

GABRIELA MOJEIKO

**Veiculação tópica de endoxifeno e celecoxibe utilizando nanocarreadores
como uma nova alternativa para a prevenção do câncer de mama**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Biagini Lopes

Versão corrigida

São Paulo

2021

RESUMO

Mojeiko G. Veiculação tópica de endoxifeno e celecoxibe utilizando nanocarreadores como uma nova alternativa para a prevenção do câncer de mama. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2021.

O câncer de mama possui alta incidência entre mulheres no mundo, apesar disso, existem poucas estratégias para sua prevenção e essas possuem adesão limitada principalmente devido aos seus graves efeitos adversos, evidenciando a necessidade de novos fármacos e formas de prevenção. Neste trabalho, propusemos o desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocarreadores tópicos para autoadministração da combinação de celecoxibe e endoxifeno na pele da mama, afim de otimizar a penetração na pele e a localização dos fármacos no tecido mamário. Foram desenvolvidos e comparados nanoemulsões estabilizadas por fase líquido-cristalina lamelar e etossomas. As nanoemulsões estabilizadas por fase lamelar foram compostas de tensoativo:fase oleosa a 5:5 (m/m), com 80% de água e 2 ou 5% (m/m) de ácido oleico ou caprílico como promotores de penetração. Sistemas etossomais binários foram compostos de fosfatidilcolina, dois alcoóis (etanol e propilenoglicol) e água. O tamanho das gotículas das nanoemulsões não foi aparentemente influenciado pelo tipo ou concentração do promotor de penetração, apresentando-se na faixa de 470,5 a 585,5 nm. Foram caracterizadas como sistemas não newtonianos do tipo pseudoplásticos, sendo que formulação contendo os fármacos exibiu propriedade elástica e maior bioadesão. Comparado à água (controle), todas as formulações aumentaram TEWL em 8,5-12,9 vezes, sendo que aquela com ácido oleico a 5% promoveu aumento mais pronunciado comparado ao controle (12,9 vezes). Apesar desse aumento, as nanoemulsões se mostraram não irritantes em modelo HET-CAM. Todas as nanoemulsões aumentaram a penetração dos fármacos em camadas da pele; porém, comparado ao controle, a formulação contendo 5% de ácido oleico foi mais eficaz na penetração dos fármacos nas camadas viáveis da pele (3,2-22,4 vezes), e no transporte transdérmico de endoxifeno (61,5 vezes) e celecoxibe (11,56 vezes). Quanto aos sistemas etossomais, o tamanho da vesícula foi influenciado pela concentração de fosfatidilcolina e pelos fármacos. O sistema selecionado foi composto 4% de fosfatidilcolina, 0,7% de celecoxibe e 0,5% de endoxifeno, apresentou tamanho de 461,1 nm e foi usado para formar gel com alginato de sódio. Não houve influência sobre a perda de água transepidérmica, em comparação com o controle houve aumento na penetração cutânea nas camadas viáveis (2 – 3 vezes) e fase receptora (3,2 – 31 vezes) para os fármacos celecoxibe e endoxifeno respectivamente. A nanoemulsão contendo 5% de ácido oleico reduziu de maneira mais acentuada a viabilidade celular comparado ao uso dos fármacos isolados, mostrando-se uma potencial aplicação à quimioprevenção tópica do câncer de mama.

Palavras-chave: Nanocarreadores, Quimioprevenção, Câncer de mama, Celecoxibe, Endoxifeno.

ABSTRACT

MOJEIKO G. Topical delivery of endoxifene and celecoxib using nanocarriers as a new alternative for breast cancer prevention. Dissertation (Master thesis in Pharmacology). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2021.

Despite the high incidence of breast cancer, there are few strategies for its prevention and these have limited adherence mainly due to its serious adverse effects, highlighting the need for new drugs and forms of prevention. In this study, we developed and evaluated topical nanocarriers for self-administration of a combination of drugs (celecoxib and endoxifen) directly on the breast skin, to optimize the deep penetration in the skin and the location of the drugs in the breast tissue. Two nanocarriers were compared: nanoemulsions stabilized by lamellar liquid-crystalline phase and etosomes. Lamellar phase-stabilized nanoemulsions were composed of surfactant: 5: 5 (w / w) oil phase, with 80% water and 2 or 5% (w / w) oleic or caprylic acid as penetration enhancers. Binary etosomal systems were developed with phosphatidylcholine, two alcohols (ethanol and propylene glycol) and water. The droplet size of the nanoemulsions was not influenced by the type or concentration of the penetration enhancer, ranging from 470.5 to 585.5 nm. They were characterized as non-Newtonian systems of the pseudoplastic type, and the formulation containing the drugs displayed elastic and bioadhesive properties. Compared to water (control), all formulations increased TEWL by 8.5-12.9 times. The nanoemulsion containing 5% oleic acid promoted a more pronounced increase compared to the control (12,9 fold). Despite this increase, they were considered non-irritant in the HET-CAM model. All nanoemulsions increased the penetration of drugs into viable layers of the skin, but the formulation containing 5% oleic acid was more effective, increasing ipenetrating into viable layers by 3,2-22,4-fold, and the transdermal transport of endoxifene (61,5 -fold) and celecoxib (11,56-fold). The selected ethosomal system was composed of 4% phosphatidylcholine, 0.7% celecoxib and 0.5% endoxifene and presented size of 461.1 nm. Its was included in an sodium alginate gel. This system did not influence the transepidermal water loss, however, compared to the control, there was an increase in the cutaneous penetration in the viable layers (2 - 3 times) and the receptor phase (3.2 - 31 times) for the drugs celecoxib and endoxifene respectively. The nanoemulsion containing 5% oleic acid reduced the viability of cancer cells compared to the use of isolated drugs. These results suggest the potential applicability of the nanoemulsion for topical breast cancer chemoprevention.

Keywords: Nanocarriers, Chemoprevention, Breast cancer, Celecoxib, Endoxifen.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial que possui uma alta incidência, correspondendo a 24,2% dos casos de câncer entre mulheres sendo considerado a principal causa de morte feminina em países em desenvolvimento (1). Em 2018 foram diagnosticados cerca de 2,1 milhões de casos em todo o mundo (1) e segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil a estimativa de novos casos de câncer de mama para cada ano do triênio (2020-2022) é de 66.280 (2). Esta incidência tende a permanecer elevada devido ao envelhecimento populacional e adoção de hábitos que favorecem o desenvolvimento da doença, como o fumo e o sedentarismo (1). Apesar desta relevante incidência, existem poucas estratégias para a prevenção desta neoplasia.

Atualmente, as estratégias preventivas utilizadas para mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença incluem, além das técnicas de rastreamento, a mastectomia (retirada total ou parcial da mama), administração oral de moduladores do receptor de estrogênio (tamoxifeno e raloxifeno) e inibidores da aromatase (anastrozol e exemestano) (3, 4). No entanto, com exceção do rastreamento mamográfico, estas abordagens possuem adesão limitada por parte das mulheres devido aos graves efeitos adversos dos fármacos, que incluem o maior risco de eventos tromboembólicos, além do caráter invasivo da mastectomia profilática que pode trazer complicações relacionadas a cirurgia e impactos psicológicos (5). Esse quadro é complicado pela ausência de modelos clínicos para estimar com segurança o risco individual de desenvolvimento da doença e necessidade de utilização de estratégias preventivas (6).

Diante deste cenário, neste trabalho, propomos o desenvolvimento de uma estratégia inédita de quimioprevenção para o câncer de mama baseada na combinação de dois fármacos, o endoxifeno, um metabólito ativo do tamoxifeno, e o anti-inflamatório não-esteróide celecoxibe, por meio da via de administração tópica-transdérmica e utilizando-se sistemas nanoestruturados.

1.1 Quimioprevenção

O tratamento farmacológico profilático para determinadas doenças tem sido uma estratégia preventiva de interesse, a exemplo do uso de inibidores de agregação plaquetária, que reduz a incidência de doenças cardiovasculares. O tipo de estratégia

que utiliza a terapia farmacológica para impedir, interromper ou reverter a carcinogênese em estágios iniciais é chamada de quimioprevenção, e esta prática tem tido um progresso lento devido à complexidade da doença (3, 7). A quimioprevenção é tipicamente descrita sob as categorias primária, secundária e terciária, que possuem as seguintes características:

- **Primária:** prevenção na população em geral e em coortes de alto risco de desenvolvimento da doença;

- **Secundária:** geralmente direcionada para pacientes com lesões pré-tumorais (como hiperplasias atípicas), de modo a impedir o desenvolvimento de formas invasivas da doença;

- **Terciária:** prevenção da recorrência do câncer (8, 9).

Especificamente, o câncer de mama tem liderado a busca por terapias preventivas devido a estudos anteriores que obtiveram sucesso com o uso dos moduladores seletivos para estrógeno (10). A quimioprevenção do câncer de mama é indicada a pacientes com alto risco de desenvolver a doença, e pesquisadores ao longo dos anos vêm tentando definir fatores de risco modificáveis e não modificáveis. Os modificáveis são aqueles influenciados pelo comportamento do indivíduo, como obesidade, sedentarismo, consumo de tabaco e álcool e a exposição exógena aos hormônios estrógeno e progesterona. Os fatores não modificáveis são os de maior relevância para avaliar o risco do desenvolvimento da doença, e incluem o avanço da idade, histórico familiar, mutação genética, fatores reprodutivos e histórico de lesões pré-cancerosas (11).

Existe uma variedade de modelos e ferramentas que são utilizados para estimar o risco de uma mulher desenvolver a doença, sendo sempre complementados pela avaliação clínica desses resultados. O modelo de Gail, por exemplo, propõe a análise por meio de cálculos matemáticos e pode estimar em porcentagem o risco durante os próximos 5 anos e ao longo da vida. Essa análise é realizada com base no conjunto de dados que identificam: 1. Idade da menarca; 2. Número de biopsias realizadas; 3. Idade ao nascimento do primeiro filho; 4. Histórico da doença em parentes de primeiro grau (12, 13). Com o avanço das pesquisas nesta área, outros modelos foram desenvolvidos levando em consideração fatores como densidade mamográfica e exposição prévia à radiação (14).

Fatores genéticos podem também indicar alto risco de desenvolver câncer de mama, como a mutação nos genes BRCA1 e BRCA2, que podem estar relacionados

ao desenvolvimento de outros tipos de câncer, como a mutação no gene BRCA1, que aumenta também a probabilidade do desenvolvimento de câncer de ovário (15). Alguns modelos estimam a chance de mutações nesse gene como o Tyrer-Cuzick, (15) fazendo com que os profissionais dependam dos resultados destes cálculos para indicar o teste genético (14, 16).

Apesar desses modelos estimarem o risco do desenvolvimento da doença, ainda há poucos marcadores confiáveis e precisos. Esse fator, somado aos graves efeitos adversos dos medicamentos disponíveis e um longo tratamento de no mínimo 5 anos, colaboram para a resistência tanto pelas mulheres quanto pelos clínicos em aderir e indicar a terapia farmacológica para prevenção.

1.2 Abordagens farmacológicas para quimioprevenção do câncer de mama

Um dos fármacos mais usados na quimioprevenção da doença, o modulador do receptor de estrógeno tamoxifeno, foi considerado um agente preventivo do câncer de mama após um ensaio clínico com 13.388 mulheres com alto risco, no qual foi comprovado a diminuição da ocorrência de tumores com receptor de estrógeno positivo (RE+), reduzindo em 49% a incidência do câncer de mama invasivo (17). Seu amplo uso leva em consideração que o câncer de mama que expressa receptor de estrógeno é o tipo mais comum diagnosticado e possui um crescente aumento em sua incidência (18). Além disso, os receptores de estrógeno são expressos na maioria dos tumores com caráter invasivo (19). Porém, o tamoxifeno é responsável por graves efeitos adversos, como o aumento do risco de tromboembolismo e câncer endometrial por atuar como agonista do receptor de estrógeno no endométrio, além de ser efetivo somente em tumores dependentes do hormônio (20). Além disso, o tamoxifeno é um pró-fármaco que requer ativação metabólica pela CYP2D6 em 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno para exercer seu efeito farmacológico. Em função do polimorfismo genético desta enzima, que contém mais de 100 variantes identificadas, sua eficácia pode variar, sendo menor em pacientes com capacidade limitada de metabolização (21).

Devido aos efeitos adversos e longa duração do tratamento, foi relatada uma diminuição pronunciada de mulheres consideradas de alto risco dispostas a usar o tamoxifeno: em um dos poucos estudos disponíveis, dentre 2 milhões de mulheres nesta classificação, 120.000 fizeram o uso do fármaco em 2000, tendo uma queda

para 20.500 mulheres em 2010 nos Estados Unidos (10, 22). Segundo Roche et al. (2019), após sessões de aconselhamento, 52% das mulheres se propuseram a utilizar o tamoxifeno oral como estratégia de quimioprevenção, sugerindo que outra influência na adesão do tratamento está relacionado a informações que são fornecidas a essas mulheres, como a definição da classificação individual e personalizada de alto risco e os prós e contras da quimioprevenção (23).

Outro modulador do receptor de estrógeno aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para a quimioprevenção é o raloxifeno. Estudos demonstraram que comparado ao tamoxifeno, o fármaco foi considerado eficaz na diminuição da incidência do câncer de mama invasivo e com menor risco de efeitos adversos, embora alguns efeitos (como o risco de acidente vascular cerebral e de desenvolver outros tipos de câncer) ainda ocorram em frequência semelhante para ambos os fármacos (24). Os inibidores da aromatase exemestano e anastrozol representam outra classe de medicamentos estudada para a quimioprevenção, no entanto, seu uso está associado à perda óssea acelerada e ao risco de problemas cardiovasculares (25). Outro exemplo são os retinoides e neste sentido, estudos clínicos têm sido realizados com o retinóide sintético fenretinida, porém os resultados demonstram baixa biodisponibilidade por via oral em razão da lipossolubilidade da molécula (26).

Evidências sugerem um papel da COX-2 no câncer de mama e desse modo, o anti-inflamatório não-esteróide (AINE) celecoxibe também vem sendo descrito como um potencial agente farmacológico para uso na quimioprevenção. Este AINE apresentou forte atividade quimiopreventiva contra a carcinogênese mamária em estudos prévios (27, 28), e nosso grupo recentemente relatou o desenvolvimento de microemulsões para sua aplicação por via tópica na mama (29).

Neste trabalho estamos propondo uma estratégia inédita de quimioprevenção para o câncer de mama baseada na combinação e administração tópica de dois fármacos, o metabólito (do tamoxifeno) endoxifeno e o AINE celecoxibe.

1.3 Fármacos selecionados e seus efeitos

A terapia combinada já é comumente utilizada para o tratamento de neoplasias malignas com o intuito de aumentar a eficácia da terapia e evitar ou reduzir a resistência aos quimioterápicos, porém, as combinações utilizadas atualmente

apresentam limitações pela diferença na farmacocinética dos fármacos e, em alguns casos, pela diferença nas vias de administração empregadas (30). Essas limitações podem ser superadas por meio da entrega combinada por nanocarreadores, podendo assim, aumentar a concentração do fármaco no alvo, incorporar ativos com diferentes características e reduzir efeitos adversos. Neste estudo, foram incorporados no nanocarreador dois fármacos: endoxifeno e celecoxibe (**Figura 1**).

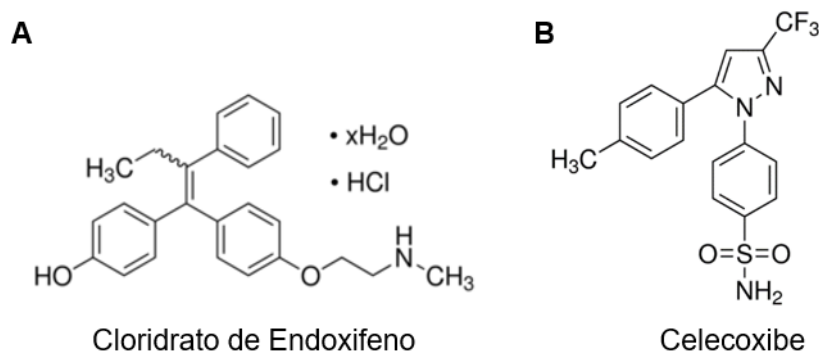


Figura 1. Estruturas químicas dos fármacos utilizados. (A) Cloridrato de Endoxifeno, peso molecular: 409,95 g/mol e logP da forma base: 6,3. (B) Celecoxibe, peso molecular: 381,4 g/mol e logP: 3,5.

O endoxifeno é o principal metabólito ativo responsável pela eficácia do tamoxifeno e possui alta afinidade e seletividade pelos receptores de estrógeno, sendo considerado um potente bloqueador no tecido mamário (31). Seu mecanismo de ação consiste em bloquear a atividade transcricional do receptor α de estrógeno e inibir a proliferação de células tumorais induzidas pelo hormônio. Periféricamente, atua como agonista, o que está relacionado aos efeitos adversos, e assim como o tamoxifeno, é classificado como modulador seletivo do receptor de estrógeno (21, 32). A utilização do endoxifeno evitaria a necessidade de biotransformação e ativação do tamoxifeno, evitando as variações na biodisponibilidade do fármaco relacionada a metabolização do tamoxifeno e polimorfismo enzimático.

O celecoxibe é um anti-inflamatório AINE, que atua como inibidor seletivo de ciclooxigenase-2, limitando a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. A COX-2 é considerada induzível por estímulos específicos como citocinas e fatores de crescimento, e na mama não é encontrada sua expressão constitutiva (28). Evidências apontam que alterações do microambiente tecidual, relacionadas à expressão de

COX-2 e à produção de prostaglandina E2 (PGE2), podem favorecer o desenvolvimento tumoral (33).

Considerando que a elevada expressão de ciclooxygenase-2 em lesões pré-tumorais e tumorais tem sido associada ao desenvolvimento da doença, o celecoxibe foi selecionado baseado em estudos anteriores, nos quais o uso oral deste foi associado a um risco reduzido de tumores mamários (34). Além de seu efeito inibitório sobre a ciclooxygenase-2, possui outros mecanismos antitumorais como a indução de apoptose e da proliferação de células, podendo ter efeito na ressensibilização celular a outros agentes antitumorais, e atuar na redução da expressão de VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) em carcinomas, comprometendo um fator importante para o crescimento tumoral: a angiogênese (28, 35). Entretanto, seu uso sistêmico está associado a efeitos adversos consideráveis, como efeitos cardiovasculares, trombos e aumento da pressão arterial (36). Diante disso, sua aplicação local permitiria sobrepujar esses obstáculos.

Neste trabalho foi proposta a associação entre endoxifeno (metabólito ativo do tamoxifeno) e celecoxibe (inibidor de ciclooxygenase-2) a fim de potencializar o efeito da quimioprevenção, devido principalmente à diversidade de fatores relacionados ao desenvolvimento e progressão de tumores mamários. Além disso, o celecoxibe pode também potencializar o efeito antiestrogênico do endoxifeno, uma vez que estudos clínicos demonstraram que inibidores da COX-2 podem afetar indiretamente a produção de estrógeno, pois a prostaglandina E2 (PGE2) está relacionada com a regulação da enzima aromatase responsável pela síntese de estrógeno (37), indicando um benefício adicional dessa associação.

Para que os benefícios terapêuticos desta associação sejam obtidos, é necessário que eles atinjam e sejam colocalizados no sítio de desenvolvimento dos tumores. Considerando que os tumores na mama possuem seu sítio de localização abaixo da pele, a fim de vencer a barreira cutânea imposta pelo estrato córneo e aumentar a concentração do fármaco no alvo, propomos a incorporação em nanocarreadores para uso tópico.

1.4 Administração tópica e nanocarreadores

Uma vez que as estratégias farmacológicas de quimioprevenção envolvem administração sistêmica dos ativos, diversas reações adversas são possíveis, o que

limita a adesão. A administração tópica pode permitir o efeito localizado dos fármacos, e a utilização de nanocarreadores, o carregamento de moléculas insolúveis, de difícil administração em decorrência de efeitos adversos ou problemas de biodisponibilidade (38).

A administração tópica é possível porque a mama é descrita como um apêndice cutâneo devido a sua origem embriológica que, por ser em grande parte constituída por tecido adiposo, pode favorecer o acúmulo de fármacos aplicados na pele da mama. Um estudo realizado anteriormente demonstrou que, ao comparar a aplicação de diclofenaco na pele abdominal e na pele da mama, as concentrações do fármaco foram maiores no tecido mamário quando da administração na peles das mamas (39). O estudo também relata outros benefícios advindos da terapia local, como redução da concentração plasmática e de efeitos adversos decorrentes da distribuição sistêmica do fármaco.

A pele é considerada o maior órgão do corpo, constitui uma barreira que impede a entrada de agentes físicos, químicos e microbiológicos, prevenindo a perda de água e de nutrientes, e possui funções imunológicas e sensoriais (40). Estruturalmente, é formada por camadas distintas, sendo constituída por uma porção epitelial, chamada epiderme e por uma conjuntiva, denominada derme (**Figura 2**). A epiderme é formada por um epitélio estratificado queratinizado de 5 camadas: basal, espinhosa, granulosa, lucida (encontrada na região palmoplantar) e córnea. Na camada basal ocorre a multiplicação celular, e a partir desta, à medida em que se tornam mais superficiais, as células se diferenciam. Os queratinócitos no estrato córneo adotam dimensões achatadas e se diferenciam em corneócitos, e são envolvidos por camadas lipídicas (41).

O estrato córneo, a camada mais externa da pele, é formado por camadas de corneócitos que são células anucleadas, incorporados em uma matriz lipídica altamente organizada composta por colesterol, ceramidas e ácidos graxos livres. Devido principalmente à organização e composição desta camada, o estrato córneo possui a função primária de barreira da pele, limitando assim a entrega dérmica e transdérmica de compostos e fármacos na pele, sendo um desafio da administração tópica (42, 43).

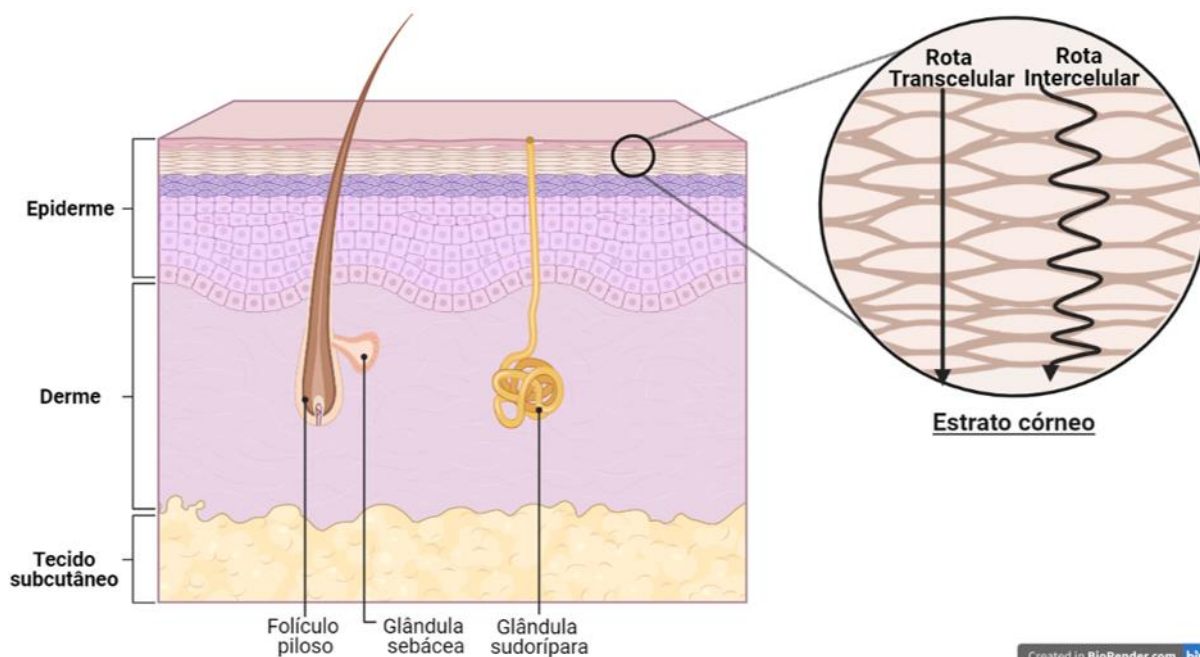


Figura 2. Representação da organização e elementos da estrutura da pele assim como as rotas de penetração de compostos pelo estrato córneo. Pode-se ver a representação da penetração pela rota transcelular e intercelular. Imagem criada com o BioRender.com pelo autor. O website permite o uso das imagens criadas em teses e dissertações.

A penetração de compostos na pele ocorre através da difusão passiva pelo estrato córneo e demais camadas, e também por outros anexos da pele como folículos e glândulas sudoríparas ou sebáceas, porém estes anexos representam apenas 0,1% da superfície, e sua contribuição para o transporte não é considerada majoritária (44). De maneira geral, as rotas de transporte através do estrato córneo são conhecidas como rota intercelular e transcelular: na primeira, os compostos permeiam entre os corneócitos pela matriz lipídica, e na segunda, a difusão ocorre atravessando os corneócitos e a matriz lipídica sucessivamente (**Figura 2**). Pelo fato de ambas terem de atravessar a bicamada lipídica, este é considerado um fator determinante da taxa de transporte percutâneo e, portanto, para que ocorra a difusão, o composto deve ter afinidade com ambientes lipídicos (42, 43, 45).

A penetração cutânea é altamente influenciada pelas características físico-químicas do composto, como suas propriedades hidrofílicas ou lipofílicas, determinadas pelo coeficiente de partição ($\log P$), solubilidade e tamanho da molécula. Moléculas grandes tendem a se difundirem lentamente. Valores altos de $\log P$ são relacionados com a baixa hidrossolubilidade, e portanto moléculas com um $\log P$ entre 1-3 teriam uma melhor difusão pelas camadas lipídicas do estrato córneo (46, 47).

Como citado anteriormente, alguns dos fármacos com ações de quimioprevenção não são considerados bons candidatos à penetração cutânea por si só, e faz-se necessário o uso de estratégias para melhorar a entrega de fármacos na pele. Entre elas, o uso de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos é interessante devido à possibilidade de seleção de componentes a fim de maximizar a penetração cutânea. Aqui propomos a utilização de nanocarreadores, representados por nanoemulsões estabilizadas por fases líquido-cristalinas do tipo lamelar e etossomas para aplicação tópica.

1.4.1 *Nanoemulsões e fase líquido cristalina*

Nanoemulsões (NE) são dispersões constituídas por dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um tensoativo, sendo termodinamicamente instáveis e com diâmetro interno geralmente de até 500 nm (48). São geralmente translúcidas, possuem alta estabilidade cinética, baixa viscosidade e grande área interfacial, o que cria regiões adicionais para solubilização de compostos e favorece a transferência destes para a pele (49, 50). A proporção dos componentes utilizados (tensoativo, fase oleosa e água) alteram sua estrutura interna, podendo ser dos tipos óleo-em-água (O/A) ou de água-em-óleo (A/O).

A fase lamelar é um tipo de fase líquido-cristalina, que se forma mediante a autoagregação de alguns tensoativos e lipídios polares em contato com solventes polares como a água (51). O tensoativo utilizado, seu fator de empacotamento (conceito empregado para moléculas anfifílicas que relaciona o comprimento e volume da cadeia hidrofóbica e área da porção polar indicando a estrutura preferencialmente formada) (52), a temperatura e a quantidade de água utilizada são fatores que influenciam o tipo de fase líquido-cristalina formada (53).

Os tipos mais comuns de fase líquido-cristalina são as fases lamelar, hexagonal e cúbica (**Figura 3**). Fase lamelares ou bicontínuas, são formadas por bicamadas paralelas sobrepostas de tensoativo separadas por camadas de fase aquosa, estas demonstram uma maior semelhança com a matriz lipídica intercelular da pele (54). Devido à estrutura interna da fase lamelar, a água incorporada e concentrada em suas camadas tem uma menor evaporação comparada com formulações semissólidas tradicionais, contribuindo para a hidratação da pele, a qual é considerado um fator que aumenta a penetração cutânea de compostos (55). A fase hexagonal consiste em estruturas cilíndricas formada por micelas, onde a fase aquosa se concentra em um

compartimento separado da fase oleosa por camadas de tensoativo. Dependendo do formato do tensoativo, pode-se obter sistemas normais ou reversos: a fase hexagonal reversa apresenta o interior do cilindro polar, compactado densamente, enquanto que na estrutura normal, o interior é apolar (56). A fase cúbica apresenta estruturas mais complexas, formadas por bicamadas curvas que se estendem tridimensionalmente e são separadas por filmes de água, tendo como característica diferencial a alta viscosidade (57).

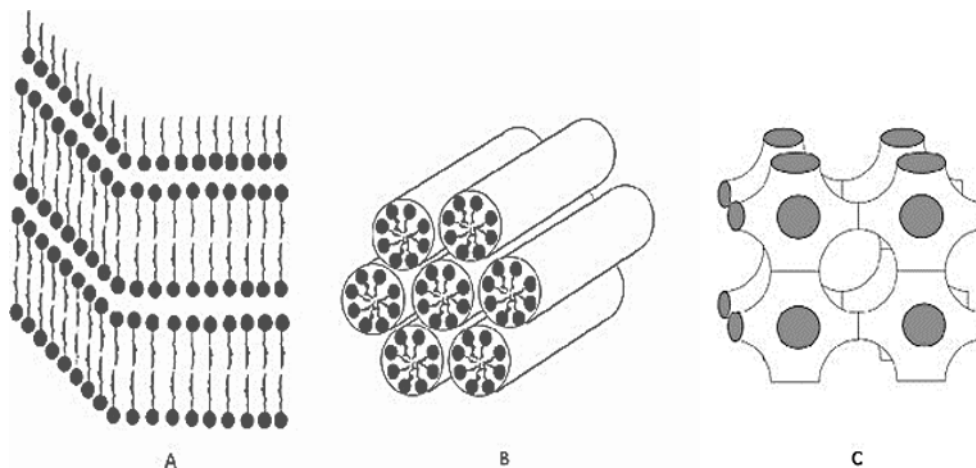


Figura 3. Representação das fases líquido cristalinas. (A) fase lamelar, (B) fase hexagonal, (C) fase cúbica. Adaptado de da Silva et al. 2016.

A utilização de sistemas nanoemulsionados estabilizados por fase lamelar permite combinar as vantagens individuais dos géis de fases lamelares e nanoemulsões, que incluem: (i) estrutura nanométrica das gotículas de fase oleosa, geralmente associada à maior área superficial para transferência de compostos encapsulados na pele; (ii) possibilidade de adicionar promotores de penetração (como ácido oleico e caprílico) em sua composição visando ao aumento da penetração cutânea (iii) maior estabilidade físico-química mediada pela presença de fase líquido-cristalina na fase aquosa; (iv) possibilidade de aumentar a viscosidade comparado à nanoemulsão isolada; e (v) possibilidade de utilizar óleos e manteigas (de menor custo e segurança dermatológica mais bem descrita) em sistemas líquido-cristalinos que normalmente são obtidos com alguns lipídios polares (como monoléina), fosfolipídios (como fosfatidilcolina) e tensoativos (como polisorbatos) (58-61).

Visto o uso prolongado proposto para a quimioprevenção, é essencial produzir formulações seguras, que não causem irritação cutânea, além de serem bem aceitas e de fácil aplicação.

1.4.2 *Etossomas*

Relatados pela primeira vez em 1965 por Alec D. Bangham (62), os lipossomas são nanocarreadores amplamente utilizados na clínica visando à entrega de fármacos, o que se deve à sua composição altamente biocompatível e facilidade de transposição de escala na produção (63, 64). Além disso, são sistemas versáteis que permitem a encapsulação de agentes hidrofílicos e hidrofóbicos e podem ser otimizados para aumentar sua seletividade ao alvo. São formados por uma ou mais bicamadas lipídicas que se organizam em vesículas esféricas com interior aquoso (65).

Com base nisso, os etossomas se diferenciam dos lipossomas por possuírem álcool em sua composição (**Figura 4**) e foram inicialmente descritos em 2000 (66). Isso permite uma maior fluidificação das bicamadas lipídicas proporcionando uma maior flexibilidade da vesícula e alteração do estrato córneo, o que pode favorecer a penetração na pele (67). Na última década, diversos estudos indicaram que os etossomas aumentaram a penetração cutânea e entrega transdérmica de fármacos comparado com os lipossomas convencionais, mostraram-se capazes de promover liberação prolongada e proteger os agentes encapsulados de possíveis degradações (68). Mahmood *et al.* (2018) demonstraram benefícios ao utilizar etossomas na entrega transdérmica de raloxifeno, comparada com outras formulações transdérmicas (gel lipossomal e gel hidroetanólico) os etossomas promoveram maior penetração na e através da pele, atingindo concentrações plasmáticas maiores (69). Outro estudo indicou que etossomas contendo testosterona promoveram maior permeação do fármaco através da pele (seis vezes) comparado a formulações convencionais (70). Esses estudos demonstram o potencial de etossomas em aumentar a penetração de celecoxibe e endoxifeno para que quantidades suficientes para prevenção do desenvolvimento tumoral atinja o tecido mamário.

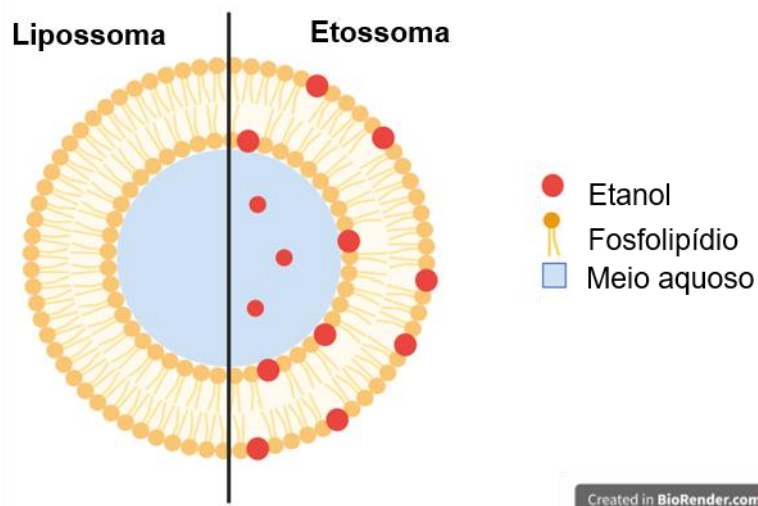


Figura 4. Imagem ilustrando as diferenças na estrutura entre um lipossoma e um etossoma. Imagem criada com o BioRender.com pelo autor. O website permite o uso das imagens criadas em teses e dissertações.

Atualmente existem muitos métodos disponíveis para a obtenção das vesículas. Estes incluem métodos mecânicos como a sonicação e extrusão, métodos de troca de solventes orgânicos no meio aquoso como evaporação de fase reversa e injeção de etanol (71). O método de injeção de etanol é interessante pois é considerado um método simples e reproduzível, foi descrito inicialmente por Batzri e Korn e consiste na solubilização do lipídio em etanol que é adicionado à fase aquosa, levando à precipitação e formação de bicamadas lipídicas que, por meio da dissipação de energia (agitação), se agregam e curvam, dando origem às vesículas (72).

Neste estudo, etossomas foram comparados às nanoemulsões estabilizadas por fase lamelar quanto à capacidade de coencapsular e promover a penetração cutânea de celecoxibe e endoxifeno.

6. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas nanodispersões estabilizadas por fase lamelar capazes de incorporar os fármacos celecoxibe (1%) e endoxifeno (1%), com composição de tensoativo e fase oleosa na proporção de 5:5, 80% de água e ácido oleico ou caprílico a 2 ou 5% como promotores de penetração. A incorporação do fármaco tamoxifeno, precursor do endoxifeno, na nanodispersão aumentou de forma pronunciada a viscosidade e bioadesão do sistema. Dentre as nanoemulsões, o sistema contendo 5% de ácido oleico promoveu um aumento maior da permeabilidade cutânea e na penetração de ambos os fármacos nas camadas viáveis da pele e através do tecido, otimizando o transporte cutâneo. Neste estudo, foram também desenvolvidos sistemas etossomais, que permitiram incorporação de menores quantidades do celecoxibe. A formação de gel contendo alginato de sódio e os etossomas permitiu que o sistema apresentasse propriedade bioadesiva semelhante à nanoemulsão, mas menores quantidades dos fármacos, principalmente o celecoxibe, penetraram nas camadas da pele.

A nanoencapsulação da combinação dos fármacos na nanodispersão contendo 5% de ácido oleico potencializou a redução da viabilidade celular comparado com os fármacos isolados e em solução, indicando o benefício da formulação e da associação dos fármacos. Esses dados nos permitem concluir que, dentre os nanocarreadores avaliados a nanoemulsão é mais promissora para uma potencial contribuição com a quimioprevenção tópica do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018 Nov;68(6):394-424. PubMed PMID: 30207593. Epub 2018/09/13. eng.
2. INCA. Câncer de mama, estatísticas 2020 [cited 2020 10 de janeiro de 2020]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.
3. Cuzick J. Progress in preventive therapy for cancer: a reminiscence and personal viewpoint. *Br J Cancer*. 2018 05;118(9):1155-61. PubMed PMID: 29681616. Pubmed Central PMCID: PMC5943239. Epub 2018/04/23. eng.
4. Colditz GA, Bohlke K. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 2014 2014 May-Jun;64(3):186-94. PubMed PMID: 24647877. Epub 2014/03/19. eng.
5. Alaofi RK, Nassif MO, Al-Hajeili MR. Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer: Review of the literature. *Avicenna J Med*. 2018 2018 Jul-Sep;8(3):67-77. PubMed PMID: 30090744. Pubmed Central PMCID: PMC6057165. eng.
6. Ball S, Arevalo M, Juarez E, Payne JD, Jones C. Breast cancer chemoprevention: An update on current practice and opportunities for primary care physicians. *Preventive Medicine*. 2019 2019/12/01;129:105834.
7. Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002 2002/07/01;2(7):537-43.
8. Penny LK, Wallace HM. The challenges for cancer chemoprevention. *Chem Soc Rev*. 2015 Dec 21;44(24):8836-47. PubMed PMID: 26595684. Epub 2015/11/26. eng.
9. Landis-Piwowar KR, Iyer NR. Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer Growth Metastasis*. 2014;7:19-25. PubMed PMID: 24987270. Pubmed Central PMCID: PMC4064948. Epub 2014/07/06. eng.
10. Martinson HA, Lyons TR, Giles ED, Borges VF, Schedin P. Developmental windows of breast cancer risk provide opportunities for targeted chemoprevention. *Exp Cell Res*. 2013 Jul;319(11):1671-8. PubMed PMID: 23664839. Pubmed Central PMCID: PMC3980135. Epub 2013/05/09. eng.
11. Pruthi S, Heisey RE, Bevers TB. Chemoprevention for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 Oct;22(10):3230-5. PubMed PMID: 26202562. Pubmed Central PMCID: PMC4550636. Epub 2015/07/23. eng.
12. Society AC. Deciding Whether to Use Medicine to Reduce Breast Cancer Risk. 2017.
13. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Dec;81(24):1879-86. PubMed PMID: 2593165. eng.
14. Barke LD, Freivogel ME. Breast Cancer Risk Assessment Models and High-Risk Screening. *Radiol Clin North Am*. 2017 May;55(3):457-74. PubMed PMID: 28411673. eng.
15. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med*. 2004 Apr;23(7):1111-30. PubMed PMID: 15057881. eng.
16. Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R, et al. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. *N Engl J Med*. 1997 May;336(20):1416-21. PubMed PMID: 9145678. eng.
17. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep;90(18):1371-88. PubMed PMID: 9747868. eng.
18. Britt KL, Cuzick J, Phillips K-A. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*. 2020 2020/08/01;20(8):417-36.
19. Caruana D, Wei W, Martinez-Morilla S, Rimm DL, Reisenbichler ES. Association between low estrogen receptor positive breast cancer and staining performance. *npj Breast Cancer*. 2020 2020/02/05;6(1):5.

20. Cuzick J, DeCensi A, Arun B, Brown PH, Castiglione M, Dunn B, et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):496-503. PubMed PMID: 21441069.
21. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007 Dec;116(3):496-526. PubMed PMID: 18001838. Epub 2007/10/09. eng.
22. Waters EA, McNeel TS, Stevens WM, Freedman AN. Use of tamoxifen and raloxifene for breast cancer chemoprevention in 2010. *Breast cancer research and treatment.* 2012 Jul;134(2):875-80. PubMed PMID: 22622807. Pubmed Central PMCID: PMC3771085. Epub 2012/05/25. eng.
23. Roche CA, Tang R, Coopey SB, Hughes KS. Chemoprevention acceptance and adherence in women with high-risk breast lesions. *Breast J.* 2019 03;25(2):190-5. PubMed PMID: 29785770. Epub 2018/05/21. eng.
24. Vogel VG. The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) trial. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 Jan;9(1):51-60. PubMed PMID: 19105706. Pubmed Central PMCID: PMC2785111. eng.
25. Pineda-Moncusí M, Garcia-Giralt N, Diez-Perez A, Servitja S, Tusquets I, Prieto-Alhambra D, et al. Increased Fracture Risk in Women Treated with Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen: Beneficial Effect of Bisphosphonates. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2019 2019/10/09;0(ja).
26. Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL, et al. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res.* 1979 Apr;39(4):1339-46. PubMed PMID: 421218. Epub 1979/04/01. eng.
27. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2101-3. PubMed PMID: 10786667. Epub 2000/04/29. eng.
28. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama JV, Wu Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4653-67. PubMed PMID: 30464589. Pubmed Central PMCID: PMC6208493. Epub 2018/10/26. eng.
29. Mojeiko G, de Brito M, Salata GC, Lopes LB. Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer. *Int J Pharm.* 2019 Apr 5;560:365-76. PubMed PMID: 30772460. Epub 2019/02/18. eng.
30. Jardim DL, De Melo Gagliato D, Nikanjam M, Barkauskas DA, Kurzrock R. Efficacy and safety of anticancer drug combinations: a meta-analysis of randomized trials with a focus on immunotherapeutics and gene-targeted compounds. *Oncoimmunology.* 2020;9(1):1710052-. PubMed PMID: 32002305. eng.
31. Sanchez-Spitman AB, Swen JJ, Dezentje VO, Moes DJAR, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2019 2019/06/03;12(6):523-36.
32. Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009 Mar 1;69(5):1722-7. PubMed PMID: 19244106.
33. Rayburn ER, Ezell SJ, Zhang R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Molecular and cellular pharmacology.* 2009;1(1):29-43. PubMed PMID: 20333321. eng.
34. Brandão RD, Veeck J, Van de Vijver KK, Lindsey P, de Vries B, van Elssen CH, et al. A randomised controlled phase II trial of pre-operative celecoxib treatment reveals anti-tumour transcriptional response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013 Apr;15(2):R29. PubMed PMID: 23566419. Pubmed Central PMCID: PMC3672758. Epub 2013/04/08. eng.
35. Ninomiya I, Nagai N, Oyama K, Hayashi H, Tajima H, Kitagawa H, et al. Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib on human colorectal carcinoma xenografts in nude mouse rectum. *Oncol Rep.* 2012 Sep;28(3):777-84. PubMed PMID: 22751903. Pubmed Central PMCID: PMC3583608. Epub 2012/06/26. eng.
36. Patrono C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br J Clin Pharmacol.* 2016 10;82(4):957-64. PubMed PMID: 27317138. Pubmed Central PMCID: PMC5137820. Epub 2016/07/18. eng.

37. Falandry C, Debled M, Bachelot T, Delozier T, Cretin J, Romestaing P, et al. Celecoxib and exemestane versus placebo and exemestane in postmenopausal metastatic breast cancer patients: a double-blind phase III GINECO study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Aug;116(3):501-8. PubMed PMID: 19020973. Epub 2008/11/21. eng.
38. Prasad V, Diener-West M. Primary chemoprevention of breast cancer: Are the adverse effects too burdensome? *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne.* 2015;187(9):E276-E8. PubMed PMID: 25802306. Epub 2015/03/23. eng.
39. Lee O, Khan SA. Novel routes for administering chemoprevention: local transdermal therapy to the breasts. *Seminars in Oncology.* 2016 2016/02/01/;43(1):107-15.
40. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Research and Technology.* 2018 2018/05/01;24(2):165-74.
41. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Nov 1;54 Suppl 1:S3-17. PubMed PMID: 12460712.
42. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001 Sep;14(2):101-14. PubMed PMID: 11500256. Epub 2001/08/14. eng.
43. Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001 Sep;52(2):103-12. PubMed PMID: 11522474. Epub 2001/08/28. eng.
44. Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U. The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014 2014/04/20/;69-70:81-102.
45. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Feb;65(2):152-68. PubMed PMID: 22525516.
46. Smith RN, Hansch C, Ames MM. Selection of a Reference Partitioning System for Drug Design Work. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1975 1975/04/01/;64(4):599-606.
47. Hadgraft J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004 2004/09/01/;58(2):291-9.
48. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release.* 2017 2017/04/28/;252:28-49.
49. Wang L, Mutch KJ, Eastoe J, Heenan RK, Dong J. Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process. *Langmuir.* 2008 Jun;24(12):6092-9. PubMed PMID: 18489188. Epub 2008/05/20. eng.
50. Sadurní N, Solans C, Azemar N, García-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nanoemulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Dec;26(5):438-45. PubMed PMID: 16153811. Epub 2005/09/08. eng.
51. Rajabalaya R, Musa MN, Kifli N, David SR. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *Drug design, development and therapy.* 2017;11:393-406. PubMed PMID: 28243062. eng.
52. Israelachvili JN, Adams GE. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2.* 1976;72:1525-68.
53. Huang Y, Gui S. Factors affecting the structure of lyotropic liquid crystals and the correlation between structure and drug diffusion. *RSC Advances.* 2018;8(13):6978-87.
54. Muller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 Sep;58(2):343-56. PubMed PMID: 15296960. Epub 2004/08/07. eng.
55. Makai M, Csanyi E, Nemeth Z, Palinkas J, Eros I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *Int J Pharm.* 2003 Apr 30;256(1-2):95-107. PubMed PMID: 12695015. Epub 2003/04/16. eng.
56. Dierking I, Al-Zangana S. Lyotropic Liquid Crystal Phases from Anisotropic Nanomaterials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland).* 2017;7(10):305. PubMed PMID: 28974025. eng.
57. Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov Today.* 2010 Dec;15(23-24):1032-40. PubMed PMID: 20934534. Epub 2010/10/12. eng.

58. Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of Paclitaxel: impact of the monoglyceride. *Pharm Res.* 2013 Mar;30(3):694-706. PubMed PMID: 23135821.
59. Lopes LB, Collett JH, Bentley MV. Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 May;60(1):25-30. PubMed PMID: 15848052. Epub 2005/04/26. eng.
60. Carvalho VFM, Migotto A, Giaccone DV, de Lemos DP, Zanoni TB, Maria-Engler SS, et al. Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Jul 19;109:131-43. PubMed PMID: 28735040. Epub 2017/07/25. eng.
61. dos Santos OD, da Rocha-Filho PA. Influence of surfactant on the thermal behavior of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007 May;33(5):543-9. PubMed PMID: 17520446. Epub 2007/05/24. eng.
62. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology.* 1965 1965/08/01;13(1):238-IN27.
63. Crommelin DJA, van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *Journal of Controlled Release.* 2020 2020/02/01;318:256-63.
64. Rumiana Koynova and Boris T. Recent Progress in Liposome Production, Relevance to Drug Delivery and Nanomedicine. *Recent Patents on Nanotechnology.* 2015;9(2):86-93.
65. Apolinário AC, Salata GC, Bianco AF, Fukumori C, Lopes LB. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS 'ESPAÇO LÁ EMBAIXO. *Química Nova* [Internet]. 2020; 43:[212-25 pp.]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422020000200212&lng=en&nrm=iso.
66. Touthou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Release.* 2000 Apr 3;65(3):403-18. PubMed PMID: 10699298. Epub 2000/03/04. eng.
67. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggat VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 2006 2006/09/28;322(1):60-6.
68. Marto J, Vitor C, Guerreiro A, Severino C, Eleutério C, Ascenso A, et al. Ethosomes for enhanced skin delivery of griseofulvin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2016 2016/10/01;146:616-23.
69. Mahmood S, Mandal UK, Chatterjee B. Transdermal delivery of raloxifene HCl via ethosomal system: Formulation, advanced characterizations and pharmacokinetic evaluation. *International Journal of Pharmaceutics.* 2018 2018/05/05;542(1):36-46.
70. Ainbinder D, Touthou E. Testosterone Ethosomes for Enhanced Transdermal Delivery. *Drug Delivery.* 2005 2005/01/01;12(5):297-303.
71. Charcosset C, Juban A, Valour J-P, Urbaniak S, Fessi H. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design.* 2015 2015/02/01;94:508-15.
72. Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1973 1973/04/16;298(4):1015-9.
73. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2004 2004/03/27;56(5):603-18.
74. Honfo FG, Akissoe N, Linnemann AR, Soumanou M, Van Boekel MA. Nutritional composition of shea products and chemical properties of shea butter: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(5):673-86. PubMed PMID: 24261539. eng.
75. Danby SG, AlEnezi T, Sultan A, Lavender T, Chittock J, Brown K, et al. Effect of olive and sunflower seed oil on the adult skin barrier: implications for neonatal skin care. *Pediatr Dermatol.* 2013 2013 Jan-Feb;30(1):42-50. PubMed PMID: 22995032. Epub 2012/09/20. eng.
76. Raphael AP, Garrastazu G, Sonvico F, Prow TW. Formulation design for topical drug and nanoparticle treatment of skin disease. *Therapeutic Delivery.* 2015 2015/02/01;6(2):197-216.

77. Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 2013 Apr 15;447(1-2):12-21. PubMed PMID: 23462366.
78. Cooper ER. Increased Skin Permeability for Lipophilic Molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1984 1984/08/01/;73(8):1153-6.
79. Kim SA, Rhee MS. Antibacterial activity of caprylic acid for potential application as an active antiseptic ingredient in consumer antiseptics. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2016 2016/12/01/;48(6):765-7.
80. Nobmann P, Smith A, Dunne J, Henahan G, Bourke P. The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 2009 Jan 15;128(3):440-5. PubMed PMID: 19012983. Epub 2008/11/18. eng.
81. Mittal A, Sara UV, Ali A, Aqil M. Status of fatty acids as skin penetration enhancers-a review. *Curr Drug Deliv.* 2009 Jul;6(3):274-9. PubMed PMID: 19604141. Epub 2009/07/17. eng.
82. Engels T, von Rybinski W. Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. *Journal of Materials Chemistry.* 1998;8(6):1313-20.
83. Apolinário AC, Hauschke L, Nunes JR, Lopes LB. Towards nanoformulations for skin delivery of poorly soluble API: What does indeed matter? *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2020 2020/12/01/;60:102045.
84. Moolakkadath T, Aqil M, Ahad A, Imam SS, Praveen A, Sultana Y, et al. Fisetin loaded binary ethosomes for management of skin cancer by dermal application on UV exposed mice. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019 2019/04/05/;560:78-91.
85. Rehman K, Mohd Amin MC, Zulfakar MH. Development and physical characterization of polymer-fish oil bigel (hydrogel/oleogel) system as a transdermal drug delivery vehicle. *J Oleo Sci.* 2014;63(10):961-70. PubMed PMID: 25252741. Epub 2014/09/26. eng.
86. Junqueira Garcia MT, Pedralino Goncalves T, Sao Felix Martins E, Silva Martins T, Carvalho de Abreu Fantini M, Regazi Minarini PR, et al. Improvement of cutaneous delivery of methylene blue by liquid crystals. *Int J Pharm.* 2018 Sep 5;548(1):454-65. PubMed PMID: 30018009. Epub 2018/07/19. eng.
87. Barnes HA, Hutton JF, Walters K. *An Introduction to Rheology* 1989. 200 p.
88. Calixto G, Yoshii AC, Rocha e Silva H, Stringhetti Ferreira Cury B, Chorilli M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. *Pharm Dev Technol.* 2015 Jun;20(4):490-6. PubMed PMID: 25975700. Epub 2015/05/16. eng.
89. Saxena A, Kaloti M, Bohidar HB. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. *Int J Biol Macromol.* 2011 Mar 1;48(2):263-70. PubMed PMID: 21108963. Epub 2010/11/27. eng.
90. Migotto A, Carvalho VFM, Salata GC, da Silva FWM, Yan CYI, Ishida K, et al. Multifunctional nanoemulsions for intraductal delivery as a new platform for local treatment of breast cancer. *Drug Deliv.* 2018 Nov;25(1):654-67. PubMed PMID: 29495885. Epub 2018/03/03. eng.
91. Fonseca-Santos B, Satake CY, Calixto GMF, Dos Santos AM, Chorilli M. Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6883-93. PubMed PMID: 29066884. Pubmed Central PMCID: PMC5604573. Epub 2017/10/27. eng.
92. Perumal V, Banerjee S, Das S, Sen RK, Mandal M. Effect of liposomal celecoxib on proliferation of colon cancer cell and inhibition of DMBA-induced tumor in rat model. *Cancer Nanotechnol.* 2011;2(1-6):67-79. PubMed PMID: 26069486. Pubmed Central PMCID: PMC4451972. Epub 2011/01/01. eng.
93. Estracanhollí EA, Praca FS, Cintra AB, Pierre MB, Lara MG. Liquid crystalline systems for transdermal delivery of celecoxib: in vitro drug release and skin permeation studies. *AAPS PharmSciTech.* 2014 Dec;15(6):1468-75. PubMed PMID: 24980082. Pubmed Central PMCID: PMC4245435. Epub 2014/07/02. eng.

94. Knopp MM, Chourak N, Khan F, Wendelboe J, Langguth P, Rades T, et al. Effect of polymer type and drug dose on the in vitro and in vivo behavior of amorphous solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016 2016/08/01/;105:106-14.
95. Mah CS, Singh Kochhar J, Ong PS, Kang L. A miniaturized flow-through cell to evaluate skin permeation of endoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013 2013/01/30/;441(1):433-40.
96. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57. PubMed PMID: 29783687. eng.
97. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol*. 2013 May;93(3):261-7. PubMed PMID: 23322028. Epub 2013/01/17. eng.
98. Chhabra RP. Non-Newtonian Fluids: An Introduction. In: Krishnan JM, Deshpande AP, Kumar PBS, editors. *Rheology of Complex Fluids*. New York, NY: Springer New York; 2010. p. 3-34.
99. Callens C, Ceulemans J, Ludwig A, Foreman P, Remon JP. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003 2003/05/01/;55(3):323-8.
100. Partal P, Kowalski AJ, Machin D, Kiratzis N, Berni MG, Lawrence CJ. Rheology and Microstructural Transitions in the Lamellar Phase of a Cationic Surfactant. *Langmuir*. 2001 2001/03/01/;17(5):1331-7.
101. Woodley J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration? *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(2):77-84. PubMed PMID: 11286325. eng.
102. Cichewicz A, Pacleb C, Connors A, Hass MA, Lopes LB. Cutaneous delivery of α -tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013 2013/06/01/;65(6):817-26.
103. Aranda EO, Esteve-Romero J, Rambla-Alegre M, Peris-Vicente J, Bose D. Development of a methodology to quantify tamoxifen and endoxifen in breast cancer patients by micellar liquid chromatography and validation according to the ICH guidelines. *Talanta*. 2011 2011/04/15/;84(2):314-8.
104. Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003 Jul 5;791(1-2):245-53. PubMed PMID: 12798184. Epub 2003/06/12. eng.
105. DJ M. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter*. 2012.
106. Singh AK, Yadav TP, Pandey B, Gupta V, Singh SP. Chapter 15 - Engineering Nanomaterials for Smart Drug Release: Recent Advances and Challenges. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas S, editors. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*: Elsevier; 2019. p. 411-49.
107. Ren G, Sun Z, Wang Z, Zheng X, Xu Z, Sun D. Nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method using polyoxypropylene surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019 2019/03/22/;540:177-84.
108. Kumar A, Dixit CK. 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In: Nimesh S, Chandra R, Gupta N, editors. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*: Woodhead Publishing; 2017. p. 43-58.
109. Boyle J. *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2005 2005/01/01/;33(1):74-5.
110. Gosenca M, Bešter-Rogač M, Gašperlin M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013 2013/09/27/;50(1):114-22.
111. Chorilli M, Prestes PS, Rigon RB, Leonardi GR, Chiavacci LA, Sarmento VHV, et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 2011/07/01/;85(2):182-8.

112. Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci.* 2011 Oct 18;100(4):1444-55. PubMed PMID: 20957759. Epub 2010/10/20. Eng.
113. Wiseman H, Paganga G, Rice-Evans C, Halliwell B. Protective actions of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen against oxidative damage to human low-density lipoproteins: a mechanism accounting for the cardioprotective action of tamoxifen? *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 (Pt 3):635-8. PubMed PMID: 8317992. Pubmed Central PMCID: PMC1134159. Epub 1993/06/15. eng.
114. Cintra GA, Pinto LA, Calixto GM, Soares CP, Von Zuben ED, Scarpa MV, et al. Bioadhesive Surfactant Systems for Methotrexate Skin Delivery. *Molecules.* 2016;21(2).
115. Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fangueiro JF, et al. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics.* 2014 2014/10/01/;473(1):591-8.
116. Ibrahim SA, Li SK. Efficiency of fatty acids as chemical penetration enhancers: mechanisms and structure enhancement relationship. *Pharmaceutical research.* 2010;27(1):115-25. PubMed PMID: 19911256. Epub 2009/11/13. eng.
117. Kezutyte T, Desbenoit N, Brunelle A, Briedis V. Studying the penetration of fatty acids into human skin by ex vivo TOF-SIMS imaging. *Biointerphases.* 2013 2013/02/06;8(1):3.
118. Cho YA, Gwak HS. Transdermal delivery of ketorolac tromethamine: effects of vehicles and penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004 Jul;30(6):557-64. PubMed PMID: 15285328. Epub 2004/08/03. eng.
119. Lopes LB, Murphy N, Nornoo A. Enhancement of transdermal delivery of progesterone using medium-chain mono and diglycerides as skin penetration enhancers. *Pharm Dev Technol.* 2009;14(5):524-9. PubMed PMID: 19552564. Epub 2009/06/26. eng.
120. Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29;102(13):4688-93. PubMed PMID: 15774584. Pubmed Central PMCID: 555729.
121. Pepe D, McCall M, Zheng H, Lopes LB. Protein Transduction Domain-Containing Microemulsions as Cutaneous Delivery Systems for an Anticancer Agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013 2013/05/01/;102(5):1476-87.
122. Lee O, Khan SA. Novel routes for administering chemoprevention: local transdermal therapy to the breasts. *Semin Oncol.* 2016 Feb;43(1):107-15. PubMed PMID: 26970129. Epub 2016/03/13. eng.
123. Krauss AC, Gao X, Li L, Manning ML, Patel P, Fu W, et al. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2019 May 1;25(9):2685-90. PubMed PMID: 30541745. Epub 2018/12/14. eng.
124. Meng J, Guo F, Xu H, Liang W, Wang C, Yang X-D. Combination Therapy using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in vivo. *Scientific reports.* 2016;6:22390-. PubMed PMID: 26947928. eng.
125. Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdich RG, Vladislavljević GT. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes - investigation of the process parameters and application to the encapsulation of vitamin E. *RSC Advances.* 2013;3(15):4985-94.
126. Abdulbaqi IM, Darwis Y, Khan NAK, Assi RA, Khan AA. Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International journal of nanomedicine.* 2016;11:2279-304. PubMed PMID: 27307730. eng.
127. Severcan F, Kazanci N, Zorlu F. Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations. *Biosci Rep.* 2000 Jun;20(3):177-84. PubMed PMID: 11095117. Epub 2000/11/30. eng.
128. Engelke M, Bojarski P, Bloß R, Diehl H. Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophysical Chemistry.* 2001 2001/04/10/;90(2):157-73.
129. Carvalho FC, Bruschi ML, Evangelista RC, Gremião MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010;46:1-17.

130. Giacone DV, Dartora VFMC, de Matos JKR, Passos JS, Miranda DAG, de Oliveira EA, et al. Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020 2020/12/15/;165:1055-65.
131. Dai Z-J, Ma X-B, Kang H-F, Gao J, Min W-L, Guan H-T, et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell International*. 2012 2012/12/19;12(1):53.
132. Xu H-B, Shen F-M, Lv Q-Z. Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in drug-resistant human gastric cancer cells by inhibition of cyclooxygenase-2. *European Journal of Pharmacology*. 2015 2015/12/15/;769:1-7.
133. Helland T, Gjerde J, Dankel S, Fenne IS, Skartveit L, Drangevåg A, et al. The active tamoxifen metabolite endoxifen (4OHNDtam) strongly down-regulates cytokeratin 6 (CK6) in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122339. PubMed PMID: 25867603. Pubmed Central PMCID: PMC4395096. Epub 2015/04/14. eng.
134. Johnson MD, Zuo H, Lee K-H, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, et al. Pharmacological Characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl Tamoxifen, a Novel Active Metabolite of Tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004 2004/05/01;85(2):151-9.
135. Menéndez JA, del Mar Barbacid M, Montero S, Sevilla E, Escrich E, Solanas M, et al. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *European Journal of Cancer*. 2001;37(3):402-13.