Paulo, Brasil).
- A fosfatidilcolina de soja (PC) foi obtida da Lipoïd (Ludwigshafen, Germany);
- O colesterol (CH) foi obtido da Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA).
- Metanol e acetonitrila grau HPLC obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e
- Fita adesiva 3M® (Sumaré, Brasil), modelo Durex® Transparente.

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Cromatógrafo líquido Waters ® (Miliford, EUA) modelo Alliance e 2625 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters® modelo 2998 (Miliford, EUA);
- Agitador mecânico de pás;
- Manta aquecedora para béquer de 250 mL Arsec Equipamentos para Laboratório (Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Placa agitadora magnética;
- Medidor de pH Hanna® modelo HI 2210 (Tamboré, Brasil);
- Centrifuga Kubota® modelo KR-20000T (Tokyo, Japão);
- Sonda de ultrassom Vibra Cell (Branson, USA);
- Banho de ultrassom Unique® (Indaiatuba, Brasil);
- Ultraturrax IKA® modelo T25 (Campinas, Brasil);
- Banho-maria ultratermostatizado Adamo modelo LM-80 (São Paulo, Brasil);
- Coluna C-18, de fase reversa, Waters® (Miliford, EUA) modelo XBridge™ com dimensões de 250mm de comprimento por 4,6mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130Å, tamanho de partícula de 3,5µm e área de superfície de 185 m²/g;

- Pré-coluna Waters® (Miliford, EUA), de 20 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130 Å, tamanho de partícula de 3,5 µm e área de superfície de 185 m²/g;
- Sistema de purificação de água Merck-Millipore® modelo Milli-Q® (Darmstadt, Alemanha);
- Balança analítica Shimadzu® modelo AY 220 (Kyoto, Japão);
- Filtros Merck-Millipore® (Darmstadt, Alemanha) modelo Mileyx-GV, constituídos de membrana composta por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro de 0,22 µm;
- Analisador de tamanho e potencial zeta Malvern® modelo Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra);
- Células de difusão vertical do tipo Franz acopladas ao sistema automatizado Hanson Vision® MICROETTE™ Plus (Chatsworth, EUA) e
- Membranas de acetato de celulose com molecular *weight cut-off* (MWCO) entre 12000 e 14000 Fisher Scientific® (Pittsburgh, EUA).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Obtenção de lipossomas MLV's contendo β-lap (β-lap-lipo)

Os lipossomas neutros multilamelares (234 mM) contendo β-lap na concentração de 1mg/mL foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico descrito por Lira et al. (2009), Cavalcanti et al. (2015). Os lipídios fosfatidilcolina de soja e colesterol na proporção 8:2 e o fármaco β-lap (0,005g) foram solubilizados em clorofórmio:metanol (3:1, v/v) sob agitação magnética. Em seguida, os solventes empregados foram removidos por secagem à pressão reduzida por 30min (37 ± 1 °C e 80 rpm), com o auxílio de um rotaevaporador.

O filme lipídico foi hidratado com 5 mL de tampão fosfato pH 7,4. A dispersão lipossomal obtida foi sonicada em sonda de ultrassom Vibra Cell (Branson, USA) em banho de gelo, por 10 segundos, a 200 W e 40 Hz para homogeneização do seu tamanho. Por fim, a dispersão foi armazenada, sob refrigeração, em frascos de vidro âmbar devidamente identificados para posterior caracterização.

4.3.2 Caracterização dos lipossomas

A dispersão lipossomal obtida (β -lap-lipo) foi caracterizada quanto ao seu tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação (EE).

4.3.2.1 Determinação do tamanho de partícula e PDI

O tamanho médio do β -lap-lipo foi determinado utilizando-se a técnica de detecção da intensidade de espalhamento de luz em ângulo de 90° em um equipamento Malvern® modelo Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra). Uma alíquota de 300 μ L da dispersão lipossomal foi diluída utilizando 700 μ L de água ultrapura Millipore® Mili-Q (Darmstadt, Alemanha). A análise do tamanho de partícula foi realizada à temperatura de 25 °C. Em cada leitura obteve-se o diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI). Os resultados obtidos correspondem a análise em triplicata de diferentes amostras.

4.3.2.2 Determinação do potencial Zeta

A determinação da carga de superfície (potencial zeta) dos β -lap-lipo foi realizada usando equipamento Malvern® modelo Zeta Sizer Nano S (Malvern, Inglaterra) à 25 °C. As amostras foram diluídas na razão de 1:10 para volume final de 1 mL de NaCl 10 mM. As leituras foram realizadas em triplicata.

4.3.2.3 Determinação do teor

Para determinação do teor de β -lap na dispersão lipossomal (fármaco total) uma alíquota de 50 μ L de β -lap-lipo foi transferida para balão um volumétrico cujo volume foi completado com 50 mL de metanol. Obteve-se uma concentração teórica de β -lap de 1 μ g/mL. A solução foi submetida a banho de ultrassom Unique® (Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos para romper a estrutura lamelar dos lipossomas e liberar a β -lap encapsulada. Em seguida, centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos em centrífuga Kubota® modelo KR-20000T (Tokyo, Japão). O sobrenadante foi retirado e filtrado em unidades filtrantes com poro de 0,22 μ m Merck-Millipore® (Darmstadt, Alemanha) modelo Millex-GV e analisado por metodologia CLAE descrita subseção 4.3.5. A concentração de β -lap na amostra foi determinada pela curva analítica descrita subseção 4.3.5. Os ensaios de doseamento foram realizados em triplicata.

4.3.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação da β -lap em lipossomas foi determinada pelo método indireto de ultrafiltração/centrifugação (CAVALCANTI et al., 2011). Assim, uma alíquota de 400 μ L de β -lap-lipo foi transferida para unidades filtrantes Ultrafree[®] (Millipore, EUA; *cut-off* = 10.000 Da) e submetido a centrifugação a 14.000rpm por uma hora. Uma alíquota de 20 μ L do filtrado foi diluída 50 vezes com metanol. A β -lap foi quantificada por metodologia CLAE descrita na subseção 4.3.5. Os dados da eficiência de encapsulação foram calculados por meio da razão entre a quantidade de β -lap não incorporada no lipossoma (β -lap_{livre}) e a quantidade de β -lap presente no lipossoma (β -lap_{total}) conforme Equação 2:

$$EE (\%) = \frac{[\beta\text{-lap}_{total}] - [\beta\text{-lap}_{livre}]}{[\beta\text{-lap}_{total}]} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.3.3 Obtenção da blenda polimérica

4.3.3.1 Obtenção do hidrogel (ZBP)

O hidrogel foi obtido como descrito por Palácio (2013). As membranas do biopolímero produzido pela *Zoogloea sp.* (Figura 7a) foram submetidas à agitação mecânica em Ultraturrax IKA[®] modelo T25 (Campinas, Brasil) a 5000 rpm por 10 minutos até a obtenção de um gel macroscopicamente homogêneo, com concentração final de polissacarídeo de aproximadamente 0,8% (m/v) de celulose (Figura 7b).

Figura 7: (a) Membranas de biopolímero e (b) hidrogel após trituração



Fonte: Acervo pessoal.

4.3.3.2 Obtenção da blenda polimérica (ZBP-HEC)

A blenda polimérica foi preparada primeiramente solubilizando os conservantes, metilparabeno e propilparabeno (0,2 % e 0,02 %, m/m, respectivamente) em propilenoglicol (10 %, m/v) sob agitação magnética. Posteriormente, adicionou-se a esta mistura o hidrogel (0,8 %, m/v) e a hidroxietilcelulose (1 %, m/m). A mistura permaneceu *overnight* à temperatura ambiente (25 °C) para a completa hidratação dos polímeros. Posteriormente, a blenda foi homogeneizada com auxílio de agitador mecânico de pás a 400 rpm por 15 minutos a 60 °C. A blenda polimérica formada foi armazenada em frascos de vidro previamente esterilizados e mantidos a temperatura ambiente até o uso. A blenda polimérica utilizada foi proposta por Palácio (2013). As características estruturais e morfológicas bem como a reologia dos hidrogéis utilizados permitiram a realização deste trabalho.

4.3.4 Incorporação do β -lap-lipo na blenda polimérica

Para obtenção dos lipossomas incorporados na blenda polimérica (β -lap-lipo/ZBP-HEC), a dispersão lipossomal foi misturada a blenda através da técnica de espatulação até obtenção de um gel uniforme. Ao final obtiveram-se diferentes formulações com diferentes concentrações de β -lap e razão lipídio/polímero (Tabela 2).

Tabela 2 - Obtenção das formulações para os ensaios *in vitro*.

Formulação	β -lap- ZBP-HEC (μ g /g)	Lipossoma (μ L)	ZBP-HEC (g)	Razão (lipídios/polímero)* (mg/g)
β -lap-lipo/ZBP-HEC15	15	150	10	2,5:1
β -lap-lipo/ZBP-HEC30	30	300	10	5,1:1
β -lap-lipo/ZBP-HEC60	60	600	10	10,2:1
β -lap-lipo/ZBP-HEC	100	1000	10	17:1

*Lipídios = PC+Chol; Polímeros = ZBP+HEC

4.3.4.1 Determinação do pH das formulações

O pH das formulações foi avaliado em potenciômetro digital com eletrodo de vidro pH Hanna® modelo HI 2210 (Tamboré, Brasil) a 25 °C.

4.3.4.2 Microscopia óptica da blenda polimérica ZBP-HEC e do β -lap-lipo/ZBP-HEC30

As fotomicrografias da formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC30 foram obtidas através de microscópio óptico (ZEISS IMAGER.M2M), com câmera acoplada (Axio CAM HRL), utilizando software (ZEN 2 PRO) na aquisição das imagens, sob um aumento de 400x, a fim de analisar a distribuição dos lipossomas na blenda polimérica (ZBP-HEC). Também foram obtidas microfotografias da blenda ZBP-HEC sem a incorporação dos lipossomas.

4.3.4.3 Doseamento de β -lap nas formulações

O doseamento das formulações foi realizado por metodologia CLAE. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 3. As dispersões foram solubilizadas com metanol obtendo-se volume final de 50 mL. Estas foram levadas a banho de ultrassom Unique® (Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos para quebra das vesículas e extravasamento da β -lap. Em seguida, foram centrifugadas em centrífuga Kubota® modelo KR-20000T (Tokyo, Japão) a 14.000 rpm por 10 minutos. Por fim, alíquotas do sobrenadante foram filtradas utilizando-se filtros de PVDF Merck-Millipore® modelo Millex-GV (Darmstadt, Alemanha) com poro de 0,22 μ m e a quantificação da β -lap foi realizada por meio de metodologia CLAE. As condições cromatográficas estão descritas na subseção 4.3.5.

Tabela 3 - Doseamento da β -lap nas formulações utilizadas nos ensaios *in vitro*.

Formulação	Alíquota	Diluição (mL)	Concentração final teórica (μ g/mL)
β -lap-lipo	50 μ L	50	1
β -lap/ZBP-HEC	0,5 g	50	1
β -lap-lipo/ZBP-HEC	0,5 g	50	1
β -lap-lipo/ZBP-HEC15	2,5 g	50	0,75
β -lap-lipo/ZBP-HEC30	1,25 g	50	0,75
β -lap-lipo/ZBP-HEC60	0,625 g	50	0,75

4.3.5 Metodologia analítica para quantificação da β -lap

A metodologia analítica para quantificação da β -lap incorporadas nas formulações e também presente em pele (epiderme e derme) de orelha de porco foi desenvolvida por meio de metodologia CLAE. Utilizou-se um sistema cromatográfico composto por um módulo separador Waters® (Miliford, EUA) modelo Alliance e2625 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) Waters® modelo 2998 (Miliford, EUA). O tratamento dos dados obtidos foi realizado no software Waters® Empower™ versão 2.0 (Miliford, EUA). A coluna cromatográfica utilizada foi uma C-18, de fase reversa, Waters® (Miliford, EUA) modelo XBridge™ com dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de poro de 130 Å, tamanho de partícula de 3,5 μ m e área de superfície de 185 m²/g. Utilizou-se também uma pré-coluna Waters® (Miliford, EUA), de 20mm de comprimento por 4,6mm de diâmetro interno, com as mesmas especificações da coluna.

As condições cromatográficas utilizadas para a obtenção da curva analítica, compreendida no intervalo de concentração de 0,2 a 2 μ g/mL, foram: fase móvel composta por metanol e solução aquosa de TFA a 0,05 % (70:30, v/v) eluída em modo isocrático com fluxo de 0,9 mL/min e sob temperatura de 37 °C, volume de injeção de amostra de 50 μ L e o comprimento de onda em 256 nm. Os pontos da curva analítica foram preparados a partir de uma solução de trabalho, com β -lap na concentração de 10 μ g/mL, obtida por meio da diluição de 250 μ L de uma solução estoque de β -lap a 400 μ g/mL com metanol em balão volumétrico de 25 mL. A solução estoque foi preparada a partir da dissolução de 10 mg de β -lap, pesada em balança analítica Shimadzu® modelo AY 220 (Kyoto, Japão), com metanol em balão volumétrico de 25 mL. As alíquotas da solução de trabalho foram retiradas e diluídas em quantidade suficiente de fase móvel para se obter as concentrações de 0,2 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,6 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 1,5 μ g/mL e 2,0 μ g/mL, totalizando 6 pontos.

As alíquotas de solução de trabalho e os volumes correspondentes de fase móvel utilizados para se obter as diluições referentes a cada ponto da curva analítica estão representados na Tabela 4. O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado através da análise dos cromatogramas obtidos de acordo com os seguintes parâmetros: fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de cauda.

Tabela 4 - Pontos da curva analítica de β -lap e respectivas alíquotas de solução de trabalho e fase móvel.

Ponto da curva analítica	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota da solução de trabalho ($10\mu\text{g/mL}$) (μL)	Volume de diluição da fase móvel (μL)
P ₁	0,2	20	980
P ₂	0,4	40	960
P ₃	0,6	60	940
P ₄	1,0	100	900
P ₅	1,5	150	850
P ₆	2,0	200	800

4.3.6 Validação do método analítico para extração e quantificação da β -lap nos lipossomas e em matriz biológica

A validação do método analítico foi realizada por meio dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (RIBEIRO et al., 2008; RIBANI et al., 2004). Os parâmetros analíticos destas etapas da validação foram realizados de acordo com o guia *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, publicado pela *International Conference on Harmonization (ICH)* e a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 DE julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que abordam a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BASHAW et al., 2014; BRASIL, 2017). Todas as etapas foram realizadas no mínimo em triplicata.

4.3.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada individualmente para interferentes oriundos de componentes da dispersão lipossomal, da blenda polimérica (ZBP-HEC) e da matriz biológica (pele de orelha de porco). Para este teste utilizou-se uma solução padrão de $1 \mu\text{g/mL}$ de β -lap. A seletividade foi avaliada por meio da comparação de cromatogramas de uma amostra (BRANCO) isenta de β -lap e das amostras adicionadas desta substância. Foi verificado a ocorrência de interferentes presentes nas amostras que possam ter eluído no mesmo tempo de retenção da β -lap. Os resultados foram avaliados considerando tempo de retenção (TR) e área do pico.

4.3.6.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade, três curvas de calibração diferentes foram preparadas. Cada curva de calibração foi obtida em seis níveis de concentrações de soluções de β -lap (0,2 a 2 $\mu\text{g/ml}$). As curvas de calibração foram ajustadas utilizando regressão linear dos mínimos quadrados. O método dos mínimos quadrados e a equação obtida da regressão linear correspondente à curva analítica forneceu os coeficientes de regressão a (linear - intercepto no eixo y) e b (angular).

4.3.6.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da Equação 3 e Equação 4, respectivamente. Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y médio das três curvas e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 4})$$

4.3.6.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo percentual de recuperação de quantidades conhecidas de β -lapachona adicionadas nas camadas da pele. Para avaliar a recuperação da β -lapachona nas amostras da pele foram colocados em uma superfície lisa fragmentos de pele de orelha de porco ($n = 3$) com o EC voltado para cima. O EC foi retirado de uma área delimitada da pele com o uso de 15 fitas adesivas (3M[®]) usando a técnica *tape stripping* (SHAH, 1998). As fitas contendo EC foram colocadas em tubos de extração e em seguida foram adicionados volumes conhecidos de solução de β -lapachona (Tabela 5) em metanol em três concentrações diferentes (0,2, 0,6 e 2 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 5 - Volumes e concentrações β -lapachona contidos nas soluções metanólicas adicionadas às fitas adesivas contendo EC.

Concentração teórica de β -lap ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota (μL)
0,2	50
0,6	150
2,0	500

Em seguida, evaporou-se o metanol e adicionaram-se 2,5 mL de fase móvel para extração da β -lap das fitas contendo EC. Logo após, agitaram-se os tubos em vórtex por cerca de 2 minutos e em seguida foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 10000 rpm e 4°C. Por fim, filtrou-se o sobrenadante e analisou-se por metodologia descrita na subseção 4.3.5.

Em seguida picotou-se a pele sem EC e transferiu-as para tubos de extração. A estes tubos adicionaram-se volumes conhecidos de solução de β -lap em metanol semelhante às utilizadas anteriormente. Evaporou-se o metanol, adicionaram-se 2,5 mL de fase móvel para extração da β -lapachona da pele, agitaram-se os tubos em vórtex por cerca de 2 minutos, em seguida foram submetidos a banho de ultrassom por 30 minutos. Centrifugaram-se os tubos durante 15 minutos a 10000 rpm e 4°C. Por fim, filtrou-se o sobrenadante e submeteu-o a quantificação. Os valores de recuperação (%) foram determinados pela Equação 6:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

4.3.6.5 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada em termos de três concentrações de β -lapachona (0,2, 0,6 e 2 $\mu\text{g/mL}$) usando três replicatas de cada. A precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes, usando amostras preparadas por diferentes analistas. A precisão do método analítico foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 5 onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

4.3.6.6 Robustez

A robustez foi realizada por meio de alterações deliberadas nos parâmetros cromatográficos. Variações de $\pm 5\%$ em três parâmetros analíticos (temperatura, fluxo da fase móvel e proporção da fase móvel) foram implementados (Tabela 6). A avaliação da robustez foi realizada por meio da injeção de amostras de β -lap na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$ e posterior determinação da concentração de β -lap por meio da área do sinal analítico obtido utilizando a equação da curva analítica. O desvio padrão e desvio padrão relativo também foram calculados. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 6- Variações de $\pm 5\%$ em três parâmetros analíticos (temperatura, fluxo da fase móvel e proporção da fase móvel).

Parâmetro analítico	Variáveis Independentes		
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	35,15	37	38,85
Fluxo da FM (mL/min)	0,855	0,9	0,945
Proporção da FM (v/v)	(66,5:33,5)	(70:30)	(73,5:26,5)

4.3.7 Liberação *in vitro* da β -lap

As formulações avaliadas nos ensaios de liberação *in vitro* da β -lap foram a dispersão lipossomal contendo β -lap (β -lap-lipo) e dispersão lipossomal incorporada em blenda polimérica (ZBP-HEC) na concentração de $100 \mu\text{g/g}$ (β -lap-lipo/ZBP-HEC). Além disso utilizou-se a β -lap livre incorporada na blenda polimérica (β -lap/ZBP-HEC) na concentração de $100 \mu\text{g/g}$.

4.3.7.1 Montagem das células de Franz

A cinética de liberação *in vitro* da β -lap foi realizada em células de difusão vertical do tipo Franz acopladas a um sistema automatizado Hanson Vision® MICROETTE™ Plus (Chatsworth, EUA). Foram utilizadas membranas de acetato de celulose com *molecular weight cut-off* (MWCO) de 10000Da FisherScientific® (Pittsburgh, EUA). As membranas foram hidratadas e recortadas (aproximadamente 3 cm^2) suficientemente para recobrir o

compartimento doador da célula de difusão. Glicerol, uma impureza comumente encontrada nas membranas (NG et al. 2010) foi removida através de lavagens sucessivas com água ultrapura fervente. Em seguida, as membranas foram mantidas submersas em água ultrapura e armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso. O meio receptor utilizado foi preparado a partir da dissolução de 0,5 % (m/v) de Tween® 80 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. As células de difusão foram preenchidas com meio receptor (aproximadamente 7mL) e as membranas de acetato de celulose foram dispostas no compartimento doador com área difusional de 1,86 cm². O sistema foi mantido sob agitação a 350 rpm e temperatura de 37 ± 0,5 °C. O ensaio foi realizado em quintuplicata. As formulações contendo β-lap foram adicionadas nas quantidades pré-estabelecidas (Tabela 7) no compartimento doador das células de difusão e espalhadas uniformemente sobre as membranas de acetato de celulose. Alíquotas de 1mL do compartimento receptor foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados: 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. O volume retirado para a coleta foi repostado imediatamente para a manutenção do volume constante nas células de difusão. As condições *sink* foram mantidas durante todo o experimento.

Tabela 7 – Quantidades (μg) de β-lap inseridas no compartimento doador da célula de Franz.

Formulação	Quantidade de formulação adicionada	Quantidade (μg) de β-lap
β-lap-lipo	50 μL	50
β-lap/ZBP-HEC	500 mg	50
β-lap-lipo/ZBP-HEC	500 mg	50
β-lap-lipo/ZBP-HEC15	500 mg	7,5
β-lap-lipo/ZBP-HEC30	500 mg	15
β-lap-lipo/ZBP-HEC60	500 mg	30

4.3.7.2 Quantificação das amostras

Para quantificar as concentrações de β-lap presentes no meio receptor, as alíquotas coletadas foram filtradas utilizando-se filtros de PVDF Merck-Millipore® (Darmstadt, Alemanha) modelo Millex-GV com poro de 0,22 μm e quantificadas por metodologia CLAE já descrita. Como um volume de 1 mL foi desprezado antes do início de cada coleta (*rinse*) e as

alíquotas da coleta e *rinse* foram repostas automaticamente, estes valores foram utilizados nos cálculos da quantidade real de β -lap presente no meio receptor. A Equação 06, demonstrada abaixo, foi utilizada para calcular a quantidade real de β -lap liberada (Q_{real}) em cada intervalo de tempo:

$$Q_{real} = C_t \times V_r + V_a \times \sum \times C_a \quad (\text{Equação 6})$$

onde Q_{real} é a quantidade acumulada no tempo t , C_t é a concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) no tempo t , V_r é o volume ocupado pelo meio receptor de cada célula (entre 6,45mL e 6,86mL), V_a é o volume de amostra retirado a cada coleta (1mL de *rinse* e 1mL de coleta) e C_a é a concentração de amostra removida nos tempos anteriores.

4.3.7.3 Análise da liberação *in vitro* da β -lap

O perfil de liberação da β -lap foi determinado graficamente através da relação entre a quantidade liberada acumulada de β -lap por área ($\mu\text{g/cm}^2$) pelo tempo (horas). A partir dos dados obtidos determinou-se qual modelo cinético mais adequado para a liberação *in vitro* da β -lap. Foram aplicados três modelos cinéticos distintos: ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

De acordo com Da Costa (2002) o modelo de cinética de liberação de ordem zero está representado pela Equação 7:

$$Q_t = Q_0 + K t \quad (\text{Equação 7})$$

Onde Q_t é a quantidade de β -lap liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de β -lap no meio receptor (zero) e K é a constante de liberação de ordem zero.

Em relação ao modelo de cinética de primeira ordem pode-se empregar a relação logarítmica da concentração de β -lap liberada em função do tempo e está representado pela Equação 8:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K t}{2,303} \quad (\text{Equação 8})$$

onde, Q_t é a quantidade de β -lap liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de β -lap no meio receptor (zero) e K é a constante de liberação de primeira ordem.

O modelo de cinética proposto por Higuchi (1963) permite relacionar a concentração de β -lap liberada em função da raiz quadrada do tempo (Equação 9):

$$Q_t = K \times \sqrt{t} \quad (\text{Equação 9})$$

onde, Q_t é a quantidade de β -lap liberada no tempo t e K é a constante de liberação de Higuchi.

A representação gráfica da liberação *in vitro* da β -lap nos três modelos avaliados está de acordo com o descrito abaixo:

- Ordem zero: concentração liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h);
- Primeira ordem: logaritmo da concentração liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h) e
- Higuchi: concentração liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus raiz do tempo (h).

O modelo que apresentou correlação linear, avaliada através do coeficiente de determinação (r^2), mais próximo de 1 foi determinado como o mais adequado para interpretar a liberação da β -lap *in vitro*.

4.3.8 Permeação cutânea *ex vivo* da β -lap

4.3.8.1 Preparo das peles de orelha de porco

As orelhas de porco foram obtidas em abatedouro localizado na cidade de Paulista/PE logo após o abate do animal e sem a imersão da mesma em água fervente (escalde). Foram lavadas com água corrente, sem a utilização de detergentes, para a remoção de resíduos sólidos. Em seguida o tecido cutâneo da parte posterior da orelha foi separado da cartilagem e a gordura subjacente foi retirada com auxílio de instrumentos cirúrgicos, assim como o excesso de pêlos. Por fim, a pele de porco foi cortada em formato circular (aproximadamente 3 cm de diâmetro), cobertas com filme plástico e papel alumínio e armazenadas em refrigerador sob temperatura de -20°C até o momento da realização dos experimentos que avaliaram a permeação cutânea da β -lap.

4.3.8.2 Avaliação da permeação cutânea *ex vivo* da β -lap

No ensaio de permeação e retenção cutânea *in vitro* da β -lap foram utilizadas cinco células de difusão vertical do tipo Franz acopladas ao sistema automatizado Hanson Vision® MICROETTE™ Plus (Chatsworth, EUA). O meio receptor foi composto por Tween® 80 a 0,5 % em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 à temperatura de 32 °C (\pm 1) com agitação magnética constante a 350 rpm. As peles, previamente tratadas e armazenadas, foram descongeladas cerca de uma hora antes do início do experimento. Em seguida, as peles foram posicionadas nas células de difusão (previamente preenchidas com meio receptor) com estrato córneo voltado para cima (Figura 8).

Figura 8 – Posicionamento da pele da orelha de porco na célula de difusão.



Fonte: Acervo pessoal.

As formulações β -lap-lipo, β -lap-lipo/ZBP-HEC15, β -lap-lipo/ZBP-HEC30, β -lap-lipo/ZBP-HEC60 foram adicionadas em quantidades pré-estabelecidas (50 μ L da formulação β -lap-lipo e 500 mg das demais formulações) sobre as peles montadas nas células de difusão e distribuídas uniformemente sobre uma área correspondente à 1,86 cm². Em tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 4, 8 e 12 horas) 1 mL do meio receptor foi coletado de cada célula e repostado imediatamente com meio receptor fresco para a manutenção da condição *sink*. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

Para a avaliação da permeação cutânea as amostras do meio receptor obtidas nos tempos pré-determinados foram filtradas em filtros de PVDF modelo Milex-GV Merck-Millipore® (Darmstadt, Alemanha) com poro de 0,22 μ m e acondicionadas em vials. A quantificação da β -lap foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia já descrita anteriormente.

Para a avaliação da retenção cutânea da β -lap utilizaram-se as mesmas peles do ensaio de permeação. Após 12 horas de experimento, as peles foram retiradas das células de difusão, lavadas com água ultrapura, secas com papel macio para remoção do excesso de formulação e dispostas, com a face contendo o EC voltada para cima, em um suporte de superfície lisa e limpa. A área que ficou em contato com a formulação foi delimitada com o auxílio de fitas adesivas coloridas e o EC foi removido utilizando-se a técnica de *tape stripping* através de 15 fitas adesivas 3M® (Sumaré, Brasil), modelo Durex® Transparente. As fitas após o *tape stripping* foram inseridas em tubos plásticos com tampa para posterior extração da β -lap. A pele remanescente (EP+D) foi recortada na área em que a formulação esteve em contato (1,86cm²) e em seguida também inseridas em tubos plásticos com tampa para posterior extração da β -lap.

A β -lap foi extraída das amostras de EC e pele remanescente por meio da adição de 5 mL de fase móvel, constituída por uma solução de metanol:solução aquosa de TFA a 0,05% (v/v). Os tubos de extração foram sonicados em banho de ultrassom por 30 minutos, agitados em vórtex por 1 minuto, centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos e, por último, filtrados em filtros 0,22 μ m de PVDF (Merck-Millipore®, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas foram acondicionadas em vials e a quantificação da β -lap foi realizada por CLAE. Os resultados obtidos foram expressos graficamente em relação a concentração acumulada de β -lap (%) encontrada no EC, pele remanescente (EP+D) e meio receptor após 12 horas de experimento.

4.3.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão e adotou-se um nível de significância de 5 % ($p < 0.05$). As comparações entre as médias da liberação *in vitro* e a avaliação da retenção cutânea foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. O software Origin® versão 8.5 (Northampton, EUA) foi utilizado para obtenção dos dados estatísticos e gráficos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Neste estudo, a β -lap foi utilizada com o objetivo de auxiliar no processo cicatrização da feridas (KUNG et al., 2008; FU et al., 2011). Por possuir baixa solubilidade em água e fotoinstabilidade (CUNHA-FILHO; MARTINEZ-PACHECO; LANDIN, 2013) a β -lap foi carregada em vesículas fosfolipídicas, os lipossomas, sistemas adequados para a veiculação de ativos com pouca solubilidade em água. Os lipossomas possuem estrutura semelhante à membrana celular por possuir hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade, além disso proporcionam liberação lenta do ativo, reduzindo a toxicidade e melhorando a biodisponibilidade do fármaco (NUNES et al., 2016).

A dispersão lipossomal (β -lap-lipo) foi submetida a caracterização quanto ao seu tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação (EE%).

A determinação do tamanho e polidispersividade das vesículas fornecem uma ferramenta importante pois essa característica é crítica dependendo da via de administração. A determinação da EE é importante para estimar a concentração do fármaco presente na formulação. O potencial zeta estima a estabilidade dos lipossomas no meio em que ele está presente. Lipossomas podem apresentar em sua superfície uma carga negativa, positiva ou não apresentar carga dependendo da sua composição e ligantes associados na superfície (PATTONI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Os resultados obtidos mostram que o diâmetro médio dos lipossomas obtidos foi de 1040 ± 20 nm e índice de polidispersão (PDI) $< 0,5$. Como esperado, as vesículas não possuem carga superficial ($-2,41 \pm 0,49$ mV), uma vez que os lípidos utilizados para a sua preparação (fosfatidilcolina de soja e colesterol) não são lípidos carregados. O pH da dispersão lipossomal foi 7,4. A dispersão lipossomal também mostrou uma alta eficiência de encapsulação ($97,58 \pm 1,65$ %).

Os resultados obtidos corroboram com estudos de Ciobanu et al. (2014) onde o autor avalia a influência do tamanho do lipossoma e das características do hidrogel onde ele está disperso na cinética de liberação de calceína (fármaco modelo). O tamanho médio encontrado para os lipossomas MLV's de calceína foi e $1266 \pm 23,7$ nm, semelhante ao encontrado neste trabalho. O autor indica também que estas vesículas multilamelares conferem estabilidade a

molécula. Em estudo semelhante Hurler et al. (2013) desenvolveram lipossomas multilamelares com tamanho médio de 920 nm para aplicação na cicatrização de feridas.

A Tabela 8 mostra em resumo os resultados obtidos para caracterização dos lipossomas obtidos.

Tabela 8 – Caracterização dos lipossomas obtidos.

Parâmetro	Resultado*
Tamanho de Partícula (nm)	1040 ± 2 0
PDI	0,408 ± 0,017
Potencial Zeta (mV)	-2,41 ± 0,49
EE (%)	97,58 ± 1,65

*Resultado expresso como a média (n=3) ± desvio padrão.

5.2 pH DAS FORMULAÇÕES

O pH das formulações utilizadas na avaliação *in vitro* da permeação cutânea foi adequado para aplicação tópica estando na faixa de 6,6 a 7,2 conforme demonstrado na Tabela 9. Isto evidencia que este parâmetro não foi afetado significativamente com a incorporação do lipossoma (β -lap-lipo) na blenda polimérica (ZBP-HEC). A pele apresenta um pH que varia de 4,6 a 5,8 (levemente ácido). Isto contribui para sua proteção bactericida e fungicida (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). O pH ideal de uma formulação tópica é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância biológica para produtos cutâneos (5,5 a 8,0) (SILVA et al., 2009). O pH tem fundamental importância no leito da ferida que varia de neutro a alcalino e desempenha um papel fundamental na cicatrização de feridas (PERCIVAL et al., 2014).

Tabela 9 – Valores do pH das formulações com diferentes concentrações de β -lap.

Formulação	pH
β -lap/ZBP-HEC	6,8 ± 0.04
β -lap-lipo/ZBP-HEC	6,9 ± 0.02
β -lap-lipo/ZBP-HEC15	6.6 ± 0.04
β -lap-lipo/ZBP-HEC30	7.0 ± 0.02
β -lap-lipo/ZBP-HEC60	7.2 ± 0.11

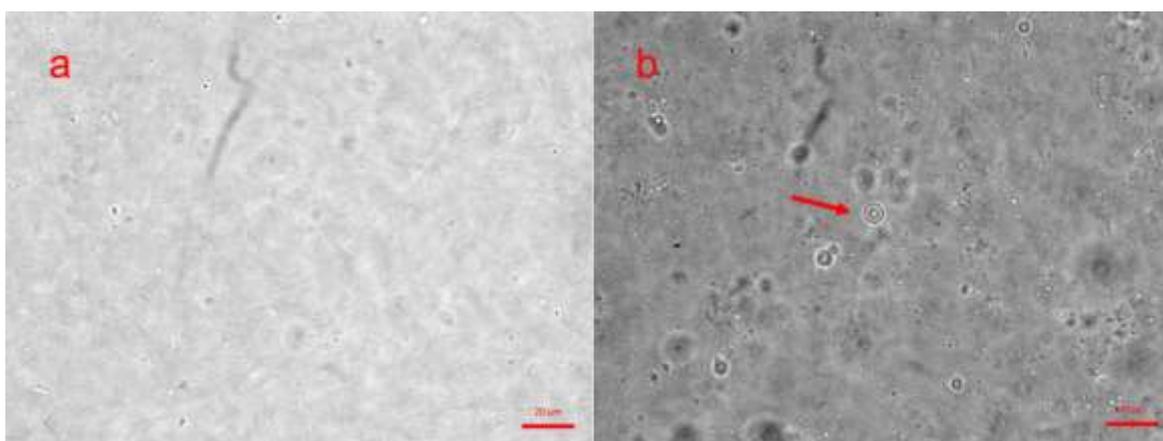
*Resultado expresso como a média (n=3) ± desvio padrão.

5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA DA BLENDA POLIMÉRICA ZBP-HEC E DO β -lap-lipo/ZBP-HEC30

A Figura 10a mostra a fotomicrografia da blenda polimérica ZBP-HEC e a Figura 10b mostra a fotomicrografia dos lipossomas (β -lap-lipo) incorporados na blenda polimérica (ZBP-HEC) na concentração de 30 μ g/g. Observa-se que os componentes do hidrogel não são capazes de desestabilizar as membranas dos lipossomas MLV's. Portanto verifica-se que a incorporação dos lipossomas no hidrogel não altera as características físicas dos lipossomas.

Resultado semelhante foi encontrado por Ciobanu et al. (2014) onde os autores encapsularam calceína (fármaco modelo) em lipossomas MLV's e dispersaram em hidrogéis poliméricos constituído por misturas de quitosana e gelatina. Foi demonstrado que a integridade dos lipossomas foi mantida através da presença dos mesmos no hidrogel após três semanas.

Figura 10 – Fotomicrografia da blenda polimérica (ZBP-HEC) (a) e fotomicrografia do β -lap-lipo/ZBP-HEC30 (b). Seta em vermelho mostra os lipossomas MLV's dispersos no gel



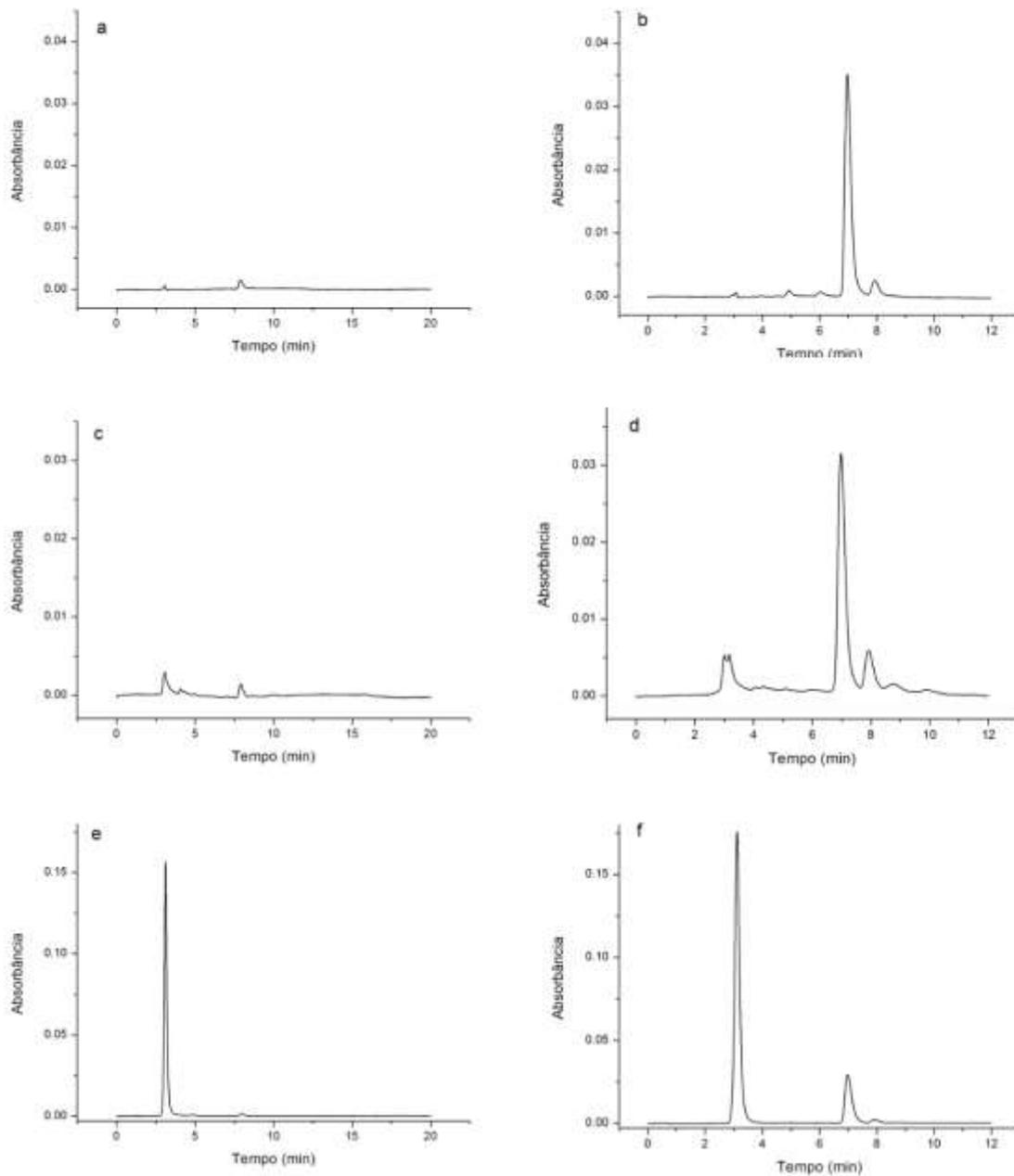
Fonte: Acervo pessoal.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.4.1 Seletividade

A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos de amostras de β -lap-lipo, EC e pele remanescente sem β -lap (BRANCO) e com β -lap. O tempo de retenção da β -lap foi de 7,0 min com absorção máxima em 256 nm. Os cromatogramas mostraram boa resolução e separação da β -lap de outros picos não ocorrendo interferência dos componentes do EC, pele remanescente (EP+D) ou da formulação. Portanto, o método validado mostrou-se seletivo e específico.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos de amostras de lipossoma sem o fármaco (branco) (a), β -lap-lipo na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de β -lap (b), EC (c), EC contaminado com β -lap na concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ (d), EP+D (e) e EP+D contaminada com β -lap na concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$.

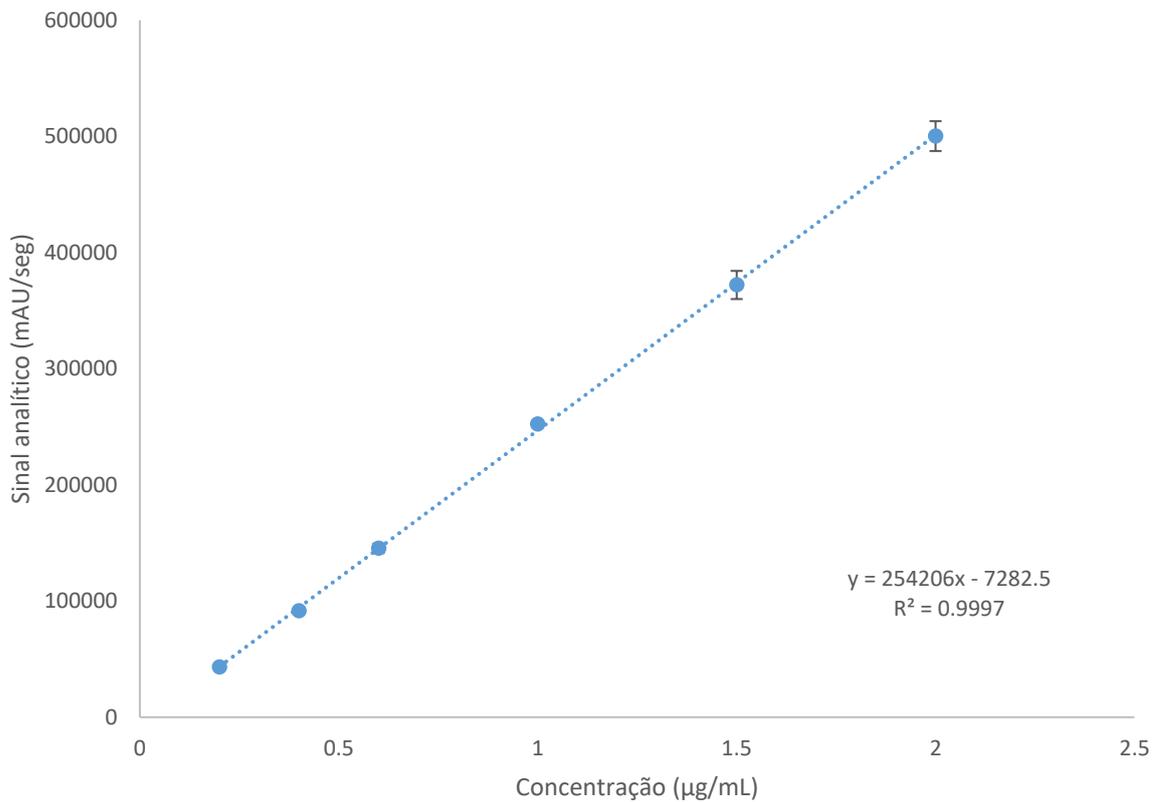


Fonte: Acervo pessoal.

5.4.2 Linearidade

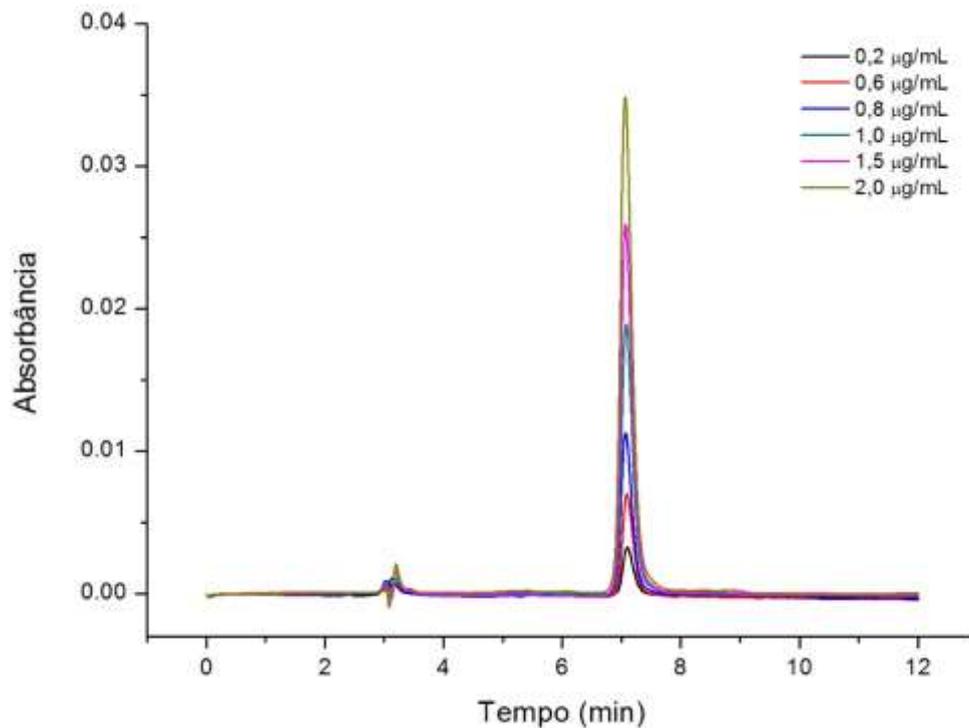
A curva analítica para quantificação da β -lap pode ser observada na Figura 12 e os cromatogramas da curva analítica no intervalo de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$ são apresentados na Figura 13. Pode-se verificar que o método é linear no intervalo de 0,2 a 2 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta obtida foi $y = 254206x - 7282,5$, com um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9997$. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Dessa forma, o valor de R^2 demonstra a linearidade do método desenvolvido para análise da β -lap por CLAE-UV. Através da análise de variância (ANOVA) foi testada a linearidade do método podendo-se afirmar no nível de 95% de confiança que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

Figura 12 - Curva analítica da β -lap no intervalo entre 0,2 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos através da curva analítica da β -lap no intervalo entre 0,2 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Acervo pessoal

5.4.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação da β -lap foram 0,049 $\mu\text{g/mL}$ e 0,162 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os limites obtidos são importantes para a detecção e quantificação de concentrações pequenas de β -lap encontradas na fase inicial da avaliação *in vitro* da liberação da mesma e também para identificar a presença, mesmo que em quantidades pequenas, de β -lap nos ensaios de permeação em pele de orelha de porco.

5.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada por meio de ensaios de recuperação. A recuperação da β -lap a partir do estrato córneo e pele remanescente pode ser visualizada na Tabela 10. O resultado médio foi de 102,20 % e 98,54 % para estrato córneo e pele remanescente, respectivamente. O desvio padrão relativo da média das determinações (triplicata) encontrou-se entre dentro dos limites aceitáveis para métodos bioanalíticos.

Tabela 10 –Exatidão do método analítico para quantificação de β -lap estrato córneo e pele remanescente.

Matriz	Concentração Teórica β -lap ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação	
		Média (%)	DPR (%)
Estrato córneo	0,2	100,10	1,06
	0,6	103,28	0,72
	2	103,21	1,28
Pele Remanescente	0,2	98,21	4,73
	0,6	99,74	2,16
	2	97,68	1,43

5.4.5 Precisão

Os resultados da avaliação da precisão do método podem ser observados na Tabela 11. A avaliação do desvio padrão relativo (DPR) da média das determinações apresentou resultados que se enquadram dentro dos limites aceitáveis de $\pm 5\%$ para métodos analíticos e $\pm 15\%$ para bioanalíticos, de acordo com a Resolução RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 11 – Precisão intradia (repetibilidade) e interdia (intermediária) para quantificação de β -lap em estrato córneo (EC) e pele remanescente (EP+D).

[Teórica] ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão intradia (repetibilidade)		Precisão interdia (intermediária)	
	[Experimental] ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	[Experimental] ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)
β-lap em FM				
0,2	0,200 \pm 0,004	2,06	0,195 \pm 0,006	3,16
0,6	0,591 \pm 0,007	1,23	0,594 \pm 0,009	1,58
2	2,047 \pm 0,008	0,39	2,028 \pm 0,065	3,24
EC				
0,2	0,200 \pm 0,002	1,06	0,201 \pm 0,003	1,48
0,6	0,620 \pm 0,004	0,72	0,633 \pm 0,021	3,35
2	2,066 \pm 0,026	1,28	2,079 \pm 0,030	1,46
EP+D				
0,2	0,206 \pm 0,009	4,51	0,199 \pm 0,008	4,23
0,6	0,618 \pm 0,013	2,10	0,618 \pm 0,013	2,10
2	2,033 \pm 0,028	1,38	2,059 \pm 0,037	1,78

*Resultado expresso como a média (n=3) \pm desvio padrão.

5.4.6 Robustez

A avaliação da robustez do método pode ser visualizada na Tabela 12. As medidas experimentais de concentração de β -lap apresentaram valor médio de $0,612 \mu\text{g/mL} \pm 0,021$ que corresponde a $101,94\%$ da concentração teórica ($0,6 \mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos indicam que a alteração deliberada nos parâmetros avaliados não alterou significativamente a área dos picos da β -lap confirmando assim a robustez do método de quantificação da β -lap.

Tabela 12 - Robustez do método analítico para quantificação de β -lap.

Parâmetro	Alterações avaliadas	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,855 mL/min	0,599	4,21
	0,945 mL/min	0,575	4,25
Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$)	35,1 $^{\circ}\text{C}$	0,623	0,24
	38,8 $^{\circ}\text{C}$	0,621	0,20
Proporção da FM (Metanol : TFA 0,05%, v/v)	(66,5:33,5)	0,627	5,42
	(73,5:26,5)	0,625	4,40

5.5 DOSEAMENTO DAS FORMULAÇÕES UTILIZADAS NA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E PERMEAÇÃO CUTÂNEA *EX VIVO*

A quantificação de β -lap nas formulações utilizadas na avaliação da liberação *in vitro* da β -lap (Tabela 13) e permeação cutânea *ex vivo* (Tabela 14) mostram que os teores de β -lap alcançados foram satisfatórios e dentro da faixa de 100 a aproximadamente 102% de β -lap nas formulações utilizadas.

Tabela 13 – Teor (%) de β -lap nas formulações utilizadas nos ensaios de liberação *in vitro*.

Formulação	Teor de β -lap (%) *
β -lap-lipo	$101,48 \pm 0,57$
β -lap/ZBP-HEC	$100,90 \pm 0,94$
β -lap-lipo/ZBP-HEC	$101,60 \pm 0,68$

*Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

Tabela 14 – Teor (%) de β -lap nas formulações utilizadas na avaliação da permeação cutânea *ex vivo*.

Formulação	Teor de β -lap (%) *
β -lap-lipo	101,42 \pm 0,34
β -lap/ZBP-HEC	102,61 \pm 1,35
β -lap-lipo/ZBP-HEC	102,88 \pm 1,66
β -lap-lipo/ZBP-HEC15	102,93 \pm 0,35
β -lap-lipo/ZBP-HEC30	102,39 \pm 1,42
β -lap-lipo/ZBP-HEC60	101,06 \pm 0,57

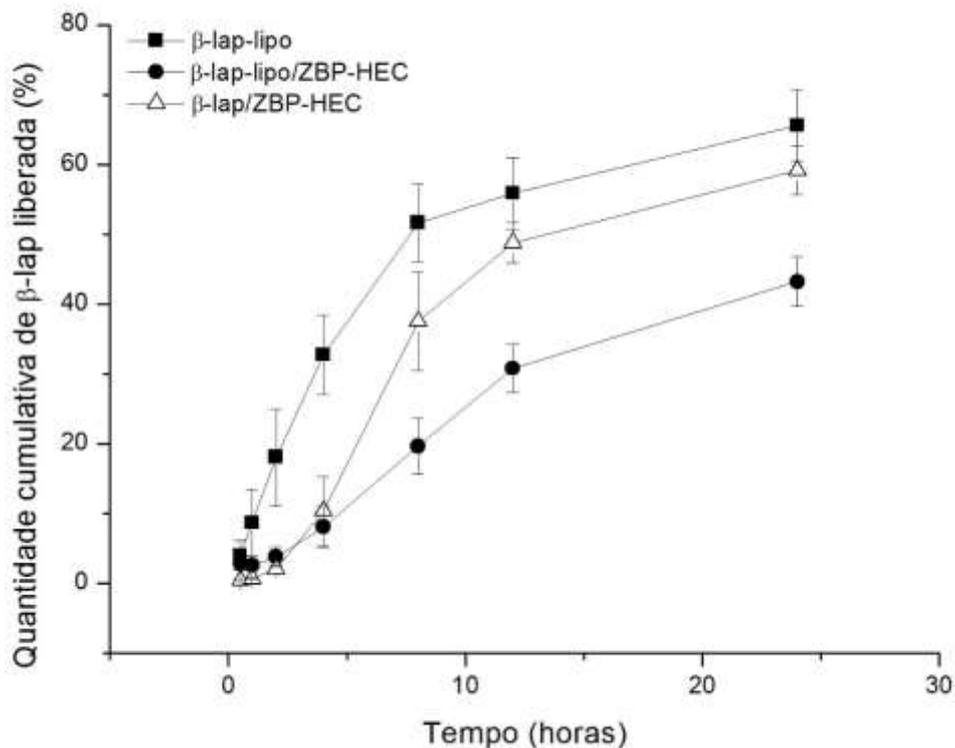
*Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

5.6 LIBERAÇÃO IN VITRO DA β -lap

As condições *sink* durante o ensaio de liberação *in vitro* da β -lap foram mantidas ao longo do experimento. Isto assegura que a difusão no sentido contrário não ocorra e que a solubilidade não seja fator limitante na taxa de liberação ou fluxo durante o experimento (OECD, 2004). Com o objetivo de aumentar a solubilidade da β -lap no meio receptor e assim assegurar a manutenção da condição *sink* durante o experimento utilizou-se o tampão fosfato 0,1M pH 7,4 acrescido de 0,5% (m/v) de Tween® 80. A solubilidade da β -lap neste sistema foi 82,25 μ g/mL \pm 0,48 a 32°C. Com isso garantiu-se a manutenção da concentração de β -lap abaixo de 10% da saturação do meio receptor e manutenção da condição *sink* durante todo o experimento. A coleta de 2 mL de meio receptor (1 mL de *rinse* e 1 mL de amostra), nos tempos predeterminados, foi suficiente para garantir a manutenção da concentração de β -lap abaixo de 10% da saturação do meio receptor e manter a condição *sink* durante todo o experimento.

A Figura 14 apresenta o perfil de liberação *in vitro* da β -lap a partir da dispersão lipossomal contendo β -lap (β -lap-lipo), da β -lap livre incorporada na blenda polimérica (β -lap/ZBP-HEC) e a dispersão lipossomal incorporada na blenda polimérica (β -lap-lipo/ZBP-HEC).

Figura 14 - Perfil de liberação *in vitro* da β -lap a partir de diferentes formulações. Estes valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 5).



Fonte: Acervo pessoal.

Como pode-se observar para a formulação β -lap-lipo ao longo de 8 horas 51,64% ($14,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) da concentração inicial da β -lap inserida no meio doador foi liberada. Quando comparada com a formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC que teve uma liberação de 19,69% ($5,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) observa-se que a utilização da blenda polimérica ZBP-HEC provocou uma diminuição de 2,6 vezes na velocidade de liberação da β -lap. A formulação contendo a β -lap livre no hidrogel (β -lap/ZBP-HEC) apresentou ao longo das 8 horas uma liberação de 37,55% ($10,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) correspondente a um perfil de liberação lento de forma semelhante a formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC.

A Tabela 15 apresenta a significância estatística (valor de p) da análise de variância (ANOVA) seguida pelo exame das diferenças entre as médias (teste t) efetuada sobre a quantidade acumulada de β -lap liberada em cada tempo de coleta (n=5) das diferentes formulações avaliadas (β -lap-lipo, β -lap-lipo/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC).

Tabela 15 - Diferença estatística da liberação de β -lap-lipo entre as formulações avaliadas.

Formulação	Significância estatística				
	0,5 h	1h	2 - 4h	8h	12- 24 h
β -lap-lipo e β -lap-lipo/ZBP-HEC	NS	*	****	****	****
β -lap-lipo e β -lap/ZBP-HEC	NS	**	****	****	*
β -lap-lipo/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC	NS	NS	NS	****	****

NS: Não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Dessa forma pode-se verificar que a formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC apresentou um perfil de liberação lenta e sem a ocorrência de liberação rápida inicial (*burst effect*). No tempo inicial de liberação de β -lap (0,5 h) não houve diferença significativa entre as formulações. Entretanto, a partir de 1 hora de liberação houve diferenças significativas entre as formulações β -lap-lipo e β -lap-lipo/ZBP-HEC. Isto mostra que a utilização da blenda polimérica como veículo para os lipossomas provocou diminuição estatisticamente significativa da liberação da β -lap.

O modelo de Higuchi apresentou coeficientes de correlação (r^2) mais próximos de 1 para a liberação β -lap a partir das formulações testadas. Assim as velocidades de liberação da β -lap a partir das formulações avaliadas foi feita através da construção de um gráfico da quantidade liberada de fármaco (%) em função da raiz quadrada do tempo (horas). O *slope* (coeficiente angular) da regressão linear desses dados representam a velocidade de liberação da β -lap (HIGUCHI, 1962). O *lag time* foi calculado através da extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo através da substituição do valor de y por 0 (zero) na equação da reta.

A Tabela 16 apresenta os coeficientes de correlação (r^2), a inclinação da curva, expressa em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{0,5}$, e o *lag time*, em horas, para a formulação β -lap-lipo, β -lap-lipo/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC, calculados a partir da inclinação da reta de regressão linear e o intercepto no eixo x do modelo de Higuchi. Este modelo proposto por Higuchi descreve a liberação de fármacos pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas (DA COSTA, 2002).

Tabela 16 - Coeficientes de determinação segundo o modelo de Higuchi, fluxo de liberação e t_{Lag} da β -lap a partir das formulações β -lap-lipo e β -lap/ZBP-HEC e β -lap/ZBP-HEC.

Formulação	r^2 Higuchi	Equação	k (($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)/ $\text{h}^{0,5}$)*	t_{Lag} (h)*
β -lap-lipo	0,981	$\beta\text{-lap}\% = 5,4981t^{0,5} - 2,6878$	$5,498 \pm 0,485$	$0,485 \pm 0,203$
β -lap-lipo/ZBP-HEC	0,965	$\beta\text{-lap}\% = 2,86574981t^{0,5} - 2,341$	$2,866 \pm 0,288$	$0,817 \pm 0,142$
β -lap/ZBP-HEC	0,939	$\beta\text{-lap}\% = 4,40194981t^{0,5} - 4,0914$	$4,02 \pm 0,265$	$0,93 \pm 0,094$

*Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3)

Os resultados obtidos demonstram que os processos de liberação de β -lap dos lipossomas e a sua difusão através do gel, são fatores determinantes e de importância para o perfil de liberação β -lap a partir de hidrogéis (BOAKYE; PATEL; SINGH, 2015; MOURTAS et al., 2007). Além desse parâmetro, Mourtas et al. (2006) descreveram que para fármacos lipofílicos os lipossomas atuam como reservatórios que liberam o fármaco rapidamente ou não (dependendo da solubilidade do fármaco e permeabilidade).

Em recente estudo Nunes et al. (2016) observaram a liberação *in vitro* do ácido úsnico encapsulado em lipossomas multilamelares e incorporados em membranas de gelatina para aplicação em cicatrização de lesões cutâneas utilizando modelo de pele de orelha de porco. A liberação foi avaliada em células de Franz e foi verificado que cerca de 38,70% ($16,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) do ácido úsnico contido em lipossomas e incorporados em gelatina foi liberado nas primeiras 4 horas do estudo. Os resultados deste estudo demonstram, de forma semelhante ao presente trabalho, que a liberação de fármacos lipofílicos pode ser controlada através da encapsulação destes em vesículas lipídicas e em matrizes poliméricas. De maneira semelhante aos resultados encontrados Ciobanu et al. (2014) mostraram que a liberação de calceína a partir de lipossomas MLV' s dispersos em hidrogéis controlam a liberação da substância ativa encapsulada de uma forma controlada durante períodos prolongados.

Pode-se verificar que a β -lap-carregada em lipossomas dispersos em hidrogéis encontra duas barreiras no processo de liberação: a própria membrana lipossômica e a matriz polimérica. Como resultado observa-se uma atenuação da liberação rápida inicial (*burst effect*) obtendo-se um melhor controle do processo de liberação da β -lap em comparação com este composto encapsulado em lipossomas ou apenas disperso na matriz do hidrogel.

5 PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO EX VIVO DA da β -lap

A retenção cutânea refere-se à entrada de uma substância em uma camada específica da pele enquanto que a permeação pode entendida como a penetração de uma camada para outra da pele (FLATEN et al., 2015). Nos testes de permeação e penetração cutânea a pele de orelha de porco foi utilizada devido a sua similaridade à pele humana quanto a aspectos como morfologia e permeabilidade (OECD, 2004). Assim nesta avaliação, para mimetizar as condições da temperatura da pele humana, a temperatura do sistema de difusão utilizado no experimento foi mantida em 32°C. Os dados obtidos na avaliação da penetração cutânea da β -lap a partir das diferentes formulações podem ser visualizados na Figura 15.

A permeação cutânea *ex vivo* da β -lap através da pele íntegra para o meio receptor da célula de Franz a partir das diferentes formulações foi abaixo do limite de detecção do método (0,049 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 17). Assim, a β -lap não foi detectada no meio receptor 12 horas após aplicação das formulações, ou seja, não ocorreu permeação significativa da β -lap através da pele.

Tabela 17 - Permeação e retenção cutânea *ex vivo* da β -lap, a partir de diferentes formulações, através da pele intacta.

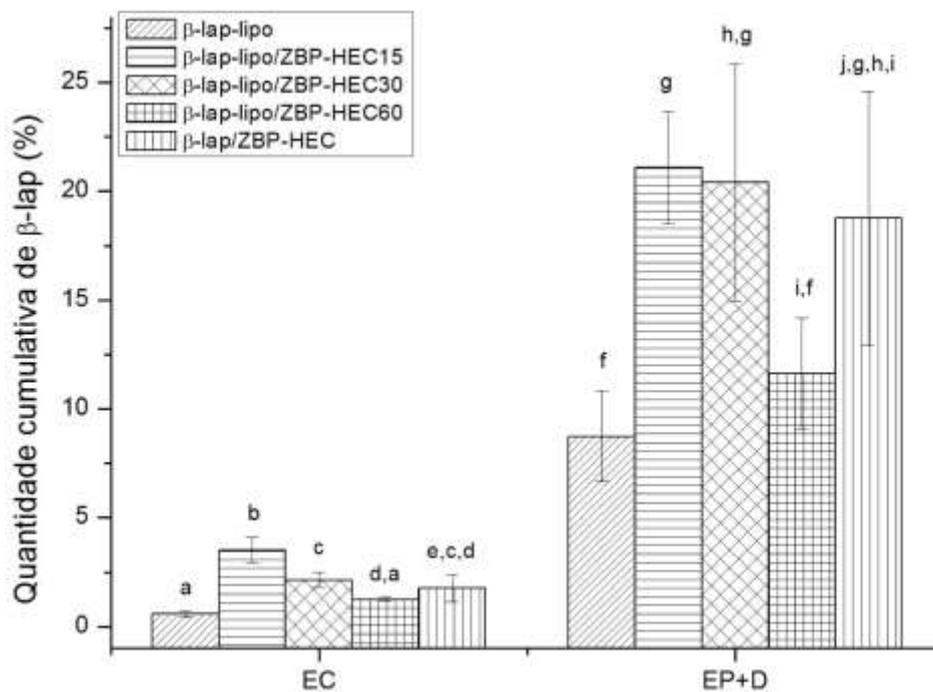
Formulação	Permeação (12 h)	Retenção Cutânea*			
		EC ($\mu\text{g/cm}^2$)	% dose aplicada	EP+D ($\mu\text{g/cm}^2$)	% dose aplicada
β -lap-lipo	ND	0,15 \pm 0,04	0,57 \pm 0,15	2,35 \pm 0,56	8,73 \pm 2,08
β -lap-lipo/ZBP-HEC15	ND	0,14 \pm 0,02	3,49 \pm 0,60	0,85 \pm 0,10	21,10 \pm 2,56
β -lap-lipo/ZBP-HEC30	ND	0,17 \pm 0,03	2,14 \pm 0,35	1,65 \pm 0,44	20,40 \pm 5,44
β -lap-lipo/ZBP-HEC60	ND	0,20 \pm 0,01	1,25 \pm 0,08	1,88 \pm 0,41	11,63 \pm 2,55
β -lap/ZBP-HEC	ND	0,47 \pm 0,17	1,76 \pm 0,62	5,04 \pm 1,57	18,76 \pm 5,84

*Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=3); ND: Não Detectado

Como se observa na figura 15 a penetração de β -lap no EC foi de 0,57 \pm 0,15 % e 1,76 \pm 0,62 % da dose aplicada (50 μg) para as formulações β -lap-lipo e β -lap/ZBP-HEC, respectivamente. A penetração da β -lap no EC a partir da formulação com β -lap livre dispersa na blenda polimérica (β -lap/ZBP-HEC) é aproximadamente o triplo da penetração da β -lap encapsulada nos lipossomas. Estes dados mostram o caráter fortemente lipofílico da β -lap que consegue ultrapassar a barreira lipídica da pele. Enquanto que a β -lap encapsulada na dispersão

lipossomal promoveu uma diminuição na penetração da β -lap no EC. Este resultado pode ser explicado pelo caráter mais rígido das vesículas lipossomais contendo colesterol que promovem uma menor taxa de transporte do ativo através do EC proporcionando uma liberação controlada (BOWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002; VERMA, 2003).

Figura 15 – Avaliação da penetração cutânea em pele de orelha de porco para diferentes formulações e percentagem de β -lap quantificada em diferentes estratos da pele: estrato córneo (EC) e pele remanescente (epiderme e derme – EP+D). Os dados médios com letras diferentes são significativamente diferentes usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). Estes valores são apresentados como a média \pm desvio padrão ($n = 5$).



Fonte: Acervo pessoal.

Quando se avalia os hidrogéis nas menores concentrações de β -lap (β -lap-lipo/ZBP-HEC15 e β -lap-lipo/ZBP-HEC30) verifica-se uma retenção mais elevada de β -lap tanto no EC ($3,49 \pm 0,6$ % e $2,14 \pm 0,35$ %) quanto na EP+D ($21,1 \pm 2,56$ % e $20,4 \pm 5,4$ %), respectivamente. O favorecimento da penetração da β -lap para estas formulações quando comparada com β -lap-lipo pode ser analisado pelo alto teor de água nesses hidrogéis e pela alta lipofilicidade da β -lap uma vez que a partição e a difusão são promovidas durante o contato e penetração do ativo na pele (LAUTHERBACH et al., 2015). Entretanto, o aumento da concentração de lipossomas

incorporado em hidrogel, tal como demonstrado para β -lap-lipo/ZBP-HEC60, pode promover uma difusão mais controlada de β -lap através do estrato córneo para a pele remanescente.

Em relação ao exposto pode-se observar que a eficácia das formulações cutâneas está diretamente relacionada com as propriedades do carreador/veículo utilizado bem como a permeabilidade do fármaco através das várias camadas da pele. As interações existentes entre o veículo, a pele e o fármaco determinam a liberação deste e a sua permeação através das camadas da pele da pele, seguida da deposição de fármaco no interior da pele ou da absorção na circulação sistêmica. Verifica-se que um veículo, lipofílico ou hidrofílico, pode alterar o estado físico e a permeabilidade da pele pelo efeito de hidratação. No caso dos hidrogéis estes não têm efeito oclusivo, mas devido ao elevado teor de água pode melhorar o nível de hidratação da pele promover a penetração do fármaco (FLATEN et al., 2015).

Em estudo recente, Boakye, Patel e Singh (2015) demonstraram que as características dos lipossomas como o tamanho de vesícula e a carga superficial exercem essencial função na permeação de lipossomas na pele. Pode-se observar que vesículas grandes são geralmente depositadas na superfície da pele atuando como os reservatórios de fármaco proporcionando a liberação prolongada do mesmo. Em relação a carga da superfície dos lipossomas, estes quando carregados negativamente mostraram uma maior penetração de fármaco na pele do que lipossomas carregados positivamente e neutros (GILLET et al., 2011b; FLATEN et al., 2015). Em um estudo feito por Du Plessis et al (1994) sobre a influência do tamanho de partícula de lipossomas mostrou um maior depósito na pele de fármacos lipofílicos quando estes são encapsulados em lipossomas grandes. De maneira semelhante, Thirumaleshwar et al. (2012) também verificaram que os lipossomas MLV's são importantes para promover uma maior deposição de fármacos na pele.

Além disso, a rigidez/elasticidade das membranas das vesículas também influenciam na deposição do fármaco sobre e dentro da pele (KNUDSEN et al., 2012). Em relação a este achado Zhang et al. (2014) realizou um estudo comparativo entre lipossomas convencionais (lipossomas rígidos) e etossomas (lipossomas deformáveis) observando que o fluxo transdérmico de psolareno é maior em etossomas do que em lipossomas convencionais

Pode-se inferir que a alta capacidade de penetração do fármaco para as formulações β -lap/ZBP-HEC, β -lap-lipo/ZBP-HEC15 e β -lap-lipo/ZBP-HEC30 quando comparada com β -lap-lipo pode ser explicada pela natureza altamente lipofílica da β -lap e o elevado teor de água nos hidrogéis contendo lipossomas. Entretanto, o aumento do teor de lipossomas incorporado no hidrogel, tal como demonstrado para a formulação β -lap-lipo/ ZBP-HEC60, foi capaz de promover a penetração da β -lap no EC e pele remanescente de forma mais controlada do que

as demais sem apresentar permeação. Dessa forma, a mesma pode ter aumento do seu efeito terapêutico local associado a baixo risco de efeitos sistêmicos indesejáveis provocados pela permeação.

Este efeito parece ser adequado para aplicações em cicatrização de lesões cutâneas, especialmente devido à ausência de barreiras cutâneas principais, como o estrato córneo e a epiderme.

6 CONCLUSÃO

- Lipossomas multilamelares contendo β -lapachona (β -lap-lipo) apresentaram características adequadas para aplicação tópica;
- A incorporação de β -lap-lipo em hidrogel ZBP-HEC não alterou a estrutura multilamelar dos mesmos;
- A metodologia analítica em CLAE para quantificação de β -lap em lipossomas e em matriz biológica (pele de orelha de porco) apresentou parâmetros estatísticos adequados de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão exatidão e robustez;
- A β -lap encapsulada em lipossomas incorporados em hidrogel (β -lap-lipo/ZBP-HEC) apresentou perfil de liberação controlada em relação àquela a partir de lipossomas (β -lap-lipo) e a β -lap dispersa no hidrogel (β -lap/ZBP-HEC);
- Não foi identificada a permeação de β -lap em nenhuma das formulações avaliadas em estudo *ex vivo* utilizando pele de orelha de porco;
- A β -lap a partir das formulações β -lap-lipo/ZBP-HEC15 e β -lap-lipo/ZBP-HEC30 apresentou penetração cutânea superior àquela a partir da formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC60.
- A formulação β -lap-lipo/ZBP-HEC60, contendo maior quantidade de fármaco carregado em lipossomas incorporados em hidrogel, pode ser mais adequada para aplicação em lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

AIRES, A. D. L.; XIMENES, E. C.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J.; SOUZA, V. M.; ALBUQUERQUE, M. C. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, p. 261–267, 2014.

ALVES, G. M. C., et al. Purificação e caracterização da β -Lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1965.

BARRY, Brian W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, n. 1, p. 85-97, 1987.

BASHAW, E. D.; DE SILVA, B.; ROSE, M. J.; WANG, Y. C.; SHUKLA, C. Bioanalytical Method Validation: Concepts, Expectations and Challenges in Small Molecule and Macromolecule. **The AAPS Journal**, v. 16, p. 586–591, 2014.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167–179, 2007.

BETZ, G.; AEPPLI A. MENSHUTINA, N.; LEUENBERGER, H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 44–54, 2005.

BEUKELMAN, C.J.; VAN DEN BERG, A.J.J.; HOEKSTRA, M.J.; UHL, R.; REIMER, K.; MUELLER, S. Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel®) for wound healing in vitro. **Burns**, v. 34, p. 845–855, 2008.

BEZIERE, N.; LOZANO, N.; NUNES, A.; SALICHS, J.; QUEIROS, D.; KOSTARELOS, K. et al. Dynamic imaging of PEGylated indocyanine green (ICG) liposomes within the tumor microenvironment using multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT). **Biomaterials**, v. 37, p. 415–424, 2015.

BOAKYE C.H.; PATEL K.; SINGH M. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, p. 106–116, 2015.

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

BOZZUTO, G., MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, V. 10, P. 975–999, 2015.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RE n° 893 de 29 de maio de 2003. Guia para realização de ensaios de equivalência farmacêutica com perfil de dissolução para FFSO.

BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia Brasileira, 5 ed. Brasília, Anvisa: 546 p., volume 1, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; CASTELOBRANCO, D. S. C. M.; MELO, C. V. S. et al. Terpinen-4-ol, tyrosol, and β -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 917–924, 2016.

BRONAUGH, R. L.; HOWARD, I.; MAIBACH. Percutaneous Absorption: Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methodology. CRC Press, 28 de mai de 1999 - 986 páginas.

CAVALCANTI, I.M.F.; PONTES-NETO, J.G.; KOCERGINSKY, P.O.; BEZERRA-NETO, A.M.; LIMA, J.L.C.; LIRA-NOGUEIRA, M.C.B., et al. Antimicrobial activity of β -lapachone encapsulated into liposomes against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 103-108, 2015.

CAVALCANTI, I. M. F.; MENDONÇA, E. A. M.; LIRA, M. C. B.; HONRATO, S. B.; CAMARA, C. A.; AMORIM, R. V. S., et al. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332-340, 2011.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v. 16, p. 75–79, 2004.

CILURZO, F.; MINGHETTI, P., SINICO, C. Newborn Pig Skin as Model Membrane in In Vitro Drug Permeation Studies: A Technical Note. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 8, 2007.

CIOBANU, B. C.; CADINOIU, A. N.; POPA, M.; DESBRIERS, J.; PEPTU, C. A. Modulated release from liposomes entrapped in chitosan/gelatin hydrogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 383-391, 2014.

COELHO JUNIOR, E. R.; COSTA, L. O. B. F.; ALENCAR, A. V.; BARBOSA, A. P. G.; PINTO, F. C. M.; AGUIAR, J. L. de A. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 30, p. 194–198, 2015.

COELHO, T. S.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; SCAINI, C. J. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 90, p. 293–297, 2010.

CUNHA-FILHO, M. S.; MARTNEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral beta-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 871–877, 2008.

DA COSTA, Paulo Jorge Cardoso. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DARAEI, H.; ETEMADI, A.; KOUHI, M.; ALIMIRZALU, S.; AKBARZADEH, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 42, p. 1–11, 2014.

DE LUCENA, M.T.; DE MELO JÚNIOR, M. R.; DE MELO LIRA, M. M.; DE CASTRO, C. M.; CAVALCANTI, L. A.; DE MENEZES, M. A. et al. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, p. 82 , 2015.

DOS ANJOS, D. O.; ALVES, E. S. S.; GONÇALVES, V. T.; FONTES, S. S.; NOGUEIRA, M. L.; SUAREZ-FONTES, A. M., et al. Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, p. 207–219, 2016.

DU PLESSIS, J.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.; MOILER, D. G. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, n. 2, p. 273-278, 1996.

EL MAGHRABY, G. M., WILLIAMS, A. C. Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, p. 149-163, 2009.

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

EL MAGHRABY, G.M.; WILLIAMS, A. C. Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. **Expert opinion on drug delivery**, v. 6, p. 149–163, 2009.

ELDAR-BOOCK, A.; POLYAK, D.; SCOMPARIN, A.; SATCHI-FAINARO, R. Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 682–689, 2013.

ELNAGGAR, Y. S.; EL-REFAIE, W. M.; EL-MASSIK, M. A.; ABDALLAH, O. Y. Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: an update on state of art and recent applications. **Journal of Controlled Release**, v. 180, p. 10-24, 2014.

ESTRACANHOLLI, E. A.; PRAÇA, F. S.; CINTRA, A. B.; PIERRE, M. B.; LARA, M. G. Liquid crystalline systems for transdermal delivery of Celecoxib: In Vitro drug release and skin permeation studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, p. 1468–1475, 2014.

FERREIRA, H.; SILVA, R.; MATAMÁ, T.; SILVA, C.; GOMES, A.C.; CAVACO-PAULO, A. A biologically active delivery material with dried-rehydrated vesicles containing the antiinflammatory diclofenac for potential wound healing. **Journal of Liposome Research**, v. 26, p. 269-275, 2015.

FLATEN, G. E.; PALAC, Z.; ENGESLAND, A.; FILIPOVIC-GRCIC, J.; VANIC, Z.; SKALKO-BASNET, N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10-24, 2015.

FRESTA, M.; PUGLISI, G. Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems. In vitro and in vivo investigation with radioactively labelled vesicles. **Journal of Drug Targeting**, vol. 4, p. 95-101, 1996.

FRIEND, D. R. In vitro skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, n. 3, p. 235-248, 1992.

FU, S. C.; CHAU, Y. P.; LU, K. S.; KUNG, H. N. β -Lapachone Accelerates the Recovery of Burn-Wound Skin. **Histology and Histopathology**, v. 26, p. 905–914, 2011.

GILLET, A.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposomes and parameters affecting their skin penetration behaviour. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 35-42 2011b.

GILLET, A.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; DUCAT, E.; EVRARD, B.; PIEL, G. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 43–53, 2011a.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

HANSON RESEARCH. Topical and Transdermal Diffusion Cell Systems. Featuring the Hanson Microetteplus. Disponível em: http://www.flowscience.com.br/catalogos/hanson/microette_plus.pdf. Acessado em: 25/11/2016

HANSON, M. C.; ABRAHAM, W.; CRESPO, M. P.; CHEN, S. H.; LIU, H.; SZETO, G. L., et al. Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intrastructural T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides. **Vaccine**, v. 33, n. 7, p. 861-868, 2015.

HEARD, C. M., SCREEN, C. Probing the permeation enhancement of mefenamic acid by ethanol across full-thickness skin, heat-separated epidermal membrane and heat-separated dermal membrane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1, p. 323-325, 2008.

HIGUCHI, T. J. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 11, p. 85-97, 1960.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 1145–1149, 1963.

HIGUCHI, T. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 802-804, 1962.

HURLER, J.; SØRENSEN, K. K.; FALLARERO, A.; VUORELA, P.; BASNET, N. S. Liposomes-in-hydrogel delivery system with mupirocin: In vitro antibiofilm studies and in vivo evaluation in mice burn model. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

ICH. GUIDANCE FOR INDUSTRY. Q2B – Validation of analytical procedures: Methodology. **International Conference on Harmonization**, 06 nov.1996.

JUDITH, R.; NITHYA, M.; ROSE, C.; MANDAL, A. B. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. **Life Sciences**, v. 87, p. 1–8, 2010.

KAUR, I. P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 271–288, 2007.

KNUDSEN, N. O.; RONHOLT, S.; SALTE, R.D.; JORGENSEN, L.; THORMANN, T.; BASSE, L. H., et al. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 532-539, 2012.

KUNG, H.; YANG, M.; CHANG, C.; CHAU, Y.; LU, K. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities β -lapachone. **American Journal Of Physiology Cell Physiology**, v. 295, p. 931-943, 2008.

LAUTERBACH, Andreas; MÜLLER-GOYMANN, Christel C. Comparison of rheological properties, follicular penetration, drug release, and permeation behavior of a novel topical drug delivery system and a conventional cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 3, p. 614-624, 2014.

LEONARDI, G. R; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LI, Z.; LIU, M.; WANG, H.; DU, S. Increased cutaneous wound healing effect of biodegradable liposomes containing madecassoside: preparation optimization, in vitro dermal permeation, and in vivo bioevaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2995, 2016.

LIRA, A. A. M. Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2007.

LIRA, M. C. B.; FERRAZ, M. S.; DA SILVA, D. G. V. C.; CORTES, M. E.; TEIXEIRA, K. I.; CAETANO, N. P., et al. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, n. 3-4, p. 215-224, 2009.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 33–54, 2002.

MATA-SANTOS, T.; PINTO, N. F.; MATA-SANTOS, H. A.; DE MOURA, K. G.; CARNEIRO, P. F.; CARVALHO, T. S. et al. Anthelmintic Activity Of Lapachol, Beta-Lapachone And Its Derivatives Against Toxocara Canis LARVAE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, p. 197–204, 2015.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. **Life Sciences**, v. 26, p. 1473–1477, 1980.
MIERS, Gabriella. Liberação de ácido kójico a partir de formas farmacêuticas semissólidas. 2015.

MORENO, E.; SCHWARTZ, J.; LARREA, E.; CONDE, I.; FONT, M.; SANMARTÍN, C., et al. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 2003-2012, 2015.

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

MOURTAS, S.; HAIKOU, M.; THEODOROPOULOU, M.; TSAKIROGLOU, C.; ANTIMISIARIS, S. G. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. **Journal of colloid and interface science**, v. 317, n. 2, p. 611-619, 2008.

NAHAR, K.; RASHID, J.; ABSAR, S.; AL-SAIKHAN, F. I.; AHSAN, F. Liposomal Aerosols of Nitric Oxide (NO) Donor as a Long-Acting Substitute for the Ultra-Short-Acting Inhaled NO in the Treatment of PAH. **Pharmaceutical research**, v. 33, n. 7, p. 1696-1710, 2016.

NÉRIS, M. de A. Desenvolvimento e caracterização de gel de biopolímero produzido pela fermentação de melão da cana-de-açúcar pelo microorganismo *Zoogloea* sp. Contendo ácido úsnico. 2007.

NG, S. F.; ROUSE, J. J.; SANDERSON, F. D.; MEIDAN, V.; ECCLESTON, G. M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1432–1441, 2010.

NG, S.; ROUSE, J.J.; SANDERSON, F. D.; MEIDAN, V.; ECCLESTON, G. M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1432–1441, 2010.

NUNES, P. S.; RABELO, A. S.; DE SOUZA, J. C. C., SANTANA, B. V.; DA SILVA, T. M. M.; SERAFINI, M. R., et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1, p. 473-482, 2016.

OECD. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. OECD Publishing, n. 28, 2004.

PALÁCIO, S. Avaliação do comportamento reológico, propriedades térmicas e espectroscópicas do biopolímero de Zoogloea sp. Em blenda polimérica. 2013. 102f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2013.

PARK, J.; CHO, H.; YOON, H. Y.; YOON, I.; KO, S.; SHIM, J., et al. Hyaluronic acid derivative-coated nanohybrid liposomes for cancer imaging and drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v.174, p. 98-108, 2014.

PATERSON-BEEDLE, M., KENNEDYA, J. F., MELOB, F. A. D., LLOYDA, L. L., MEDEIROS, V. A cellulose exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a Zoogloea sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 375-383, 2000.

PATTNI, B. S., CHUPIN, V. V., TORCHILIN, V. P. New developments in liposomal drug delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 10938-10966, 2015.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; JALSENJAL, A. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 140–148, 2005.

PERCIVAL, S. L.; MCCARTY, S.; HUNT, J. A.; WOODS, E. J. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. **Wound repair and regeneration**, v. 22, p.174–186, 2014

PIERRE, M. B. R.; COSTA, I. dos S. M. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 9, p. 607, 2011.

PITA, P. C. de C.; PINTO, F. C. M.; LIRA, M. M. de M.; MELO, F. de A. D.; FERREIRA, L. M.; AGUIAR, J. L. de A. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 30, p. 296-300, 2015.

PRAUSNITZ, M.R., ELIAS, P.M., FRANZ, T.J., SCHMUTH, M., TSAI, J., MENON, G.K., et al. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. **Dermatology**, p. 2065–2073, 2008.

PRISTA, L. N. Tecnologia Farmacêutica, 6a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2003.

PROW, T. W., GRICE, J. E., LIN, L. L., FAYE, R., BUTLER, M., BECKER, W., et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

RAHIMPOUR, Y.; HAMISHEHKAR, H. Liposomes in cosmeceutics. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, p. 443–55, 2012.

RAI, V.; GHOSH, I.; BOSE, S.; SILVA, S.M.C.; CHANDRA, P.; MICHNIAK-KOHN, B. A transdermal review on permeation of drug formulations, modifier compounds and delivery methods. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 20, p.75–87, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLIS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quimica Nova**, v. 31, p. 164–171, 2008.

RIVKIN, I.; GALNOY-GLUCKSAM, Y.; ELRON-GROSS, I.; AFRIAT, A.; EISENKRAFT, A.; MARGALIT, R. Treatment of respiratory damage in mice by aerosols of drug-encapsulating targeted lipid-based particles. **Journal of Controlled Release**, 2016.

RYAN, G. M.; KAMINSKAS, L. M.; BULITTA, J. B.; MCLNTOSH, M. P.; OWEN, D. J.; PORTER, C. J. PEGylated polylysine dendrimers increase lymphatic exposure to doxorubicin when compared to PEGylated liposomal and solution formulations of doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 128–136, 2013.

SAVAGE, R.E.; HALL, T.; BRESCIANO, K.; BAILEY, J.; STARACE, M.; CHAN, T. C. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for

the determination of ARQ 501 (β -lapachone) in plasma and tumors from nu/nu mouse xenografts. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 872, p. 148–153, 2008.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 2376-2381, 2002.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N.A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, p. 5440–5451, 2006.

SHAILESH, T.; KULKARNI, P.K. Development and evaluation of mupirocin loaded liposomal hydrogels for diabetic wound healing properties. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, v. 2, p. 42–45, 2014.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123–140, 1997.

SILVA, J. A., APOLINÁRIO, A. C., SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: In vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 123–136, 2005.

SITÔNIO, M. M.; JUNIOR, C. H. R. de C.; CAMPOS, I. de A.; SILVA, B. N. F.; LIMA, M. do C. A.; GÓES, A. J. S., et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3, 4-dihydro-2, 2-dimethyl-2H-naphthol [1, 2-b] pyran-5, 6-dione (β -lapachone). **Inflammation Research**, v. 62, n. 1, p. 107-113, 2013.

SONGKRO, S.; PURWO, Y.; BECKET, G.; RADES, T. Investigation of newborn pig skin as an in vitro animal model for transdermal drug delivery. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 13, p. 133-139, 2003.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477–502, 2000.

THIRUMALESHWAR, S.; KULKARNI, P. K; GOWDA, D. V. Liposomal Hydrogels: A novel drug delivery system for wound dressing. **Current Drug Therapy**, v. 7, n. 3, p. 212-218, 2012.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 145–160, 2005.

TRAUER, S.; RICHTER, H.; KUNTSCHKE, J.; BUTTEMEYER, R.; LIEBSCH, M.; LINSCHKEID, M., et al. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 301-306, 2014.

TSENG, C. H.; CHENG, C. M.; TZENG, C. C.; PENG, S. I.; YANG, C. L.; CHEN, Y. L. Synthesis and anti-inflammatory evaluations of β -lapachone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 523–531, 2013.

VERMA, D. D., et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1, p. 141-151, 2003.

WALTERS, K. A., ROBERTS, M. S. The structure and function of skin. **Dermatological and transdermal formulations**, CRC Press, p. 1-39, 2002.

WANG, C.; LIU, P.; ZHUANG, Y.; LI, P.; JIANG, B.; PAN, H., et al. Lymphatic-targeted cationic liposomes: A robust vaccine adjuvant for promoting long-term immunological memory. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 213, p. e16, 2015.

WEIGMANN, H. J.; LADEMANN, J.; MEFFERT, H.; SCHAEFER, H.; STERRY, W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 12, p. 34–45, 1999.

XU, X.; HO, W.; ZHANG, X.; BERTRAND, N.; FAROKHZAD, O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223-232, 2015.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90–99, 2014.

ZHANG, H.; ZHU, X.; SHEN, J.; XU, H.; MA, M.; GU, W., et al. Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for in vitro permeation studies using Franz diffusion cell device. **Journal of Liposome Research**, p. 1-10, 2016.

ZHANG, L.; CAI, D.; ZHAO, X.; CHENG, Z.; GUO, H.; QI, C. et al. Liposomes containing recombinant gp85 protein vaccine against ALV-J in chickens. **Vaccine**, v. 32, p. 2452–2456, 2014.