VANESSA FRANCO CARVALHO DARTORA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES
MULTIFUNCIONAIS PARA CO-LOCALIZAÇÃO
CUTÂNEA DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

VANESSA FRANCO CARVALHO DARTORA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES
MULTIFUNCIONAIS PARA CO-LOCALIZAÇÃO CUTÂNEA
DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Franco Carvalho Dartora, Vanessa
DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES
MULTIFUNCIONAIS PARA CO-LOCALIZAÇÃO CUTÂNEA DE
AGENTES QUIMIOTERÁPICOS / Vanessa Franco Carvalho
Dartora; orientadora Luciana Biagini Lopes. -- São
Paulo, 2016.
109 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Nanocarreadores. 2. Citotoxicidade. 3.
Tumores Cutâneos. 4. Paclitaxel. 5. Ceramida. I.
Biagini Lopes, Luciana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Franco Carvalho Dartora

Título da Dissertação: **DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES
MULTIFUNCIONAIS PARA CO-LOCALIZAÇÃO CUTÂNEA DE AGENTES
QUIMIOTERÁPICOS**

Orientador(a): Luciana Biagini Lopes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - Telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 695/14 referente ao projeto intitulado: “*Nanocarreadores para a co-localização cutânea de agentes quimioterápicos*” sob a responsabilidade de **Vanessa Franco Marcelo Carvalho**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 23 de setembro de 2014.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Márcio, por estar sempre ao meu lado, meu porto seguro. Pelo seu apoio, companheirismo, respeito e incentivo. Pela paciência e compreensão nos momentos difíceis. Por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, e por sempre estar presente e participando de tudo em minha vida. Com amor e carinho, dedico-lhe este trabalho.

Aos meus pais, exemplos de dignidade e perseverança. Vocês são minha referência e me ensinaram que devemos trabalhar e nos esforçar para merecer o que desejamos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que iluminou meu caminho durante esta jornada, sempre colocando as pessoas certas em minha vida.

À minha orientadora Professora **Luciana Lopes**, tenho muito a lhe dizer, mas realmente palavras podem ser insuficientes. Obrigada pela sua disponibilidade sempre, pelos conselhos e pela orientação nesse processo de aprendizagem que é o mestrado. Seu pelo carinho, sua persistência e apoio incondicional foram fundamentais para a finalização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo do processo. Sou eternamente grata pelo apoio e por ter compartilhado comigo seu conhecimento, sua amizade e seu tempo. Tenha em mim sempre a imagem de alguém com quem pode contar.

À Professora **Letícia Lotufo**, que me surpreendeu e consegue me surpreender todos os dias! É uma honra ter tido a oportunidade de trabalhar com uma pessoa tão inteligente, competente e ao mesmo tempo, suave, alegre e sorridente. Obrigada pela ajuda com meus experimentos, por ter me ensinado e me orientado. Foi e sempre será um prazer trabalhar em sua equipe.

À Professora **Silvy Stuchi** que me permitiu trabalhar com seu fantástico modelo de pele e conhecer um pouco da rotina em seu laboratório. Foram momentos valiosos.

À **Thalita** que trabalhou com tanto carinho e dedicação nos experimentos de pele para que tudo, no final, desse certo. Foi um presente e uma inspiração conhecer uma pessoa tão apaixonada pelo que faz.

Ao professor **Emer Ferro**, por ter aberto as portas de seu ambiente de trabalho, o que me proporcionou a oportunidade de trabalhar com o HPLC e aprender muitas coisas das quais vou levar adiante em minha carreira.

À professora **Carolina Munhoz**, obrigada pelos empréstimos de equipamento, e não só por isso, mas pelas conversas e risadas. Você é uma pessoa doce e carinhosa, e ter alguém assim por perto sempre nos deixa mais felizes e com a sensação boa de um ambiente mais leve.

À minha amiga **Tuanny**, sempre presente! Obrigada por me aceitar como sou e por ter se tornado uma irmã que a vida me deu de presente e que eu escolhi conviver. Obrigada pelas risadas altas, os almoços nem sempre tão deliciosos, os desabafos, os cafés, e acima de tudo, obrigada por caminhar ao meu lado essa jornada. Você é uma pessoa especial e sem dúvidas fez os dias mais coloridos desde que nos conhecemos no mestrado. Você mora no meu coração.

Aos meus colegas de laboratório, **Eduardo, Rogério, Débora, Amanda e Daniela**. Obrigada pelo companheirismo e por sempre se mostrarem dispostos a ajudar, mesmo que com um afago ou palavras amigas.

As meninas lindas do LAFARMAR, **Evelyne, Bianca e Paola**. Obrigada por sempre me estenderem a mão quando precisei e por me ensiarem sempre, vocês são um exemplo de companheirismo.

Aos demais alunos e funcionários do ICB/USP que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto. Em especial as superpoderosas **Mônica e Camila**, tenho muito carinho e respeito por vocês.

Agradeço aos meus irmãos, **Luciana e Otavinho**, por sempre estarem presentes em minha vida, por acreditarem que eu posso fazer algo de bom. “Ter um irmão é ter, para sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração”. Vocês são meu porto seguro e meus parceiros no futuro.

À minha amada avó **Irahydes** e ao meu tio **Oscar** que sempre me apoiam e me incentivam nesta jornada em busca de novos horizontes, e minha tia **Dilma**, obrigada por ser a melhor tia sempre, saiba que foi ao seu lado que eu pude perceber o verdadeiro sentido da palavra carinho. Obrigada pela confiança, amizade e respeito.

Agradeço ao meu esposo, **Márcio** que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem. Seu apoio possibilitou que eu superasse os momentos de dificuldades. Você ilumina meus dias, meu companheiro, meu amigo, meu amor!

Aos meus pais **Otávio e Marisa** pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Obrigada por acreditarem e me apoiarem em minhas escolhas. A vocês, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que me orientaram pelos caminhos obscuros com afeto e dedicação para que a caminhada fosse ausente de medo e cheia de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não basta dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso, toda a vida com que vocês completam o meu ser. Esse amor, o amor que sinto por vocês, é uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo muito vocês!

Agradeço a CAPES e a FAPESP pelo incentivo financeiro.

RESUMO

Carvalho VFM. Desenvolvimento de nanocarreadores multifuncionais para co-localização cutânea de agentes quimioterápicos. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Neste projeto propomos o desenvolvimento de nanocarreadores para a co-localização cutânea dos agentes ativos paclitaxel e ceramida C6 visando o tratamento de tumores que atingem a pele. O paclitaxel é extremamente eficaz contra uma variedade grande de tumores, e sua associação à ceramida C6 foi realizada visando potencializar seus efeitos citotóxicos. Duas microemulsões e uma nanoemulsão foram selecionadas a fim de comparar o efeito (i) da concentração de monocaprilina nas microemulsões e (ii) dos tipos de nanocarreadores sobre a permeabilidade cutânea e co-localização dos compostos ativos. Paclitaxel e ceramida C6 foram incorporados a 0,5 e 0,35% (m/m) respectivamente em micro e nanoemulsões. Todas apresentaram diâmetro inferior a 100 nm e potencial zeta levemente negativo (-6,12 a -9,12). O tratamento da pele com nanocarreadores selecionados por 8 h promoveu aumento (2,03 a 2,55 vezes) da perda de água transepidérmica comparado ao controle (água), indicando que a habilidade das formulações em reduzir a função barreira é semelhante, e independe da concentração de monocaprilina nas microemulsões e tipo de nanocarreador. O transporte e co-localização dos fármacos na/atraves da pele foram avaliados por 8 h utilizando secções de pele de orelha de porco como modelo, sendo que, a nanoemulsão mostrou-se mais eficaz em promover a penetração de ambos os compostos em camadas viáveis da pele, promovendo aumentos de 11,5 e 3,5 vezes no transporte de paclitaxel e ceramida, respectivamente. Esse aumento da penetração cutânea foi acompanhado por um aumento muito menos pronunciado na permeação transdérmica, sendo menor que 0,5 vezes comparado ao controle. A avaliação do potencial irritativo dos nanocarreadores em equivalentes de epiderme humana, mostrou que, embora nenhum deles reduza a viabilidade dos tecidos para abaixo de 50% como o irritante lauril sulfato de sódio, o efeito da nanoemulsão é 3,2 vezes menos pronunciado, justificando sua escolha para etapas subsequentes. O efeito da encapsulação dos fármacos individualmente na nanoemulsão e da combinação entre eles sobre a viabilidade das células de melanoma humano (SK MEL 19) foi avaliada após exposição por 24 h. As concentrações de paclitaxel e ceramida necessárias para reduzir a viabilidade celular a 50% quando incorporados na nanoemulsão foi aproximadamente 6 e 15 vezes menor, respectivamente, comparado aos fármacos em solução. Uma redução de 4 vezes nessas concentrações foi observada quando os fármacos foram co-encapsulados na nanoemulsão sugerindo o potencial benefício do nanocarreador e da combinação de fármacos. A administração tópica do nanocarreador contendo paclitaxel e ceramida promoveu desorganização e destruição celular em equivalentes de pele com melanoma. Esses resultados sugerem que a nanoemulsão promove a co-localização dos compostos na pele e que a combinação dos fármacos no nanocarreador promove aumento dos efeitos citotóxicos, representando uma estratégia promissora para o tratamento localizado de tumores cutâneos.

Palavras-chave: Nanocarreadores. Citotoxicidade. Tumores cutâneos. Paclitaxel. Ceramida.

ABSTRACT

Carvalho VFM. Development of multifunctional nanocarriers for skin co-localization of chemotherapeutic agents. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

In this study, we proposed the development of nanocarriers for skin co-localization of the active agents paclitaxel and C6 ceramide aimed at treating tumors affecting the skin. Paclitaxel is extremely effective against a variety of tumors, and its association with C6 ceramide was carried out to enhance the cytotoxic effects. Two microemulsion and a nanoemulsion were selected to compare the effect of (i) the concentration of the monocaprylin in the microemulsion and (ii) the types of nanocarriers on skin permeability and transport of active compounds. Paclitaxel and C6 ceramide were added to 0,5 and 0,35% (w/w) respectively, to micro and nanoemulsions. All displayed a diameter of less than 100 nm and slightly negative zeta potential (-6,12 to -9,12). The skin treatment with the formulations selected for 8 h promoted increases (2,03 to 2,55-fold) in the transepidermal water loss compared to water, indicating that the ability of formulations to reduce the barrier function is similar and independent of the concentration monocaprylin and type of nanocarrier. The transport and co-localization of the drug in / through the skin were evaluated for 8 h using pig ear skin sections as tissue model, wherein the nanoemulsion was more effective in promoting the penetration of both compounds in viable layers of the skin, promoting increases of 11,5 and 3,5-fold in the transport of paclitaxel and ceramide, respectively. This increase in the skin penetration was accompanied by a much less pronounced increase in the transdermal permeation (less than 0,5-fold compared to the control). The assessment of the irritation potential of the nanocarriers in equivalents of human epidermis showed that, although none of them reduced the tissue viability to below 50% as the irritant sodium lauryl sulfate, the effect of the nanoemulsion was 3,2-fold less pronounced, justifying its choice for subsequent steps. The effect of encapsulating the drugs individually in the nanoemulsion and their combination on the viability of human melanoma cells (SK MEL 19) was assessed after 24 h of exposure. Paclitaxel and ceramide concentrations required to reduce cell viability to 50% when incorporated into the nanoemulsion was approximately 6 and 15-times lower, respectively, compared to drugs in solution. A reduction of 4-times in such concentrations was observed when the drugs were co-encapsulated in the nanoemulsion, suggesting the potential benefit of the nanocarrier and drug combination. Topical administration of the nanocarrier containing paclitaxel and ceramide promoted disorganization and cell destruction in skin equivalents with melanoma. These results suggest that the nanoemulsion promotes the co-localization of the compounds on the skin and that the combination of drugs in the nanocarrier increased cytotoxic effects, represents a promising strategy for localized treatment of skin tumors.

Keywords: Nanocarriers. Cytotoxicity. Skin tumors. Paclitaxel. Ceramide.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E EQUAÇÕES

Figura 1- Rotas de permeação através do estrato córneo.	17
Figura 2- Representação da molécula de paclitaxel.	22
Figura 3- Tipos de Microemulsões.	25
Figura 4- Nanoemulsão.	26
Figura 5- Papel dos componentes da microemulsão.	30
Figura 6- Papel dos componentes da nanoemulsão.	31
Figura 7- Diagramas de fase pseudoternários: relação entre a mistura de tensoativos e formação de microemulsões.	44
Figura 8- Diagramas de fase pseudoternários: relação entre a composição de fase oleosa e formação de microemulsões	45
Figura 9- Influência do teor de água sobre a condutividade eléctrica e a viscosidade das amostras..	47
Figura 10- Comportamento reológico das microemulsões	49
Figura 11- Comportamento reológico da nanoemulsão.	50
Figura 12- Formulações visualizadas sob luz polarizada.	51
Figura 13- Gráficos representativos da distribuição de tamanho de partículas das formulações seleccionadas antes da centrifugação	52
Figura 14- Gráficos representativos do potencial zeta das formulações antes e após a centrifugação	54
Figura 15- Gráficos representativos da distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta das formulações seleccionadas contendo fármacos.	55
Figura 16- Efeito das microemulsões e nanoemulsão sobre a perda de água transepidérmica.....	56
Figura 17- Método analítico para quantificação do paclitaxel.	57
Figura 18- Curva padrão da ceramida	58
Figura 19- Penetração cutânea de paclitaxel.	61
Figura 20- Penetração cutânea de ceramida.	64
Figura 21- Micrografias da pele após tratamento contendo derivados fluorescentes dos fármacos ...	65
Figura 22- Potencial irritativo baseado da viabilidade dos tecidos.	67
Figura 23- Histologia dos tecidos: Potencial irritativo.	68
Figura 24- Comparação entre a porcentagem de viabilidade celular e a concentração de NE vazia com ou sem Tributirina.	69
Figura 25- Viabilidade celular resultante da exposição de células aos fármacos incorporados na NE ou livres em solução controle de DMSO.	70
Figura 26- Relação entre a viabilidade celular e a concentração de NE	71
Figura 27- Porcentagem das células viáveis em função da concentração de paclitaxel, ceramida, e a combinação de paclitaxel e ceramida incorporados na nanoemulsão.	73
Figura 28- Microscopia óptica mostrando um modelo de pele (3D) reconstituído.	74
Figura 29- Microscopia óptica mostrando um modelo de pele (3D) reconstituído com melanoma humano.	76

Tabela 1- Razões entre os componentes da mistura de tensoativos e fase oleosa utilizadas no desenvolvimento de microemulsões.....	29
Tabela 2- Composição das microemulsões selecionadas.....	30
Tabela 3- Área de formação da microemulsões tomando como referência a área total do diagrama	45
Tabela 4- Tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade (IPD) e pH das formulações antes e após a centrifugação.....	53
Tabela 5- Tamanho, IPD e potencial zeta das formulações após a incorporação do fármaco.....	54
 Equação 1- Cálculo viabilidade celular.....	 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CER – Ceramida C6

DMSO – Dimetilsulfóxido

EC – Estrato Córneo

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ETOH – Etanol

EV – Epiderme Viável

FR – Fase Receptora

HE – Hematoxilina –eosina

HPLC – High Performace Liquid Chromatography – Cromatografia líquida de alta performace

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPD – Índice de Polidispersidade

MC – Monocaprilina

ME – Microemulsão

MIG – Migliol

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol] 2,5-dipeniltetrazólio

NE – Nanoemulsão

NT – Não Tratado

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development

PAC – Paclitaxel

PBS – Tampão fosfato salino

PG – Propilenoglicol

SDS - lauril sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

TRI – Tributirina

vitE - Vitamina E TPGS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Pele e transporte cutâneo	15
1.2 Tumor Cutâneo	18
1.3 Associação entre paclitaxel e ceramida C6	21
1.4 Formulações nanodispersas	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Desenvolvimento e Seleção de Nanocarreadores	28
3.1.1 Microemulsões	28
3.1.2 Nanoemulsões	30
3.2 Caracterização das Formulações	32
3.3 Teste Preliminar de Estabilidade	34
3.4 Incorporação dos Fármacos nas Formulações	34
3.5 Efeito das Formulações sobre a Permeabilidade Cutânea	35
3.6 Avaliação da Penetração Cutânea	35
3.6.1 Estudo <i>In Vitro</i> de Penetração Cutânea	35
3.6.2 Visualização <i>In Vitro</i> da Penetração Cutânea por Microscopia de Fluorescência	37
3.7 Quantificação dos fármacos	37
3.8 Potencial Irritativo das Formulações – OECD GUIA 439	38
3.9 Avaliação <i>In Vitro</i> do Efeito Citotóxico da Nanoemulsão	39
3.9.1 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT	40
3.9.2 Avaliação histológica do efeito citotóxico de NE contendo Paclitaxel e Ceramida C6 em modelos de pele reconstruída com melanoma	41
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Desenvolvimento Das Microemulsões	43
5.1.1 Diagramas de Fase	43
5.2 Caracterização e Teste Preliminar de Estabilidade das Formulações	46
5.2.1 Condutividade elétrica e viscosidade	46
5.2.1.1 Microemulsões	46
5.2.1.2 Nanoemulsões	49

5.2.2 Avaliação da isotropia utilizando microscopia de Luz Polarizada.....	50
5.2.3 pH.....	51
5.2.4. Tamanho das gotículas por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão.....	51
5.2.5. Potencial Zeta	53
5.3 Incorporação dos Fármacos	54
5.4 Efeito das Formulações sobre a Permeabilidade Cutânea: perda de água transepidermica	55
5.5 Avaliação da Penetração Cutânea	56
5.5.1 Método analítico para quantificação dos fármacos	56
5.5.1.1 Paclitaxel.....	56
5.5.1.2 Ceramida.....	57
5.5.2 Estudo In Vitro de Penetração Cutânea	58
5.5.2.1 Paclitaxel.....	58
5.5.2.1 Ceramida.....	61
5.2.3 Visualização In Vitro da Penetração Cutânea por Microscopia de Fluorescência	64
5.6 Potencial Irritativo das Formulações.....	66
5.7 Avaliação In Vitro do Efeito Citotóxico da Nanoemulsão	69
5.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular.....	69
5.9.2 Avaliação Histológica do efeito citotóxico de NE contendo Paclitaxel e Ceramida C6 em modelos de pele reconstruída de melanoma	73
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS*	90

1 INTRODUÇÃO

O tumor cutâneo é um problema de saúde pública que afeta milhares de pessoas mundialmente, sendo considerada a neoplasia mais comum (Bakos et al., 2013). São classificados como *Melanoma* e *Não Melanoma*, sendo a forma não melanoma mais frequente (Bakos et al., 2013). Como opção de tratamento de tumores de pele, atualmente dispõe-se de procedimentos cirúrgicos e não-cirúrgicos, e a escolha do tratamento depende do tipo e estágio das lesões (Galiczynski et al., 2011; Wainstein et al., 2004).

Existem casos em que o procedimento cirúrgico não pode ser evitado, mas fica claro que formulações tópicas para a terapia menos invasiva são preferíveis em diversos casos a fim de minimizar danos físicos e psicológicos pelo desfiguramento por cicatrizes, quelóides e intumescimento da região (Galiczynski et al., 2011; Tull et al., 2008). Além disso, existem casos em que o paciente não pode ser operado devido à idade ou estado de saúde, e aqueles casos em que o tumor se localiza em local de difícil acesso cirúrgico (Tull et al., 2008). Entretanto, existem poucas terapias tópicas disponíveis atualmente, e as mesmas são de baixa ou variável eficácia e causam irritação local, o que reduz a adesão dos pacientes ao tratamento (Amini et al., 2010). Sendo assim, é importante que uma formulação segura, eficaz e passível de ser auto-administrada para localização de agentes ativos no local do tumor seja elaborada, de modo a reduzir sua exposição sistêmica e consequentemente, os efeitos adversos (Soares et al., 2013).

Considerando que o desenvolvimento e progressão de tumores é multifatorial, propomos aqui o desenvolvimento de nanocarreadores multifuncionais como uma alternativa para o tratamento de tumores cutâneos, ou seja, nanocarreadores contendo uma combinação de agentes ativos capazes de atuar em vias diferentes e potencializar os efeitos uns dos outros. Mais especificamente, propomos o desenvolvimento de novas micro e nanoemulsões que associem o paclitaxel e ceramida C6 a fim de potencializar os efeitos de cada fármaco (Baspinar et al., 2010; Selzner et al., 2001; Silva et al., 2010).

1.1 Pele e transporte cutâneo

Para entender melhor o tumor cutâneo é necessário descrever como é a pele normal. A pele é composta por duas camadas: epiderme e derme. Vale

ressaltar que alguns autores consideram também a hipoderme como parte da pele (Shai et al., 2009). É o um dos maiores órgãos do corpo humano, servindo como um revestimento externo, sendo que sua espessura pode variar e atingir 4 mm dependendo da região do corpo (Barry, 1983; Shai et al., 2009). Atua como barreira protetora (impedindo a penetração de agentes externos como microorganismos, radiação ultravioleta, traumatismos físicos e térmicos), auxilia na regulação da temperatura corporal, produz vitamina D e atua como órgão sensorial (Barry, 1983; Shai et al., 2009).

A derme é localizada logo abaixo da epiderme e é composta por fibras de colágeno e elastina e pelo material intercelular da derme. A derme possui algumas células especializadas, incluindo os folículos capilares, glândulas sebáceas, apócrinas e sudoríparas, folículo piloso e também vasos sanguíneos e nervos relacionados às sensações de toque, temperatura e dor (Barry, 1983; Gordon, 2013; Shai et al., 2009).

A epiderme é um tecido estratificado queratinizado, composto por queratinócitos (principalmente), melanócitos e células de Merkel. Cinco subcamadas diferentes podem ser encontradas:

- estrato basal, a sub-camada mais profunda e constituída por células colunares com capacidade de multiplicação, sendo responsável pelo processo de renovação celular. Os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, estão presentes nesta camada (Barry, 1983; Gordon, 2013; Shai et al., 2009).
- camada espinosa: caracterizada pela abundância de desmossomos e pela presença dos “corpos lamelares”, vesículas que contém discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas empacotados.
- estrato granuloso: onde as células perdem seus núcleos e secretam lipídios para os espaços intercelulares,
- estrato lúcido: presente na palma das mãos e planta dos pés, conferindo maior espessura à pele nessas regiões
- estrato córneo: mais superficial das subcamadas, composto de células queratinizadas frouxamente ligadas e embebidas em matriz lipídica altamente organizada. Tem a função de barreira, protegendo as camadas subjacentes.

O estrato córneo é formado por 15 a 25 camadas de corneócitos, intercaladas por camadas lipídicas densas, sendo portanto, muitas vezes descrito como uma estrutura do tipo "tijolos e argamassa". A matriz lipídica intracelular

compreende principalmente uma mistura de ceramidas, colesterol, triglicérides e ácidos graxos (Anissimov et al., 2013; Wertz, Downing, 1989; Jepps et al., 2013). Embora o estrato córneo seja uma camada relativamente fina, é reconhecida como a que oferece maior resistência para o transporte de substâncias através da pele. As propriedades de barreira são baseadas no conteúdo específico e composição dos lipídios do estrato córneo e, em particular, no arranjo estrutural excepcional da matriz intercelular e o envelope lipídico que rodeia as células (Egawa et al., 2007; Ya-Xian et al., 1999).

A permeação de fármacos através da pele ocorre principalmente por difusão passiva. Podem ser identificados dois caminhos principais (figura 1) através da barreira intacta: a via de lipídios intercelulares entre os corneócitos e a via transcelular atravessando os corneócitos e os lipídios intervenientes; em ambos os casos o permeante deve difundir-se em algum momento através da matriz de lipídios intercelulares, que é agora reconhecido como o principal fator determinante da velocidade de transporte percutâneo (Moser et al., 2001). A permeação também pode ocorrer via apêndices, na qual os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas; no entanto, a absorção por essa via não tem a mesma significância já que essas estruturas ocupam uma pequena parte de toda a superfície da pele (0,1% da área total da pele) (Kitson et al., 2000; Trommer et al., 2006).

Figura 1- Rotas de permeação através do estrato córneo: (i) através da matriz de lipídios entre os corneócitos (via intercelular) e (ii) atravessando sucessivamente os corneócitos e a matriz lipídica intercelular (via transcelular) (adaptado de Moser et al., 2001).

1.2 Tumor Cutâneo

Tumores cutâneos são normalmente classificados como melanoma maligno e não melanoma, que inclui carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular como os principais subtipos (Gordon, 2013). O número real de casos dos tipos mais comuns de tumores de pele (basocelular e espinocelular) referidos como câncer de pele não melanoma é muito difícil de se estimar porque estes casos não são obrigados a serem relatados para registros de câncer. A Sociedade Americana de Câncer estima que foram diagnosticados mais de 1,6 milhões de novos casos de neoplasia cutânea (incluindo carcinoma de pele não melanoma) em 2012 (American Cancer Society, 2012; Gordon, 2013). Em seu estudo, Rogers estimou que 5,4 milhões de casos de câncer de pele não melanoma foram diagnosticadas em 2012 (Rogers, 2015). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que em 2014 - 2015 o número de novos casos de tumor cutâneo não melanoma seria 182.130. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é menor comparado aos tumores não melanoma; o INCA estima 2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres para 2014 - 2015 (INCA, 2014). Dentre os fatores de risco para o surgimento de neoplasias cutâneas, podemos citar a idade avançada (indivíduos com mais de 50 anos tem uma tendência muito maior em desenvolver esse tipo de neoplasia), a cor da pele e olhos, fatores genéticos, número de melanócitos e a exposição ao sol (Carvalho et al., 2004; Gordon, 2013; Hegde et al., 2013).

O carcinoma basocelular representa aproximadamente 80% dos cânceres de pele não melanoma e está relacionado a exposições à radiação ultravioleta, mas essa relação é mais complexa, e estudos até à data tem demonstrado que alterações na via hedgehog estão associadas ao desenvolvimento desse tipo de tumor cutâneo (Amini et al., 2010; Arad et al., 2008; Feuerstein et al., 2008; Roewert-Huber et al., 2007; So et al., 2004; Youssef et al., 2010).

O carcinoma do tipo basocelular é uma neoplasia derivada geralmente das células basais e aparece sem lesões precursoras, mas a sua origem ainda é motivo de certa controvérsia, pois também há evidências de se originarem a partir de células pluripotentes imaturas da epiderme interfolicular e da bainha externa do folículo piloso (Donovan et al., 2009; Gloster et al., 1996; Kopke et al., 2002; Rocha et al., 2004; Roewert-Huber et al., 2007; Youssef et al., 2010). Afirmação que se

baseia em experimentos de ativação da via hedgehog em diferentes compartimentos da epiderme e na expressão das citoqueratinas com padrão folicular (Armstrong et al., 1993; Gallagher et al., 1995; Orsini et al., 2001; Wetzig et al., 2009; Yousse et al., 2010). Essa hipótese da associação do carcinoma basocelular com anormalidades no gene embrionário do desenvolvimento folicular SHH (sonic hedgehog) é fortalecida pela raridade de lesões palmoplantares e de mucosas, onde não se encontram folículos pilosos (Betti et al., 2005; Donovan et al., 2009).

Estudos também nos mostram que a proteína *patched*, um receptor para a proteína hedgehog que reprime a via de sinalização de hedgehog, é mutada na linha germinal dos pacientes com síndrome do nevo basocelular (predisposição pronunciada para carcinomas basocelulares) e também em muitos carcinomas basocelulares esporádicos (Aszterbaum et al., 1998; Hahn et al., 1996; Ingham et al., 1998; Johnson et al., 1996; Scott et al., 1998; So et al., 2004). O gene *Patched1* tem emergido como um importante supressor tumoral (So et al., 2004).

Mais comumente, o carcinoma basocelular apresenta-se como uma pequena pápula caracteristicamente brilhante, com bordas peroladas, vasos ingurgitados proeminentes na superfície e uma úlcera central (Maden et al., 2010). A metástase é rara, mas o crescimento local pode ser altamente destrutivo (Maden et al., 2010).

O carcinoma espinocelular corresponde aproximadamente a 16% de casos de câncer de pele não melanoma causados pela exposição solar cumulativa (Porter, 2011). Ao contrário de carcinoma de células basais, podem ter lesões precursoras, como queratoses actínicas e carcinomas de células escamosas *in situ* (doença de Bowen) (Röwert-Huber et al., 2007; Salasche, 2000). É um tumor maligno que invade a derme, podendo ocorrer destruição extensa do tecido local, metástases através do sistema linfático ou disseminação hematogênica (através da circulação sanguínea) em estágios avançados. As características clínicas do carcinoma espinocelular incluem pápulas, placas ou nódulos, hiperqueratose e lesões erosivas (Firnhaber, 2012; Porter, 2011).

O melanoma maligno representa apenas 4% dos casos de câncer de pele, e corresponde a 65% das mortes causadas por câncer de pele (Cummins et al., 2006; Porter, 2011). É derivado de melanócitos epidérmicos (Cummins et al., 2006; Gandini et al., 2005; Porter, 2011) e suas características clínicas podem variar muito. A regra ABCDE descreve os sinais clínicos de apresentação e de aviso para a

maioria dos melanomas: " A " representa assimetria; " B " significa irregularidade das bordas; " C " significa cor (a pigmentação não é uniforme); 'D' 'significa diâmetro (superior a 6 mm); e " E " representa a evolução, elevação e / ou aumento de uma lesão (American Cancer Society, 2012; Cummins et al., 2006).

Existem diversos tipos de tratamento para os tumores cutâneos. O objetivo principal do tratamento é a remoção completa ou destruição da lesão, sendo que a obtenção de um resultado estético bom e aceitável é um objetivo secundário importante para a saúde mental do paciente (Bath-Hextall et al., 2007). A escolha do tratamento depende de vários fatores, incluindo a natureza clínica e histológica, tamanho e localização da lesão, comorbidades, disponibilidade e custos de tratamento. Os procedimentos cirúrgicos ainda são a base do tratamento, e exemplos de situações em que a cirurgia é necessária incluem recorrências, tumores provenientes ou adjacentes a cicatrizes, histologia mais agressiva (invasão vascular do tumor) e maior risco em determinadas regiões (como mucosas, lesões periorificiais) (Bath-Hextall et al., 2007; Tull et al., 2008;).

Embora a abordagem padrão permaneça o procedimento cirúrgico, a farmacoterapia tópica representa uma alternativa adequada a se considerar. Terapias tópicas menos destrutivas são preferíveis em algumas situações, como no caso de lesões pré-tumorais, tumores não-melanoma superficiais, quando o paciente não é um bom candidato à cirurgia (como por exemplo, aqueles com uma história de cicatrizes hipertróficas e/ou queloides), pacientes idosos ou quando o tumor está localizado em área cosmeticamente sensível ou de difícil acesso para tratamento cirúrgico (Tull et al., 2008). Indicações adicionais incluem pacientes nos quais procedimentos cirúrgicos cumulativos podem resultar em desfiguração funcional ou cosmética e preferência do paciente para evitar procedimentos invasivos (Chitwood et al., 2013).

Há um grande número de estudos que avaliam a eficácia de fármacos quando utilizados topicamente. Alguns com níveis de evidência I e II que confirmam a eficácia do tratamento farmacológico tópico em queratose actínica, carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular (Chitwood et al., 2013; Micali et al., 2014; Roozeboom et al., 2012). Evidência Nível I são revisões sistemáticas e metanálises incluindo apenas ensaios clínicos randomizados, com validade interna e com adequado poder e mínima possibilidade de erro; Nível II são revisões sistemáticas de literatura, incluindo estudos de casos e controles e de coorte, ensaios clínicos

randomizados, mas com menor qualidade metodológica, como estudos de intervenção, prospectivos, porém não-randomizados e estudos de coorte e de caso-controle bem conduzidos (Chitwood et al., 2013; Micali et al., 2014; Roozeboom et al., 2012).

O tratamento tópico adjuvante tem sido estudado até mesmo para alguns casos de melanoma, visto que, cada vez mais, recorrências são comuns quando tratados de maneira convencional (excisão cirúrgica) que pode não ser viável para os pacientes com comorbidades significativas ou grandes lesões em áreas cosmeticamente sensíveis; além disso, existem os casos em que as lesões apresentam extensão subclínica (Kibbi et al., 2015; Shi et al., 2015; Swetter et al., 2015). Recentemente, há uma série de casos de sucesso sendo descritos no tratamento tópico de melanoma, com alta taxa de cura, especialmente quando há uma lesão residual clínica evidente (melanoma residual *in situ*) após excisão cirúrgica da lesão primária, reduzindo as chances de recorrência e metástase (Kibbi et al., 2015; Pandit et al., 2015; Shi et al., 2015; Swetter et al., 2015). No que diz respeito ao custo, o tratamento tópico, compara-se favoravelmente ao tratamento convencional (Chitwood et al., 2013; Micali et al., 2014; Roozeboom et al., 2012).

Uma busca no site www.clinicaltrials.gov com as palavras “topical treatment skin cancer” mostrou 280 estudos clínicos completos ou em andamento que avaliam o uso de novas terapias tópicas para o tratamento de tumores cutâneos. Isso mostra o interesse existente no desenvolvimento de novas modalidades para o tratamento tópico dessa patologia, o que se deve principalmente à irritação, eficácia variável e baixa adesão associadas às estratégias atualmente disponíveis comercialmente (Amini, 2010; Rongioletti et al., 2006). Com base em todos os fatos expostos é que propomos a elaboração de uma formulação tópica fazendo o uso de nanocarreadores multifuncionais capazes de agir em diversas vias e potencializar a ação dos agentes antitumorais.

1.3 Associação entre paclitaxel e ceramida C6

O paclitaxel é um fármaco antineoplásico amplamente utilizado para vários tipos de tumores, incluindo os que afetam a pele (Field et al., 2013; Jordan, Wilson, 2004; Weaver, 2014). Sua estrutura está representada na Figura 2.

Figura 2- Representação da molécula de paclitaxel.

O paclitaxel promove a morte celular através da ligação com a β -subunidade da tubulina, formando microtúbulos estáveis e interferindo na divisão celular; além disso, o fármaco tem efeito anti-angiogênico (Field et al., 2013; Jordan et al., 2004; Lau et al., 1999; Selimovica et al., 2008; Weaver, 2014). Os microtúbulos são componentes do citoesqueleto que tem um papel importante na divisão celular, mecanismos celulares em geral e transporte celular (Dumontet et al., 2010; Löwe et al., 2001). Estruturalmente, os microtúbulos se assemelham a cilindros ocos compostos de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina (Dumontet et al., 2010; Löwe et al., 2001). Na mitose, os microtúbulos desempenham um papel importante, separando cromossomos (Dumontet et al., 2010; Field et al., 2013; Jordan et al., 2004; Lau et al., 1999; Löwe et al., 2001; Selimovica et al., 2008; Weaver, 2014).

O fármaco apresenta diversos efeitos adversos, como neuropatia periférica, mielossupressão, náusea, vômito, diarreia, inflamação da mucosa, alopecia, mialgia e artralgia (Gradishar, 2006). Além dos efeitos inerentes ao fármaco existem também efeitos adversos decorrentes da formulação. Por serem altamente hidrofóbicos, os taxanos necessitam de solventes para administração parenteral (Gradishar, 2006). Com isso, as primeiras formulações de paclitaxel (Taxol®) consistiam de uma solução do fármaco associada a um solvente chamado Cremophor® EL (*polyoxyethylated caster oil/ethanol*), cujo uso tem sido associado a importantes limitações e desvantagens (Gradishar, 2006; Hawkins et al., 2008; Weiss et al., 1990). Dentre os efeitos adversos mais comuns estão reações de hipersensibilidade, neutropenia, trombocitopenia, dificuldade respiratória e hipotensão (Hackbarth et al., 2008; Heidary et al., 2008; Patel et al., 2014). As reações anafiláticas de hipersensibilidade impõem a necessidade de pré-medicação para sua prevenção, infusão prolongada (cerca de três horas), e necessidade de tubos, bolsas e filtros especiais para infusão parenteral (Hawkins et al., 2008; Weiss et al., 1990).

A ocorrência dos efeitos adversos descritos limita o uso sistêmico do paclitaxel para o tratamento de lesões localizadas na pele (Hosmer et al., 2013; Patel et al., 2014). Por isso, propomos o desenvolvimento de uma formulação tópica capaz de localizar o paclitaxel na pele enquanto limitando sua absorção transdérmica (através da pele), reduzindo consequentemente, sua exposição sistêmica e a incidência de efeitos adversos. Atualmente, não existe uma formulação tópica de paclitaxel disponível no mercado apesar das vantagens óbvias que esse tipo de formulação pode oferecer.

Considerando que o desenvolvimento e progressão de tumores é multifatorial, uma formulação multifuncional, ou seja, contendo múltiplos agentes capazes de atuar em vias diversas e potencializar os efeitos citotóxicos, pode aumentar a eficácia do tratamento. Por isso, propomos a associação do paclitaxel com a ceramida C6. Essa associação baseia-se em estudos anteriores que mostraram melhora na inibição do crescimento celular (Desai et al., 2008; Myrick et al., 1999). Há também na literatura relatos mostrando que o uso clínico de paclitaxel associado a agentes que aumentam ceramida intracelular maximizam o potencial citotóxico do mesmo (Charles et al., 2001; Desai et al., 2008).

As ceramidas são moléculas importantes no metabolismo celular, e também na regulação de respostas (Iglesias et al., 2014, Woodcock, 2006). O aumento da sua concentração em células tumorais parece capaz de induzir apoptose mediada por disfunção mitocondrial e aumento da atividade de caspases (Morad et al., 2012; Quillet-Mary et al., 1997, Woodcock, 2006). Dentre elas, a ceramida C6 tem sido a mais estudada para fins de tratamento devido à sua menor massa molecular e maior penetração nas células (Baspinar et al., 2010; Iglesias et al., 2014; Stover et al., 2005; Zhang et al., 2015). A ceramida C6 foi identificada como um mediador da apoptose e diferenciação, e em células tumorais encontra-se em menor quantidade do que em células saudáveis (Selzner et al., 2001; Stover et al., 2005).

1.4 Formulações nanodispersas

Para que os benefícios terapêuticos da associação de paclitaxel com ceramida C6 sejam obtidos, é necessário que os fármacos sejam co-localizados nas lesões cutâneas. Sabe-se que a penetração do fármaco na pele depende muito de suas características físico-químicas, como massa molecular e lipofilicidade (geralmente expressa como logP) (Moser et al., 2001; Silva et al., 2010), pois o

estrato córneo limita a penetração de compostos com massa molecular superior a 500 Da e/ou logP inferior a 0.5 ou superior a 2.5 (Baspinar et al., 2010). Nenhum dos fármacos propostos apresenta características ideais para penetração passiva: a ceramida é altamente lipofílica (logP > 4.9) e o paclitaxel, além de lipofílico (logP=3.2) apresenta elevada massa molecular (854 g/mol) (Brain et al., 2007; Silva et al., 2010). A fim de maximizar a penetração e co-localização cutânea destes compostos, propomos comparar dois tipos de nanocarreadores: as microemulsões e as nanoemulsões.

Microemulsões são dispersões fluidas, isotrópicas, transparentes e termodinamicamente estáveis, compostas por fase aquosa, fase oleosa, tensoativos e co-tensoativos (Silva et al., 2009). O interesse em microemulsões como sistemas de liberação tópica decorre das múltiplas vantagens deste sistema sobre outros tipos de formulações, incluindo:

- Facilidade de obtenção,
- Estabilidade termodinâmica,
- Possibilidade de incorporação de compostos com características físico-químicas distintas devido à presença de domínios aquosos e oleosos,
- Possibilidade de incorporação de maiores quantidades de compostos comparado a sistemas não estruturados, graças à organização interna em partículas dispersas e à presença de tensoativos, que cria regiões adicionais para solubilização de compostos. Para fármacos lipofílicos, essa característica é relevante pois existe uma grande dificuldade de se encontrar veículos apolares seguros (Patel et al., 2006).
- Habilidade de aumentar a penetração cutânea de compostos ativos, propriedade que pode ser reforçada dependendo dos componentes selecionados (Kogan et al., 2006; Wasutrasawat et al., 2013).

Diferentes tipos de microemulsões com estruturas internas variáveis podem ser obtidas dependendo dos tipos e razão entre os componentes utilizados (Kreilgaard, 2002). Existem três tipos de microemulsão (Figura 3). O sistema água-em-óleo (A/O) é formado quando a água é envolvida por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de óleo como fase externa. O contrário caracteriza sistemas óleo-em-água (O/A). O diâmetro da fase interna dessas microemulsões geralmente varia de 25 a 150 nm (Lawrence et al., 2000). Entre esses dois tipos de

microemulsões, temos uma estrutura não esférica chamada de bicontínua (Constantinides, Yiv, 1995; Kreilgaard, 2002), na qual componentes hidrofílicos e lipofílicos formam canais adjacentes alongados (Cruz, Uckun, 2001). Esse sistema pode ser observado, por exemplo, durante a transformação de microemulsões O/A em A/O (ou vice-versa) (Constantinides, Yiv, 1995; Kreilgaard, 2002).

Sabe-se que estrutura interna e composição de microemulsões afeta grandemente a penetração cutânea dos compostos incorporados. Diversos estudos demonstram que microemulsões O/A permitem maior penetração de fármacos lipofílicos comparado aos outros tipos (Araujo et al., 2010; Pepe et al., 2012), e por isso propomos o desenvolvimento de sistemas O/A.

Figura 3- Tipos de Microemulsões. Fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca) e filme interfacial de tensoativos e co-tensoativos. (Fonte: Damasceno, B, et al., 2011).

Ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que necessitam de energia para a sua formação (Capék, 2004; Fernandez et al., 2004; Mason et al., 2006; Tadros et al., 2004). Podem ser dos tipos óleo-em-água (O/A) ou de água-em-óleo (A/O). São obtidas com os mesmos componentes da microemulsão, mas com diferentes técnicas e quantidades de cada componente (McClements, 2012). Devido ao pequeno tamanho das partículas, que varia de 20 a 200 nm, as nanoemulsões apresentam-se macroscopicamente transparentes ou translúcidas (Fernandez et al., 2004; Tadros et al., 2004). São cineticamente estáveis, pois o pequeno tamanho das partículas impede o fenômeno de floculação; além disso, o movimento Browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em um líquido) ou taxa de difusão tornam-se suficientes para superar os fenômenos de cremação e sedimentação induzidos pela força da gravidade e isto permite que o sistema permaneça disperso sem separação de fases (Solans et al., 2005, Tadros et al., 2004).

Figura 4- Nanoemulsão. (Fonte: Gutiérrez et al., 2008).

A confusão entre micro e nanoemulsões é comum pois a faixa de tamanho desses nanocarreadores é semelhante. Embora as vantagens das nanoemulsões e microemulsões comparadas a outros sistemas tópico/transdérmicos sejam semelhantes, nanoemulsões apresentam a vantagem de exigirem quantidades menores de tensoativos, geralmente abaixo de 20% (Tadros et al., 2004). Entretanto, a formação da microemulsões é mais fácil, pois enquanto as nanoemulsões são formadas por estresse mecânico, as microemulsões se formam espontaneamente (Mason et al., 2006; Miller et al., 2006). Além disso, as microemulsões são termodinamicamente estáveis (Lawrence et al., 2000) e as nanoemulsões são apenas cineticamente estáveis (Capék, 2004).

Ambas micro e nanoemulsões têm sido utilizadas como sistemas de liberação tópicos e transdérmicos (McClements et al., 2012). Considerando as vantagens e desvantagens de cada uma, propomos avaliar se a co-localização cutânea dos fármacos selecionados seria favorecida por algum desses sistemas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver sistemas nanodispersos capazes de co-localizar paclitaxel e ceramida C6 na pele como uma nova estratégia para o tratamento tópico de tumores cutâneos.

2.2 Objetivos específicos

- A. Desenvolver e caracterizar microemulsões e nanoemulsões capazes de incorporar o paclitaxel e ceramida C6 quanto ao tamanho, potencial zeta, propriedades reológicas e estabilidade.
- B. Avaliar a capacidade de formulações selecionadas de modular a permeabilidade da pele e promover a penetração cutânea e co-localização dos agentes quimioterápicos.
- C. Avaliar o potencial irritativo das formulações em equivalentes epidérmicos.
- D. Avaliar o efeito citotóxico das formulações em cultura de células de tumores cutâneos e em modelos de pele reconstruída com melanoma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento e Seleção de Nanocarreadores

Com o objetivo de comparar a habilidade de nanocarreadores em promover a co-localização cutânea de paclitaxel e ceramida C6, microemulsões e nanoemulsões foram desenvolvidas. Nas subseções seguintes estão descritas a base racional para o *design* e a metodologia usada no desenvolvimento dessas formulações.

3.1.1 Microemulsões

- Base racional para o *design* das formulações: Diversos estudos demonstraram que microemulsões do tipo O/A são capazes de promover maior penetração cutânea de fármacos lipofílicos (Kreilgaard, et al. 2000; Pepe et al., 2013; Trotta, et al. 1997). Na tentativa de obter estes sistemas, foram elaboradas e avaliadas seis combinações diferentes entre tensoativo, óleo, e água para identificar a melhor proporção entre os componentes.

Para a mistura de tensoativo, foram utilizadas as seguintes matérias-primas:

- Brij 97 como tensoativo estrutural, pois é considerado versátil e seguro (Tang et al., 2013; Ridder et al., 2005). É um tensoativo não-iônico, usado para formação de sistemas do tipo O/A por causa de sua hidrofiliidade expressa pelo seu elevado equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL 12,4) (Malcolmson, Lawrence, 1995; Ridder et al., 2005; Wang et al., 2006). Além disso, diversos estudos demonstraram sua habilidade de diminuir a atividade do transportador de efluxo glicoproteína P (P-gp), o que é importante porque a P-gp é expressa frequentemente em células tumorais resistentes, diminuindo a concentração intracelular e eficácia de fármacos que servem como seu substrato, como o paclitaxel (Pepe et al., 2013; Tang et al., 2013). Estudos recentes demonstraram também a expressão de P-gp na epiderme e derme (Hashimoto et al., 2013; Skazik et al., 2011). Ao contrário do epitélio intestinal e em células tumorais, na pele P-gp desempenha papel absorptivo, ou seja, propicia o transporte de seus substratos da epiderme para a derme e da derme para o sangue (Hashimoto et al., 2013; Skazik et al., 2011). Assim, componentes da formulação capazes de inibir o transportador podem favorecer a localização do paclitaxel na pele.

- Vitamina E TPGS (vitE) como tensoativo auxiliar. Assim como o Brij, também é utilizado para a formação de sistemas O/A e é considerado um inibidor de P-gp (Collnot et al. 2010).

- Etanol (ETOH) e Propilenoglicol (PG) são promotores de penetração e possibilitam maior incorporação de água na formulação (Hosmer et al., 2012; Pepe et al., 2013).

Diversas proporções dos tensoativos foram testadas a fim de avaliar sua influência sobre a área de formação das microemulsões, e as mesmas encontram-se na Tabela 1.

Como fase oleosa foi utilizada a mistura monocaprilina:tributirina. A monocaprilina, um monoglicerídeo com 8 carbonos, é um promotor de absorção que foi utilizado em estudos anteriores do grupo para promover a penetração cutânea do paclitaxel (Pepe et al., 2013). Apresenta lipofilicidade menos pronunciada comparado a monoglicerídeos com cadeias maiores, de modo a evitarmos a retenção do paclitaxel na formulação (Hosmer et al., 2013; Pepe et al., 2012). A tributirina é um pró-fármaco que exibe atividade antitumoral em algumas linhagens celulares (Heidor et al., 2012), por esse motivo, também compõe a fase oleosa. Esperamos que a adição da tributirina aumente a citotoxicidade da formulação, auxiliando na potencialização do efeito dos fármacos. A mistura monocaprilina:tributirina foi utilizada nas razões de 0:1, 2:1, 4:1 e 6:1 m/m (Tabela 1) a fim de avaliar sua influência sobre a área de formação das microemulsões.

Tabela 1 - Razões entre os componentes da mistura de tensoativos e fase oleosa utilizadas no desenvolvimento de microemulsões.

Formulação	Tensoativo (BRIJ:VITE:PEG:etanol)	Fase oleosa (monocaprilina:tributirina)
1	1:1:1:1	4:1
2	1:1:2:1	4:1
3	2:1:1:1	4:1
4	1:2:1:1	4:1
5	1:1:1:1	0:1
6	1:1:1:1	2:1
7	1:1:1:1	6:1

A figura 5 representa de forma ilustrativa e resumida o papel de cada componente da microemulsão.

Figura 5 - Papel dos componentes da microemulsão.

- Metodologia para desenvolvimento das microemulsões: A fase oleosa e os tensoativos foram aquecidos separadamente até fundir em placa de aquecimento, misturados em razões variando entre 1:9 e 9:1 (m/m), e subsequentemente titulados com água, a qual foi adicionada em incrementos de 5% (m/m) até que a formulação geleificou ou tornou-se turva ou leitosa. A incorporação máxima de água e relação entre composição e fase formada foram avaliadas através de diagramas de fase pseudo-ternários. Com base em inspeção visual, foram consideradas microemulsões as formulações fluidas, transparentes e de uma única fase (Kawakami et al., 2002).

Com base nos diagrama de fases obtidos, foram escolhidas 2 microemulsões para caracterização e avaliação de estabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição das microemulsões selecionadas.

Formulação	Tensoativo (BRIJ:TPGS:PEG:etanol)	Fase oleosa (monocaprilina:tributirina)	Água
ME2-1	1:1:1:1, 36%	2:1 , 24%	40%
ME4-1	1:1:1:1, 36%	4:1, 24%	40%

3.1.2 Nanoemulsões

- Base racional para o design das formulações: Nanoemulsões são preparadas, geralmente, usando os mesmos componentes (em proporções distintas) que uma microemulsão: óleo, água, tensoativos e possivelmente co-tensoativos. O Tween 80 foi utilizado como tensoativo estrutural, e possui característica não iônica. Possui um EHL de 15,0 que favorece a formação de sistemas O/A (Prista et al., 1979; Ridder et

al., 2005; Wang et al., 2006). Os seguintes compostos foram utilizados na fase oleosa:

- Tributirina está presente na nanoemulsão pelo mesmo motivo que foi usado na microemulsão: é um pró-fármaco que exibe atividade antitumoral em algumas linhagens celulares (Heidor et al., 2012).
- Migliol é um triglicerídeo de cadeia média que auxilia na estabilidade e redução do diâmetro das gotículas (resultados preliminares), e incorporação de princípios ativos lipofílicos, prevenindo sua difusão e cristalização na fase externa aquosa (Bernardy et. al., 2010; Fu, Wang, et.al., 2010). O paclitaxel tem um alto coeficiente de partição (Kp) em triglicerídeos de cadeia média (Dhanikula et. al., 2007).
- Ácido oleico é um promotor de absorção cutânea (Leonardi, 2004; Lopes et al., 2015). À princípio, nosso intuito era manter a monocaprilina na fase oleosa, como realizado nas microemulsões. No entanto, a formação de nanoemulsões não foi possível na presença deste monoglicerídeo (resultados preliminares).

Como fase aquosa, utilizamos uma solução de poloxamer a 2%. Este polímero atua como co-tensoativo facilitando o processo de emulsificação. Também reduz o tamanho das partículas e aumenta a estabilidade da formulação (Derakhshandeh et al., 2010; Tan et al., 2009). O papel dos componentes da nanoemulsão estão representados resumidamente na figura 6.

Figura 6- Papel dos componentes da nanoemulsão.

O processo de obtenção da nanoemulsão foi realizado da seguinte forma: 17% da fase oleosa (tributirina+migliol+ácido oleico 2:1:1 m/m/m) foi misturada a 17% do tensoativo e aquecidos. Em seguida, foi adicionada a fase aquosa na proporção de 66% e o sistema foi homogeneizado utilizando homogenizador de tecido (Tissue Tearor modelo 985370-395) por 30 segundos. Subsequentemente, o

sistema foi submetido à sonicação em sonificador de haste (Vibra Cell – VCX-500 - Sonics) por 20 minutos com pulsos de 58 s a cada 30 s.

3.2 Caracterização das Formulações

A caracterização físico-química das formulações foi realizada através das seguintes técnicas:

- Condutividade elétrica (apenas microemulsões): alterações na condutividade em função do teor de água foram determinadas para caracterização da estrutura interna das microemulsões (Pepe et al., 2012). Segundo a teoria da percolação, a condutividade aumenta quando há a transformação de sistemas A/O em O/A através da formação de sistemas bicontínuos (Hathout et al., 2010; Pepe et al., 2012). Tensoativos e fase oleosa (monocaprilina:tributira 2:1 e 4:1) foram combinados na razão de 6:4 (selecionada com base na capacidade de incorporação de água mostrada no diagrama de fases da figura 7) e a água foi adicionada à mistura em incrementos de 5%. Adicionou-se água até que as microemulsões ficaram turvas, leitosas ou transformaram-se em sistemas semelhantes a géis (limítrofe da região monofásica) (Pepe et al., 2012). Após este estudo, formulações de composições específicas compatíveis com sistemas do tipo O/A foram selecionadas para caracterização mais detalhada (composição na Tabela 2).

- Espalhamento dinâmico da luz: utilizados para avaliação da distribuição de tamanho das partículas. A técnica de “*Ligth Scattering*” (Zetazizer nano90, Malvern) permite que o movimento Browniano das partículas na dispersão faça com que a luz seja dispersa em diferentes intensidades de maneira a serem utilizados para o cálculo do tamanho da gotícula, ou seja, a dispersão de luz pode ser definida como a deflexão de um raio em um caminho linear, ocasionado por irregularidades no meio de propagação (gotículas) e o tamanho das partículas pode ser definido relacionando-se a mudança na frequência da luz (Aboofazeli et al., 2000; Renliang, 2008). O raio hidrodinâmico das gotículas coloidais (calculado pela equação de Stokes-Einsteins) é fornecido por esta técnica (Damasceno, et al., 2011). Para avaliação do tamanho, a nanoemulsão foi diluída em água na proporção de 1:10 (nanoemulsão:água v/v). As microemulsões não foram diluídas para que não houvesse alteração em sua estrutura.

- Determinação do Potencial Zeta: o potencial zeta foi determinado utilizando equipamento Zetazizer nano90 (Malvern). As gotículas dispersas adquirem carga elétrica superficial quando em contato com a fase aquosa, a qual influencia largamente os fenômenos de dispersão e agregação das gotículas (Capék, 2004; Daltin, 2011; Liu et al., 2006). Na fase aquosa, a superfície da gotícula de óleo dispersa é formada por uma dupla camada elétrica: (i) uma camada fixa de íons de carga contrária à superfície da gotícula, denominada de camada Stern, e outra (ii) camada móvel de íons, denominada camada difusa, o potencial zeta mede a diferença de potencial entre essas duas camadas (Renliang, 2008). Esse parâmetro está relacionado com a estabilidade da formulação: em geral, quanto maior o valor de potencial zeta em um sistema, mais estável ele se apresenta quanto a coalescência (Capék, 2004; Daltin, 2011; Liu et al., 2006).

- Reologia: a viscosidade e características reológicas das formulações foram determinadas utilizando reômetro do tipo cone-placa (Brookfield) com taxa de cisalhamento crescente até 600 1/s a fim de auxiliar na identificação da estrutura interna de microemulsões, uma vez que a formação de sistemas O/A é geralmente acompanhada por redução da viscosidade. Além disso, através da reologia é possível avaliar como a composição dos sistemas (proporção de tensoativos e fase oleosa) afeta a viscosidade, já que esta propriedade influencia a liberação e penetração cutânea de compostos (Araújo et al., 2010).

- pH: O valor de pH de todas as formulações foi verificado em fita indicadora de pH logo após o preparo em temperatura ambiente (25 °C). A determinação do pH de uma formulação constitui um parâmetro importante, uma vez que deve apresentar pH compatível com a pele. A pele tem normalmente um pH médio de 5,5, embora este valor possa variar ligeiramente consoante as diferentes zonas do corpo (Nogueira; Correia, 1995).

- Análise macroscópica das formulações: Após serem selecionadas, as características macroscópicas de formulações específicas foram avaliadas até após 24 hs do preparo, observando-se possíveis alterações na cor, transparência e homogeneidade (Pianovski et al., 2008).

- Análise microscópica (microscopia de luz polarizada): Materiais podem interagir de forma variada com a luz polarizada (ou seja, emitida em apenas uma direção), o que permite diferenciá-los mediante a presença ou ausência de certas características e padrões. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é considerada anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente, e isotrópica se não desviar a luz (Brinon et al., 1999; Formariz et al., 2005; Hyde, 2001; Norling et al., 1992). Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e microemulsões são isotrópicas (Brinon et al., 1999; Formariz et al., 2005; Hyde, 2001; Norling et al., 1992). Amostras selecionadas foram analisadas em microscópio óptico de luz polarizada (Leica) a fim de confirmar sua característica isotrópica.

3.3 Teste Preliminar de Estabilidade

Com base nos resultados de caracterização, as microemulsões da tabela 2 e a nanoemulsão foram escolhidas para testes preliminares de estabilidade. A estabilidade preliminar das formulações foi avaliada através do teste de centrifugação. Em tubo de ensaio cônico foram adicionados 2,5 g das formulações preparadas em duplicata, e submetidas à centrifugação à 3000 rpm (1811xG) durante trinta minutos à temperatura ambiente. Antes e depois do teste, as amostras foram analisadas visualmente, e foram determinados o pH, tamanho de partícula e potencial zeta para detectar uma possível desestabilização dos sistemas (Baby et al., 2008; Klang et al., 2011; Pianovski et al., 2008). A centrifugação promove o movimento das partículas através do aumento da força da gravidade que atua sobre a formulação, e gera estresse na preparação, o que permite antecipar possíveis alterações de estabilidade. Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos e coalescência, entre outros (McClements, 2007; Nogueira, 1995; Pianovski et al., 2008).

3.4 Incorporação dos Fármacos nas Formulações

Para o teste de incorporação do fármaco, as formulações contendo paclitaxel em concentrações finais de 0,5%, 0,7% e 1% (m/m). Foram preparadas em duplicata. Nas concentrações de 0,7 e 1%, o fármaco precipitou e por isso a concentração de 0,5% foi selecionada. O fármaco foi adicionado na mistura fase

oleosa:tensoativo das microemulsões selecionadas (Tabela 2) e da nanoemulsão, e solubilizado com auxílio de sonicação em sonicador de banho por 40 min (Pepe et al., 2013). Subsequentemente foi adicionada a fase aquosa para obtenção de micro e nanoemulsões. Após obtenção dos sistemas, os mesmos foram submetidos à avaliação visual para verificar precipitação do fármaco e separação de fases.

Para incorporação da ceramida C6, procedeu-se da mesma forma que o paclitaxel, mas sem a necessidade de sonicar a fase oleosa:tensoativo em banho. A concentração final testada foi de 0,35% (m/m).

3.5 Efeito das Formulações sobre a Permeabilidade Cutânea

A fim de estabelecer relações entre o aumento da penetração e alterações na permeabilidade cutânea para entendermos possíveis mecanismos de promoção da penetração, foi avaliado o efeito da formulação sobre a perda de água transepidérmica. Secções de pele (orelha de porco) foram montadas em células de difusão de Franz e a perda de água foi medida com evaporímetro (Vapometer, Delfin) contendo um adaptador para se ajustar à abertura da célula de Franz (Hanson Research- 1.77 cm² de área de permeação). A medida foi realizada por 10s; em seguida, as secções de pele foram tratadas com as formulações selecionadas (sem fármaco) por 1 min ou 8 hs. Ao final de cada período, a formulação foi removida com cuidado utilizando lenço umedecido, e a perda de água foi medida. A comparação da perda de água nestes dois períodos foi realizada na tentativa de considerar (e normalizar) possíveis danos que a remoção mecânica da formulação possa causar na barreira cutânea. Tecidos tratados com água foram usados como controle (Cichewicz et al., 2013; Pepe et al., 2013). Os resultados foram representados como Δ perda de água entre os valores obtidos após tratamento da pele por 1 min ou 8 hs.

3.6 Avaliação da Penetração Cutânea

3.6.1 Estudo In Vitro de Penetração Cutânea

Os estudos de penetração cutânea *in vitro* foram conduzidos utilizando célula de Franz (Hanson Research- modelo:58-001-420, 177 cm² de área de permeação) e pele de orelha de porco, devidamente limpas. As microemulsões da tabela 2

(chamadas de ME 2-1 e ME 4-1 devido à utilização de fase oleosa contendo monocaprilina: tributirina nas proporções 2:1 e 4:1, respectivamente) e a nanoemulsão (NE) contendo 0,5% e 0,35% de paclitaxel e ceramida, respectivamente, foram utilizadas. Como controle, foi utilizada solução de paclitaxel e ceramida C6 em propilenoglicol nas mesmas concentrações. Os compartimentos receptores (7 mL) foram preenchidos com uma solução de tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e mantidas sob agitação constante de 350 rpm a 37 °C. As secções de pele foram posicionadas na parte superior das células de Franz e tratadas com 120 mg das formulações selecionadas por um período de 8 hs. Após este período, as peles foram removidas e devidamente posicionadas em uma superfície plana coberta com papel alumínio. O excesso de formulação foi removido com auxílio de lenço umedecido com água. Os tecidos foram submetidos ao procedimento de “*tape stripping*” para separação do estrato córneo e camadas viáveis (Pepe et al., 2013).

Para o procedimento de *tape stripping*, foram utilizados 14 pedaços de fita; o primeiro pedaço foi descartado a fim de evitar a influência de possíveis resquícios de formulação sobre a quantificação do fármaco, enquanto os demais foram colocados em um tubo cônico contendo solvente extrator, sendo 4 mL de metanol utilizado para o paclitaxel ou 3 mL de etanol para a ceramida. O restante da pele (epiderme viável+derme) foi cortado em pequenos pedaços, sempre delimitando a área de penetração, colocados em tubos cónicos com 2 mL de metanol (paclitaxel) e 2 mL de etanol (ceramida), homogeneizada utilizando um homogeneizador de mão. Após esse processo, as amostras foram agitadas em vortex por 30 s e na sequência, colocadas no sonicador de banho por 15 min. Em seguida, as amostras do estrato córneo, epiderme viável e fase receptora foram filtradas em uma membrana PTFE com poro de 0,45 µm e quantificadas (Pepe et al., 2013).

A fim de verificar a eficiência do processo de extração do fármaco, quantidades conhecidas foram aplicadas na pele de modo a obter concentrações teóricas no homogenato de 0,5, 1 e 5 µg/mL. A pele foi homogeneizada como descrito, e os fármacos quantificados. A recuperação do paclitaxel variou entre 85 e 93% (Hosmer, 2011) e a da ceramida C6, entre 81 e 89% (resultados preliminares).

3.6.2 *Visualização In Vitro da Penetração Cutânea por Microscopia de Fluorescência*

Para esse experimento, utilizamos pele de orelha de porco. A pele foi montada em célula de Franz (Hanson Research- 1,77 cm² de área de permeação) com a o estrato córneo voltado para cima (compartimento dador), onde a formulação foi aplicada. A fase receptora foi preenchida com 7 mL de solução tampão de fosfato contendo etanol (20%), e mantido a 37 °C sob agitação constante de 350 rpm para manter as mesmas condições do experimento descrito no item 3.6.1 Cento e vinte microlitros das formulações contendo os derivados fluorescentes dos fármacos C6 – NDB ceramide (Avanti polar lipids) e Flutax-2 (paclitaxel, Oregon Green 488 conjugado, Life Technologies) foram aplicadas à superfície de cada pele. Soluções dos fármacos diluídos em propilenoglicol foram utilizados com controle.

Após 8 hs, as peles foram cuidadosamente retiradas das células de Franz, o excesso de formulação foi removido, e a área de difusão onde as formulações foram aplicadas foram congeladas a -80 °C para secção em criostato (12 µm). As secções de pele foram montadas em lâminas de vidro e visualizados sem qualquer coloração ou tratamento adicional por meio de objetiva de 20 x utilizando o microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com um filtro de excitação 480/30, emissão 535/40 e software NIS-Elements. As amostras foram observadas com uma exposição de 11 ms.

3.7 **Quantificação dos fármacos**

O paclitaxel nas amostras de estrato córneo, epiderme viável + derme e fase receptora foi quantificado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A separação do fármaco foi realizada usando um sistema de HPLC Shimadzu (10A VP) com uma coluna Phenomenex C18 (150 x 4.6 mm) e uma fase móvel composta por acetonitrila: água (55:45 v/v) a um fluxo de 1 mL/min e detecção em 228 nm em temperatura ambiente (25 °C) (Hosmer et al., 2011; Zaffaroni et al. 2002). A curva de calibração do paclitaxel foi preparada em metanol, nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 µg/mL.

As concentrações de ceramida C6 nas amostras de estrato córneo, epiderme viável + derme e fase receptora foram determinados por fluorescência (Leitor de Microplacas Multidetecção Biotek modelo Synergy HT). Foram fixados os valores de excitação e comprimento de onda de emissão em 485 e 530 nm, respectivamente. A curva de calibração de ceramida C6 foi preparada em etanol, nas concentrações de

0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 e 20,0 µg/mL. As amostras de fase receptoras foram concentradas 4 vezes com o auxílio de speedvac antes de sua quantificação.

3.8 Potencial Irritativo das Formulações – OECD GUIA 439

Para diferenciar o potencial irritativo induzido pelas microemulsões e nanoemulsão, amostras de epiderme humana reconstruída foram submetidas ao tratamento com estas formulações (sem fármacos) em comparação com PBS (controle negativo) e lauril sulfato de sódio (SDS 5%, controle positivo). Os tecidos foram obtidos em colaboração com a profa. Silvy Stucchi Maria-Engler e a pos-doutoranda Thalita Boldrin Zanoni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Eles foram tratados com 30 µL de cada formulação ou controles, incubados a 37 °C e 5% de CO₂ durante 15 min conforme preconizado pela OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, teste nº 439 de 2015. Após o período de tratamento, os tecidos foram lavados com PBS 20 vezes cada, e incubados por mais 42 hs sob as mesmas condições. Ao final desse período, a viabilidade dos tecidos foi avaliada utilizando MTT. O MTT consiste em um teste colorimétrico quantitativo para a avaliação da sobrevivência das células de mamíferos e de proliferação celular proposto por Mosmann em 1983. É baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas, converterem (clivam) a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT (sal amarelo tetrazólio solúvel em água) para cristais de formazan, de coloração azul-escuro/roxo por células metabolicamente ativas e insolúvel em água. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (Liu et al., 1997; Mosmann, 1983). Os tecidos foram transferidos para uma nova placa contendo 300 µL de solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol] 2,5-dipeniltetrazólio) a 1 mg/mL e permaneceram incubados durante 3 hs a 37 °C e CO₂ a 5%. Em seguida, o MTT foi retirado e adicionado 2 mL de isopropanol sobre os tecidos que permaneceram sob agitação (50 rpm) por mais 2 hs. As epidermes em seguida foram retiradas dos *transwells* e colocadas junto ao isopropanol seguindo mais 5 min de agitação (OECD, 2015; Pepe et al., 2016;).

Ao final, foi efetuada a leitura das amostras em leitor de placa (Multidetecção Biotek modelo Synergy HT) e a densidade óptica das amostras extraídas foi determinada a 540 nm. A viabilidade dos tecidos (%) foi representada graficamente

em uma função dos controles e a formulação foi considerada irritante quando a viabilidade celular foi menor do que 50%.

Para a análise histológica, os equivalentes epidérmicos tratados da mesma forma descrita anteriormente, foram separados e fixados em formaldeído (4%) durante 8h, à temperatura de 8 °C. A seguir, as amostras foram submetidas às sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III; 40 min) e, então, incluídas em parafina. Secções de pele de 5 µm foram obtidas com o auxílio de micrótomo manual (820 Spencer Microtome) e, depois, montadas em lâminas. A seguir, as lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e visualizadas sob microscópio óptico (Ekundin-Valentim et al., 2010).

É essencial ter em mente que este é um método alternativo ao uso de animais, e nos mostra o reflexo do potencial de uma substância em irritar a pele com uma única aplicação (Miles et al., 2014; Pepe et al., 2012).

3.9 Avaliação *In Vitro* do Efeito Citotóxico da Nanoemulsão

Foi com base na sua capacidade superior para promover a localização dos fármacos na pele sem comprometer a segurança que a nanoemulsão (NE) foi selecionada para posteriores estudos direcionados a avaliar a eficácia da formulação em culturas de células tumorais e em modelo de pele reconstruída de melanoma.

Devemos ressaltar que, no tratamento de melanoma, terapias tópicas são geralmente utilizadas como tratamento adjuvante ou em pacientes idosos que não podem se submeter à cirurgia para remoção do tumor (Chitwood et al., 2013; Kibbi et al., 2015; Shi et al., 2015; Swetter et al., 2015; Tull et al., 2008). A administração tópica de quimioterápicos vem sendo mais estudada para o tratamento de tumores não-melanoma. No entanto, como modelos tridimensionais de tumores não-melanoma não estão disponíveis, utilizamos o modelo de melanoma com base nas importantes informações que esse modelo fornece e que não podem ser obtidas em culturas de células em monocamada. Um exemplo é possibilidade de avaliar se os fármacos penetram no tecido e atingem os tumores em quantidades suficientes para o efeito citotóxico desejado, bem como quais alterações histológicas decorrem da administração. A fim de sermos consistentes, optamos por iniciar a avaliação da citotoxicidade das formulações e combinação dos fármacos em culturas de células de melanoma.

3.9.1 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT

Para a cultura celular foram utilizadas células de melanoma maligno, linhagens SK MEL 147 e SK MEL 19 que foram doadas pela Profa. Dra. Silvy Stucchi Maria-Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 Thermo Fisher Scientific) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, e penicilina e estreptomicina (1%) a 37 °C numa atmosfera de CO₂ a 5%.

Ao atingirem um grau aproximado de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas (solução de tripsina a 2,5 g/L de tripsina e 0,3 g/L de EDTA) e semeadas em placas de 96 poços na concentração de 10.000 cels/poço, o volume total do poço foi de 200 µL. Para evitar contaminações, os procedimentos foram realizados em condições assépticas e na câmara de fluxo laminar.

As células receberam os seguintes tratamentos por 24 horas:

- NE vazia (sem fármacos) com ou sem tributirina. As concentrações de NE variaram de 0,011 a 0,70 µg/mL a fim de avaliar a real contribuição da tributirina em aumentar a citotoxicidade da formulação.
- NE + CER: NE com Ceramida C6 nas concentrações de 0,24 a 15,31 µM.
- CER em DMSO: Ceramida C6 em solução de DMSO nas concentrações de 0,05 a 218,75 µM.
- NE + PAC: NE com Paclitaxel nas concentrações de 0,07 a 4,76 µM.
- PAC e DMSO: Paclitaxel em solução de DMSO nas concentrações de 0,001 a 7,320 µM.
- NE + CER + PAC: NE contendo os dois compostos nas concentrações de 0,0744 a 4,76 µM (paclitaxel) e 0,2392 a 15,31 µM (ceramida).
- Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas enquanto que doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (0,000624 a 0,0404 nM).

Após o tratamento durante 24 hs, o crescimento de células tumorais foi avaliado de acordo com as alterações no número de células viáveis, tal como determinado pela capacidade de células vivas de reduzir o corante amarelo de

MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol] 2,5-dipeniltetrazólio) a cristais de formazan púrpura (Mosmann, 1983). Para tal, ao final da incubação, o meio das placas foi substituído por meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (150 µL em cada poço). Três horas depois, o meio com MTT foi retirado e o produto foi dissolvido em 150 µL de DMSO, seguido de determinação da absorbância usando um leitor multiplaca (Contagem Spectra, Packard, Ontário, Canadá) a 595 nm. O efeito foi quantificado como a percentagem em relação aos controles conforme a equação 1, para tanto, foi calculado a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco e dos controles. Posteriormente, subtraiu-se a média da absorbância do branco de todos os testes, inclusive dos controles.

Equação 1- Cálculo viabilidade celular.

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância Amostra}}{\text{Absorbância Controle Negativo}} \right) \times 100$$

Nesta etapa, avaliamos qual linhagem mostrou-se menos sensível a formulação sem fármacos, com ou sem tributirina, para que ao adicionarmos os fármacos não houvesse a necessidade de altas diluições. E observamos que a linhagem SK MEL 147 é mais sensível aos efeitos da formulação vazia do que a SK MEL 19, portanto, os testes realizados com a presença dos fármacos em NE e a avaliação histológica da citotoxicidade foram realizados utilizando-se a linhagem SK MEL 19.

3.9.2 Avaliação histológica do efeito citotóxico de NE contendo Paclitaxel e Ceramida C6 em modelos de pele reconstruída com melanoma

Este estudo foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Silvy Stucchi Maria-Engler e a pos-doutoranda Thalita Boldrin Zanoni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Utilizamos tecidos sem melanoma e com melanoma que foram divididos da seguinte forma:

- Sem Melanoma: receberam o tratamento com 30 µL de NE vazia ou NE contendo os fármacos (paclitaxel + ceramida C6).
- Com Melanoma: receberam o tratamento com 30 µL de NE vazia ou NE contendo os fármacos (paclitaxel + ceramida C6).

- Não tratados: tecidos com e sem melanoma não tratados foram utilizados como controle negativo.

Os tecidos foram tratados e incubados a 37 °C em atmosfera a 5% de CO₂ por 48 h; subsequentemente, foram lavados com PBS e em seguida submetidos às sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III; 40 min) e, então, incluídas em Parafina. Secções de pele de 5 µm foram obtidas e, depois, montadas em lâminas seguida de coloração com Hematoxilina & Eosina (H&E) e visualizadas sob microscópio óptico (Ekundin-Valentim et al., 2010).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente utilizando o software GraphPadPrism, ANOVA e pós-teste de Tukey e Dunnet. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento Das Microemulsões

5.1.1 Diagramas de Fase

Diagramas de fase que demonstram a relação entre o tipo de fase formadas e a composição do sistema foram obtidos e estão apresentados nas Figuras 7 e 8. As formulações fluidas, transparentes e sem separação de fases foram classificadas como microemulsões e estão demonstradas nas figuras 7 e 8 como a parte sombreada cinza dos diagramas.

O estudo foi iniciado através da avaliação da influência da composição da mistura de tensoativos sobre a formação de microemulsões. Utilizando BRIJ: vitE: PG: etanol a 1:1:1:1 (m/m) e fase oleosa composta de monocaprilina:tributirina 4:1 m/m, a área da região da fase única correspondeu a 62% do diagrama (Figura 7 A Tabela 3). O aumento na proporção de propilenoglicol (PG) (Figura 7 B Tabela 3) promoveu uma redução na área de formação de microemulsão para 49%. Aumento na proporção de BRIJ ou vitamina E TPGS (vitE) não alterou de forma marcante a área de formação das microemulsões (Figura 7 D-E, Tabela 3). Com base nesses resultados, optamos pelo uso de tensoativos na proporção de 1:1:1:1 (Brij: vitE: PG: etanol, m/m/m/m).

Figura 7- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a mistura de tensoativos e formação de microemulsões. A região cinza denota sistemas transparentes, fluidos e isotrópicos classificados como microemulsões.

Após a escolha da mistura de tensoativos, avaliamos a influência da fase oleosa (Figura 8) sobre a área de formação da microemulsões. Utilizando somente tributirina como fase oleosa, a área de existência da microemulsão foi de 29% (Figura 8 A Tabela 3). Acrescentando monocaprilina à fase oleosa (monocaprilina: tributirina 2:1, m/m) o diagrama de fase passou a apresentar uma área de microemulsão de 58% (Figura 8 B Tabela 3). O aumento na razão monocaprilina:tributirina para 4:1 promoveu aumento menos expressivo na área de formação das microemulsões 62 (Figura 8 C Tabela 3), a qual foi maximizada quando do uso de monocaprilina:tributirina a 6:1 (72%) (Figura 8 D tabela 3).

Figura 8- Diagramas de fase pseudoternários mostrando a relação entre a composição de fase oleosa e formação de microemulsões. A região cinza denota sistemas transparentes, fluidos e isotrópicos classificados como microemulsões.

Tabela 3 - Área de formação da microemulsões tomando como referência a área total do diagrama.

BRIJ:vitE:PG:etanol (m/m/m/m)	Fase oleosa Monocaprilina: Tributirina (m/m)	Área de microemulsão (% do diagrama)
1:1:1:1	4:1	62
1:1:2:1	4:1	49
1:2:1:1	4:1	65
2:1:1:1	4:1	66
1:1:1:1	0:1	29
1:1:1:1	2:1	58
1:1:1:1	6:1	72

Com base nestes diagramas, duas microemulsões foram selecionadas e submetidas à caracterização mais detalhada: ME 4-1 e ME 2-1, nas quais a fase oleosa é composta de monocaprilina:tributirina nas proporções de 4:1 e 2:1 (m/m), respectivamente. Ambas contêm a mesma proporção entre tensoativo e fase oleosa (6:4 m/m) e mesma quantidade de fase aquosa (40%), mas diferem na proporção entre os componentes da fase oleosa. Estas formulações foram escolhidas para permitir a avaliação da influência da fase oleosa da microemulsão sobre a permeabilidade cutânea.

5.2 Caracterização e Teste Preliminar de Estabilidade das Formulações

5.2.1 Condutividade elétrica e viscosidade

5.2.1.1 Microemulsões

Para microemulsões, alterações na condutividade elétrica e viscosidade em função do teor de água são muito importantes para determinação da estrutura interna. A mudança da condutividade elétrica da microemulsão a medida que frações de água são incrementadas é consistente com o fenômeno de percolação e transformação de fase reversa (água-em-óleo, A/O) em sistemas do tipo óleo-em-água (O/A) através do aparecimento da fase bicontinua (Hathout et al., 2010; Malheiro et al., 2007).

A influência do teor de água na condutividade e viscosidade da mistura tensoativo:fase oleosa a 6:4 (m/m) são mostradas nas figuras 9 e 10. A linha preta no diagrama representado na figura 9 painéis A e B representa a linha de diluição utilizada para medir a condutividade das formulações selecionadas.

Nos painéis C e D da Figura 9 observamos que a condutividade das amostras aumentou modestamente até os 20% de água adicionada. Um aumento acentuado da condutividade nas formulações foi observado quando adicionada água entre 20% e 40%, sugerindo um aumento no processo de interligação das gotículas aquosas e o surgimento da fase bicontínuas (Pepe et al., 2012). Novos aumentos no teor de água (superior a 40%) não resultaram em mudança substancial na condutividade, indicando a formação de sistemas O/A em que a fase aquosa tornou-se contínua (Kogan et al., 2007; Sintov, Shapiro, 2004). A adição de água acima de 45% na formulação ME 2-1 e 50% na formulação ME 4-1 ocasionou a desestabilização dos sistemas, transformando-os em turvos e leitosos.

Esse resultado é consistente com os diagramas A da figura 7 e B da Figura 8, onde pode ser observada a formação de microemulsões com a adição de quantidades inferiores a 50-55% de água. O fato das composições de ME 2-1 e ME 4-1 conterem 40% de água em sua composição e estarem na região do platô observado da figura 9 A-B, sugere que essas microemulsão são do tipo O/A (Malheiro et al., 2007).

Figura 9- Influência do teor de água sobre a condutividade eléctrica e a viscosidade das amostras. Painéis A (ME 2-1) e B (ME 4-1) representam diagramas de fases com as linhas de diluição das formulações seleccionadas. Painéis C e D: condutividade eléctrica e viscosidade onde C representa ME 2-1 e D, ME 4-1. E: mudanças de condutividade eléctrica e viscosidade em função do teor de água de sistemas contendo monocaprilina:tributirina a 2:1 na fase oleosa; F: mudanças de condutividade eléctrica e viscosidade em função do teor de água de sistemas contendo monocaprilina:tributirina a 4:1 na fase oleosa.

O limiar de percolação foi estudado a partir da relação $\Delta \text{condutividade}/\text{teor de água}$ em função da água (Figura 9 painéis E e F), em que foi possível observar máximos em 30-32% de água, confirmando o comportamento percolativo dos sistemas (Podlogar et al., 2004). Acima de 32%, o $\Delta \text{condutividade}/\text{teor de água}$ caiu pronunciadamente até cerca de 40% de água, mostrando em seguida quedas

menos pronunciadas e/ou tendência para valores mais constantes e sugerindo transformação em sistemas cuja fase aquosa é contínua. Com base nos estudos de condutividade, a estrutura das ME 2-1 e ME 4-1 são mais consistentes com sistemas O/A.

Para confirmar a estrutura interna, estudamos alterações na viscosidade dos sistemas em função do teor de água. A determinação do comportamento reológico de um material é um passo essencial para determinação da sua viscosidade, já que esta pode depender não apenas da temperatura e composição, como também da tensão e tempo de cisalhamento (Barnes, Hutton, Walters, 1989). Reologia é a ciência que estuda a resposta de um material à aplicação de uma tensão externa. Também pode ser definido como o estudo do comportamento mecânico (escoamento da matéria) e de deformação devido à ação de tensões sob determinadas condições ao longo de um intervalo de tempo (Brodkey, 1967). A classificação dos fluidos como newtoniano e não-newtoniano é a mais geral e leva em consideração a relação taxa de deformação/tensão de cisalhamento (Barnes, Hutton, Walters, 1989). Sistemas newtonianos apresentam uma relação linear entre esses parâmetros, e por isso, a viscosidade independe da tensão de cisalhamento.

Como podemos observar na figura 10, a taxa de deformação é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento e a viscosidade das microemulsões se mantém constante com a variação da taxa de cisalhamento (valor médio da viscosidade de ME 2-1 é $0,12 \pm 0,22$ Pa.s, e de ME 4-1 é $0,12 \pm 0,20$ Pa.s), caracterizando as microemulsões como sistemas Newtonianos.

Microemulsões com tensoativo:fase oleosa na razão encontrada nas microemulsões selecionadas (6:4, m/m, água 40%), mas com teor de água de 10% apresentaram reogramas muito semelhantes aos da Figura 10 e também foram caracterizadas como sistemas newtonianos. A viscosidade desses sistemas também foi determinada para avaliar melhor a transição A/O em O/A em função do teor de água. Sistemas A/O apresentam viscosidade mais elevada comparado a sistemas O/A. A aglomeração de gotículas no limiar de percolação leva a um aumento na viscosidade, enquanto que a transformação em sistemas contínuos de água é muitas vezes acompanhada por uma diminuição na viscosidade (Araujo et al., 2010; Podlogar et al., 2004). Essas microemulsões apresentaram viscosidade de $0,17 \pm 0,46$ Pa.s (ME 2-1) e $0,18 \pm 0,43$ Pa.s (ME 4-1). O fato da viscosidade das formulações diminuir à medida que a quantidade de água aumentou de 10 para 40%

nas microemulsões (Figura 9 painéis C e D), corrobora com a estrutura O/A das microemulsões ME 2-1 e ME 4-1.

Figura 10- Comportamento reológico das microemulsões; onde (A) ME 2-1 e (B) ME 4-1. E variações da viscosidade em função da taxa de cisalhamento onde (C) ME 2-1 $R^2=0,998$ e (D) ME 4-1 $R^2=0,998$.

5.2.1.2 Nanoemulsão

Como podemos observar na figura 11 A, a nanoemulsão quando submetida a uma tensão cisalhamento, mostra uma taxa de deformação diretamente proporcional à tensão aplicada, o que é característico de fluidos newtonianos (Barnes et al., 1989). A viscosidade se mantém constante com a variação da taxa de cisalhamento (Figura 11 B, sendo seu valor médio 0.03 ± 0.05 Pa.s). Sendo assim, podemos classificar a nanoemulsão como um fluido de comportamento newtoniano e esse resultado pode estar relacionado com a composição da nanoemulsão, tamanho da fase interna, índice de polidispersidade e potencial zeta (Mason, TG, Krall AH et al., 1996; Mason TG, 1999). Notamos através dos números, que a nanoemulsão é um fluido menos viscoso comparado às microemulsões.

Figura 11- Comportamento reológico da nanoemulsão, (A) e variações da sua viscosidade em função da taxa de cisalhamento (B). $R^2 = 0,941$.

5.2.2 Avaliação da isotropia utilizando microscopia de Luz Polarizada

Na figura 12 estão apresentadas as formulações obtidas observadas sob luz polarizada (ME 2-1, ME 4-1 e NE). A microscopia de luz polarizada é uma técnica eficiente para diferenciar fases líquido-cristalinas (anisotrópicas) de microemulsões e outros sistemas isotrópicos (Formariz et al., 2005; Haines, 1984; Hosmer et al., 2009). Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente e isotrópica se não desviar a luz (Formariz et al., 2005; Haines, 1984; Hosmer et al., 2009).

Ao serem avaliadas em microscópio de luz polarizada as microemulsões (ME 2-1, ME 4-1, figura 12) apresentaram-se como um campo escuro, sem textura característica. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que relatam a caracterização de microemulsões como sistemas isotrópicos (Hosmer et al., 2009; Lopes et al., 2010; Pepe et al. 2013). A nanoemulsão também não apresentou nenhuma textura característica de sistemas anisotrópicos, mas foi possível observar partículas muito pequenas e finas, possivelmente as partículas maiores presentes na dispersão, sendo caracterizada também como um sistema isotrópico.

Figura 12- Formulações visualizadas sob luz polarizada.

5.2.3 pH

O valor de pH de todas as formulações foi verificado imediatamente após o preparo e após a centrifugação em temperatura ambiente (25 °C) para antecipar resultados de possíveis alterações na estabilidade das formulações (Nogueira; Correia, 1995).

As formulações selecionadas apresentaram valores de pH entre 5,0 e 6,0, sendo que a nanoemulsão apresentou valores mais próximos de 5, e as microemulsões, mais próximos de 6. Todas demonstraram manter os valores de pH constantes mesmo após serem submetidas ao teste de estresse gravitacional, utilizada como um teste preliminar de estabilidade.

A avaliação de alterações no valor do pH é um teste importante durante o monitoramento da estabilidade das formulações, pois alterações no seu valor sugerem a ocorrência de reações químicas que podem comprometer sua qualidade (Martini, 2005). Todas as formulações demonstraram manter os valores de pH constantes mesmo após serem submetidas ao teste de estresse gravitacional.

5.2.4. *Tamanho das gotículas por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão*

As microemulsões e a nanoemulsão selecionadas foram avaliadas quanto ao seu tamanho e os resultados estão ilustradas na figura 13 e tabela 4. Os painéis A, C e E da Figura 13 representam as formulações selecionadas imediatamente após sua obtenção, enquanto os painéis B, D e F representam as mesmas formulações após o processo de centrifugação.

Considerando as formulações antes da centrifugação, todas apresentaram diâmetro inferior a 60 nm, o que está de acordo com a literatura que caracteriza microemulsões e nanoemulsões como sistemas com estrutura nanométrica, cuja

fase interna varia entre 25 e 150 nm (Lawrence et al., 2000; Mason et al., 2006; Miller et al, 2006).

O índice de polidispersidade (IPD) é utilizado como um parâmetro que revela a qualidade da dispersão, variando entre 0,1 a 1,0. Quanto mais próximo de 1, mais heterogênea e polidispersa é a distribuição das partículas, enquanto que valores até 0,25 geralmente indicam uma distribuição homogênea dos glóbulos, (Jafari et al., 2008). Todas as formulações apresentaram IPD próximos a 0,2 (tabela 4) demonstrando que distribuição de tamanho dos glóbulos tem boa qualidade.

Considerando a influência da centrifugação sobre as características das formulações, podemos observar de maneira geral a manutenção do tamanho dos glóbulos. Não foi observada nenhuma alteração visual ou no pH dos sistemas.

Figura 13- Gráficos representativos da distribuição de tamanho de partículas das formulações selecionadas antes (A, C e E) e após (B, D e F) a centrifugação para avaliação da estabilidade. As linhas vermelha e verde correspondem a medidas realizadas pelo aparelho e a linha azul a média. Painéis A e B: formulação ME 2-1; painéis C e D: ME 4-1; painéis E e F: NE.

Tabela 4 - Tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade (IPD) e pH das formulações antes e após a centrifugação.

Antes da Centrifugação			
Formulações sem Fármaco	Tamanho (nm)	IPD (IP)	Potencial Zeta (mV)
ME 2-1	59,47 ± 0,62	0,245 ± 0,01	-9,12 ± 1,00
ME 4-1	58,70 ± 0,56	0,250 ± 0,00	-7,25 ± 0,55
NE	47,60 ± 2,19	0,226 ± 0,02	-6,12 ± 0,24
Depois da Centrifugação			
Formulações sem Fármaco	Tamanho (nm)	IPD (IP)	Potencial Zeta (mV)
ME 2-1	55,41 ± 0,54	0,219 ± 0,00	-8,27 ± 0,66
ME 4-1	59,63 ± 0,87	0,225 ± 0,00	-7,19 ± 0,25
NE	54,07 ± 0,80	0,270 ± 0,03	-3,83 ± 1,38

Os valores expressos correspondem à média ± desvio padrão. De 2-3 replicatas.

5.2.5. Potencial Zeta

A carga eletrostática é uma das forças de repulsão mais importantes e é produzida pela carga que é quase sempre encontrada na superfície de partículas em dispersões líquidas. O potencial zeta está relacionado com a estabilidade física da formulação e morfologia da superfície das partículas (Delgado et al., 2007). As formulações apresentaram potencial zeta negativos, mas próximos à neutralidade (Figura 14 e tabela 4), variando de -6,12 a -9,12.

Os valores obtidos estão em concordância com o estudo de Kong, Park (2011) e colaboradores, que associa o surgimento da carga negativa com a dissociação ou solubilização das moléculas do tensoativos não-iônicos que existiam previamente na formulação como pares iônicos neutros, e por isso tendem a reduzir o valor absoluto do potencial zeta (Kong, Park, 2011, Legrand et al., 1999).

A figura 14 também apresenta dados do potencial zeta das formulações submetidas à centrifugação, sendo possível observar que não houve alterações pronunciadas.

Figura 14- Gráficos representativos do potencial zeta das formulações selecionadas antes (A, C e E) e após (B, D e F) a centrifugação para avaliação da estabilidade. Painéis A e B: formulação ME 2-1; painéis C e D: ME 4-1; painéis E e F: NE.

5.3 Incorporação dos Fármacos

Uma vez que todas as formulações apresentaram características adequadas, os fármacos foram subsequentemente incorporados. Paclitaxel e ceramida foram incorporados a 0.5 e 0.35% (m/m), respectivamente. A distribuição de tamanho, potencial zeta, pH e IPD das microemulsões e da nanoemulsão após incorporação dos fármacos está representada na figura 15 e tabela 5. Como podemos observar, nenhum desses parâmetros sofreu alteração pronunciada. Na inspeção visual, observamos que não houve precipitação dos fármacos ou alteração nas características macroscópicas das formulações.

Tabela 5 - Tamanho, IPD e potencial zeta das formulações após a incorporação do fármaco.

Formulações com Fármaco	Tamanho (nm)	IPD (IP)	Potencial Zeta (mV)
ME 2-1	54,12 ± 0,12	0,208 ± 0,00	-7,37 ± 2,94
ME 4-1	59,28 ± 0,22	0,232 ± 0,03	-8,70 ± 1,25
NE	45,69 ± 0,89	0,220 ± 0,00	-6,91 ± 1,25

Os valores expressos correspondem à média ± desvio padrão. De 2-3 replicatas.

Figura 15- Gráficos representativos da distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta das formulações selecionadas contendo fármacos. As linhas vermelha e verde correspondem medidas realizadas pelo aparelho e a linha azul, à média. Painéis A e B: formulação ME 2-1; painéis C e D: ME 4-1; painéis E e F: NE.

5.4 Efeito das Formulações sobre a Permeabilidade Cutânea: perda de água transepidérmica

As formulações selecionadas contêm tensoativos e lipídios considerados promotores de absorção cutânea, o que sugere sua capacidade de modular a permeabilidade de barreiras biológicas. Para investigar se as formulações têm capacidade de alterar a função barreira da pele, de modo que possíveis alterações da penetração dos fármacos possam ser atribuídas a alterações na sua integridade (devido à possível desorganização do estrato córneo), o efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica foi avaliado e comparado ao efeito da água (controle) após 1 min e 8 hs de tratamento (Figura 16).

Todas as formulações aumentaram a perda de água transepidérmica em comparação com o controle em 2,03 a 2,55 vezes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), mas o efeito da formulação ME 4-1 foi mais pronunciado (2,55 vezes, $p < 0,01$). Entretanto, comparando as formulações entre si, não observamos diferença significativa.

Figura 16- Efeito das microemulsões e nanoemulsão sobre a perda de água transepidermica como uma estimativa da integridade da barreira da pele. * $P < 0,05$ comparado com o controle (água), ** $p < 0,01$ comparado com o controle. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 3 repetições.

5.5 Avaliação da Penetração Cutânea

5.5.1 Método analítico para quantificação dos fármacos

5.5.1.1 Paclitaxel

O fármaco foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método de quantificação mostrou-se linear para concentrações do fármaco entre 0,2 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$; maiores concentrações não foram avaliadas. Para a quantificação do fármaco foram utilizadas curvas de calibração nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ no solvente extrator escolhido (metanol). A figura 17 A mostra a relação entre a área do pico atribuído ao paclitaxel e a concentração do fármaco, ou seja, quanto maior a quantidade de fármaco, maior a área do pico. O painel B ilustra a linearidade de uma curva representativa ($R^2 = 0,99779$). Esses resultados são apenas ilustrativos pois a cada experimento, novas curvas de calibração foram obtidas. Curvas em tampão fosfato contendo etanol (fase receptora utilizada no experimento de penetração) também foram geradas (0,2-1 $\mu\text{g/mL}$), mas como não foi observada nenhuma alteração no tempo de retenção ou valores de área comparado com a curva em metanol, apenas as curvas em metanol foram utilizadas para quantificação (Hosmer et al., 2011).

Figura 17- Método analítico para quantificação do paclitaxel. Painel A ilustra a variação na área do pico em decorrência de alterações na concentração do fármaco. Painel B ilustra curva de calibração utilizada na quantificação do fármaco. $R^2 = 0,99779$.

5.5.1.2 Ceramida

O fármaco foi quantificado por fluorescência. O método mostrou-se linear para concentrações do fármaco entre 0,2 e 20,0 µg/mL; maiores concentrações não foram avaliadas. Para a quantificação do fármaco foram utilizadas curvas de calibração nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL no solvente extrator escolhido (etanol). A figura 18 ilustra a linearidade de uma curva representativa ($R^2 = 0,99152$). Esses resultados são apenas ilustrativos pois a cada experimento novas curvas de calibração foram obtidas. Vale ressaltar que curvas em tampão fosfato contendo etanol (fase receptora utilizada no experimento de penetração) também foram geradas, mas como não foi observada permeação

percutânea (mesmo após a concentração das amostras), as curvas não foram representadas aqui.

Figura 18. Curva padrão da ceramida (comprimento de onda de excitação/ emissão de 485/530 nm). $R^2 = 0,99152$.

5.5.2 Estudo *In Vitro* de Penetração Cutânea

5.5.2.1 Paclitaxel

A penetração de paclitaxel no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EV) e fase receptora (FR) estão representados na Figura 19 A. Observa-se, em relação ao controle, que todas as formulações proporcionaram um aumento na penetração e retenção do paclitaxel no estrato córneo e na fração epiderme + derme após as 8 h do experimento.

Quando em contato com a pele, a quantidade de fármaco que penetra depende de várias condições, dentre elas, a área da superfície sobre a qual a formulação foi aplicada. A capacidade de um composto de se espalhar lateralmente sobre a superfície da pele influencia a absorção cutânea (maior permeação do fármaco/composto que está em contato direto com a pele), ou seja, a absorção de uma substância tópica pela pele é influenciada não só pela concentração, tempo de contato e frequência, mas também pela área da superfície exposta, e por isso, optamos por expressar a quantidade que penetra na pele como massa/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em nossos experimentos (Blickenstaff et al., 2014).

Considerando-se que foram aplicados 120 μL das formulações sobre as peles, o que corresponde a 0,12 g, e que as formulações contêm 0,5% de paclitaxel, assume-se que a quantidade em massa total do fármaco aplicada sobre cada uma das peles foi de 600 μg .

Com isso, tem-se que com a ME 4-1, aproximadamente 4,25% (correspondente a 14,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do paclitaxel total aplicado na pele permaneceu retido no estrato córneo, que corresponde a uma quantidade 2,3 vezes maior comparado à formulação controle (que foi de aproximadamente 1,83% e corresponde à 6,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Com a aplicação da ME 2-1, o valor obtido foi de aproximadamente 4,69% (correspondente a 15,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do fármaco, sendo 2,5 vezes maior em relação ao controle. Não houve diferença significativa entre as microemulsões (ME 2-1 e ME 4-1), que demonstraram basicamente a mesma capacidade de proporcionar a penetração do fármaco no estrato córneo. Nessa camada da pele, a formulação que resultou em maior penetração foi a NE, que aumentou 3,34 ($p < 0,001$) vezes a quantidade do fármaco em relação ao controle, ou seja, aproximadamente 7,29% do paclitaxel (correspondente a 20,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ficou retido do estrato córneo.

Aplicando-se a mesma base racional de cálculo para os valores obtidos na epiderme viável, novamente a NE mostrou ser superior quanto a penetração do fármaco. Enquanto que com a solução controle obtivemos uma penetração de aproximadamente 0,39% (aproximadamente 1,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de paclitaxel, NE proporcionou um aumento de 11,5 vezes em relação ao controle, ou seja, aproximadamente 5,76% (correspondente a 15,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) da massa de fármaco aplicada foi quantificado na epiderme viável. Já com as microemulsões, obtivemos os seguintes resultados: ME 2-1 proporcionou a penetração de 2,02% do paclitaxel presente na formulação (aproximadamente 6,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e 5,1 vezes a mais do que o controle, já ME 4-1 proporcionou a penetração de 1,85% do fármaco da formulação (correspondente a 6,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e um aumento de 4,7 vezes em relação ao controle. Esses resultados demonstram que as duas microemulsões apresentam habilidade semelhante em promover a penetração do paclitaxel. Houve uma diferença significativa maior comparando NE e controle ($p < 0,001$) do que comparando as microemulsões e o controle ($p < 0,01$), demonstrando que NE foi mais eficaz em proporcionar a penetração do paclitaxel na pele.

O aumento da permeação do fármaco foi menos pronunciado (aproximadamente 0,5 vezes a mais em relação ao controle), o que sugere a capacidade das formulações em favorecer a localização cutânea do fármaco. Com ME 2-1, cerca de 0,16% (correspondente a 0,55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do fármaco penetrou através da pele e foi quantificado na fase receptora, com a ME 4-1, foi quantificado 0,14% (aproximadamente 0,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e com NE o valor obtido foi de 0,15%

(correspondente a $0,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) do paclitaxel presente na formulação. Portanto, observamos que a formulação que mais promoveu permeação transepidérmica em relação ao controle foi a ME 2-1, mas não houve uma diferença significativa entre as formulações.

Para melhor visualizar a capacidade das formulações de favorecer a retenção do fármaco na pele (e não sua permeação transdérmica), as quantidades de fármaco na pele total (estrato córneo + epiderme viável) e na fase receptora foram comparadas na figura 19 B. A NE promoveu a maior retenção cutânea: 6,01% (correspondente a $36,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de paclitaxel ficou retido na pele (fração estrato córneo + epiderme viável), o que representa uma quantidade 4,8 vezes superior em relação ao controle e 1,6 -1,75 superior em relação as MEs. Por outro lado, considerando as quantidades permeadas através da pele (na fase receptora), não houve diferença significativa entre os nanocarreadores. Esses resultados sugerem que entre os nanocarreadores estudados, a nanoemulsão (NE) parece ser o mais adequado para nossos objetivos, uma vez que liberou maior quantidade do ativo nas camadas da pele (estrato córneo + epiderme viável) sem aumentar a permeação cutânea.

Figura 19- Penetração cutânea de paclitaxel. (A) Penetração do paclitaxel no estrato córneo (EC), camadas viáveis da pele (EV), e permeação na fase receptora (FR) após 8 hs comparando as microemulsões, a nanoemulsão e a solução de controle em propilenoglicol. *p <0,05 em comparação com controle, *** p <0,001 em comparação ao controle, ** p <0,01 em comparação ao controle e ++ p <0,01 em comparação com a NE. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de 3-8 replicatas. (B) Relação entre retenção cutânea e permeação transdérmica, onde ■ – controle, ● – NE, ▲ - ME 2-1, Δ - ME 4-1.

5.5.2.2 Ceramida C6

A penetração de ceramida no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EV) e fase receptora (FR) estão representados na Figura 20 A e B. Foram aplicadas 120 mg das formulações sobre as peles, o que corresponde a 0,12 g, e as formulações contêm 0,35% de ceramida, então a quantidade em massa total do fármaco aplicada sobre cada uma das peles foi de 420 μg .

Em relação ao controle, todas as formulações proporcionaram um aumento na penetração e retenção da ceramida no estrato córneo após as 8 h do experimento. Mas a formulação que promoveu maior penetração foi a NE, que

aumentou em 5,3 vezes ($p < 0,01$) a quantidade de ceramida liberada no estrato córneo em relação ao controle, ou seja, cerca de 8,62% (correspondente a 20,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) da quantidade de ceramida aplicada foi quantificada no estrato córneo. Em relação às microemulsões, observamos que ME 4-1 aumentou em cerca de 1,89 vezes a penetração da ceramida em relação ao controle; esse valor corresponde a 3,02% (7,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do fármaco aplicado. Com a ME 2-1, 2,83% (correspondente a 6,71 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ceramida permaneceu no estrato córneo, um aumento de 1,76 vezes em relação ao controle.

Não houve diferença significativa entre as duas microemulsões (ME 2-1 e ME 4-1), porém houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) comparando as microemulsões e a NE, que proporcionou uma retenção de ceramida no estrato córneo de aproximadamente 3,5 vezes superior. A capacidade da NE de localizar a ceramida no estrato córneo, pode ser vista como um ponto positivo, pois dessa forma, o fármaco presente no estrato córneo pode funcionar como depósito, e promover penetração prolongada do fármaco nas camadas viáveis da pele.

Na epiderme viável, aplicando-se a mesma base racional de cálculo, novamente a NE mostrou efeito mais pronunciado, promovendo a penetração de quantidades de ceramida 3,5 vezes ($p < 0,01$) superior comparado ao controle, o que corresponde a aproximadamente 3,8% (9,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do fármaco aplicado. Os aumentos proporcionados pela ME 4-1 e ME2-1 foram de 2,1 e 2,0 vezes, respectivamente, em relação ao controle, resultando na penetração de aproximadamente 2,32% (correspondente a 5,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e 2,21% (correspondente a 5,24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ceramida. Não foi observada uma diferença significativa na penetração do fármaco entre as microemulsões, mas quando comparamos a NE com as microemulsões, existe uma diferença significativa ($p < 0,05$ para ME 4-1 e $p < 0,01$ para ME 2-1) mostrando que NE promove maior penetração da ceramida na epiderme viável.

Não foi possível detectar o fármaco na fase receptora dentro do limite de detecção do método (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mesmo após concentração da amostra em 5 vezes). Esse resultado sugere que o aumento da penetração cutânea não é acompanhado por um aumento pronunciado da permeação transdérmica do fármaco, confirmando a capacidade das formulações de promover a localização cutânea do fármaco.

De maneira semelhante à análise realizada com o paclitaxel, as quantidades de fármaco na pele total (estrato córneo + epiderme viável) e na fase receptora

foram comparadas na figura 20 B a fim de permitir melhor comparação entre as formulação e uma melhor visualização da capacidade das formulações de favorecer a retenção do fármaco na pele. Notamos que com a NE, 7,0% (correspondente a 29,48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ceramida ficou retida na pele (fração estrato córneo + epiderme viável), 4,64 vezes superior ao valor obtido com o veículo controle, e 2,3-2,5 superior em relação as microemulsões. Novamente, não foi observada uma diferença significativa entre ME 2-1 e ME 4-1, mas podemos observar diferença entre as microemulsões e a NE ($p < 0,001$), que proporcionou penetração de maiores quantidades de ceramida na pele. A impossibilidade de quantificação da permeação da ceramida é muito positiva para o nosso propósito, sugerindo baixíssima absorção sistêmica e, portanto, capacidade da formulação em promover a localização cutânea do fármaco.

A exemplo dos resultados obtidos com o paclitaxel, notamos novamente que a NE foi mais eficiente em promover a localização cutânea da ceramida (maior penetração associada à menor permeação), possibilitando sua co-localização cutânea com o paclitaxel.

Figura 20- Penetração cutânea de ceramida, (A) Penetração da ceramida no estrato córneo (EC), camadas viáveis da pele (EV), e permeação na fase receptora (FR) após 8 hs comparando as microemulsões, a nanoemulsão e a solução de controle em propilenoglicol. *p < 0,05 em comparação com controle, *** p < 0,001 em comparação ao controle, +++ p < 0,001 em comparação com NE, # P < 0,05 e ## p < 0,01 em comparação com a NE. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de 3-6 repetições. (B) Relação entre entrega cutânea / transdérmica, onde ■ – controle, ● – NE, ▼ - ME 2-1, ▲ - ME 4-1.

5.2.3 Visualização In Vitro da Penetração Cutânea por Microscopia de Fluorescência

Após observar a habilidade mais pronunciada da NE em promover a penetração cutânea, essa formulação foi selecionada para estudos subsequentes com o objetivo de visualizar a co-localização dos fármacos utilizando microscopia de fluorescência.

A microscopia de fluorescência baseia-se no fenômeno que ocorre quando um átomo ou molécula é atingido por um quantum de radiação. Essa molécula ou átomo sofre uma mudança na disposição dos elétrons que rodeiam o núcleo,

ocasionando sua excitação e levando-os a um estado de maior energia. Quando tais elétrons retornam ao estado fundamental, há liberação de fótons, um fenômeno que pode ser percebido pelas diferentes colorações visualizadas nas imagens obtidas por microscopia (Harris et al., 2005). A figura 21 mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência para visualização da penetração cutânea dos fármacos.

Figura 21- Micrografias da pele após tratamento com uma solução controle ou nanoemulsão contendo derivados fluorescentes dos fármacos durante 8 hs. (A) Secção visualizada em fundo claro para mostrar as diversas camadas da pele. (B) Pele não tratada observada sob microscópio de fluorescência para mostrar a autofluorescência. (C) Pele tratada com paclitaxel em solução controle de propilenoglicol. (D) Pele tratada com Paclitaxel em NE. (E). Pele tratada com ceramida em solução controle de propilenoglicol. (F) Pele tratada com ceramida em NE. Barras = 100 µM.

A pele não tratada apresentou uma autofluorescência muito fraca (figura 21 B), o que já era esperado (Alvarez-Román et al., 2004). Ao incorporar os derivados fluorescentes dos fármacos nas soluções controle, podemos observar a presença de fluorescência predominantemente no estrato córneo, e apenas uma fraca fluorescência foi observada na epiderme (Figuras 21 C e E). Ao lado dessas imagens, podemos observar imagens do tratamento da pele com a NE contendo os fármacos (Figuras 21 D e F), mostrando que após o tratamento de 8 hs com a NE, o resultado foi uma forte coloração fluorescente no estrato córneo e epiderme viável e alguma coloração também nas camadas mais profundas da pele (derme).

Este experimento comprova a capacidade da NE de promover a retenção cutânea dos fármacos paclitaxel e de ceramida C6, bem como sua co-localização principalmente na epiderme, o que é desejável considerando que é nesta camada que a maioria dos tumores cutâneos se desenvolve.

5.6 Potencial Irritativo das Formulações

Considerando que o produto final de aplicação tópica deve oferecer segurança, o potencial de irritação das formulações foi avaliado em modelos reconstruídos de epiderme humana. O PBS é considerado seguro, sendo que a exposição de tecidos a ele resultou em viabilidade próxima a 100%. Esses resultados estão em acordo com estudos anteriores mostrando a ausência de redução da viabilidade de tecidos tratados com PBS (Hosmer et al., 2013).

Comparado ao tratamento com PBS, a viabilidade dos tecidos tratados com SDS (controle positivo) foi significativamente reduzida para $28,1\% \pm 20,3$ ($p < 0,0001$) enquanto que a formulação ME reduziu a viabilidade para $83,8\% \pm 30,0$ e NE para $91,6\% \pm 17,7$ comparado ao PBS ($100\% \pm 23,6$) após o período de tratamento (Figura 21). Esses resultados demonstram que as formulações ME e NE possuem um potencial irritativo 2,9 e 3,2 vezes menor, respectivamente, do que o controle positivo (Figura 22).

Não houve diferença estatística entre os nanocarreadores e PBS e entre ME e NE (Figura 22). Apesar de não haver diferença estatística entre as duas formulações, podemos observar que ME possui tendência a ser mais irritante, mas não a ponto de ser descartada como um nanocarreador de uso tópico, uma vez que os valores obtidos estão dentro dos limites aceitos pela OECD GUIA 439; nenhuma

das formulações foi considerada irritante pois as viabilidades dos tecidos estavam acima de 50%. Sendo assim, podemos concluir que as duas formulações devem ser bem toleradas pela pele.

Figura 22- Potencial irritativo baseado da viabilidade dos tecidos 42 hs após o tratamento com as formulações comparado ao PBS (controle negativo) e SDS (controle positivo). +++++ $p < 0,0001$ vs C- **** $p < 0,0001$ vs C+. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de 9-11 replicatas.

Subsequentemente, a existência de possíveis alterações histológicas decorrentes dos tratamentos foi avaliada (Figura 23). Nota-se que o tecido permaneceu íntegro quando tratado com PBS (C -), sendo possível observar na epiderme a presença da camada basal (núcleos maiores, alinhados e corados de azul) os estrato espinhoso (células achatadas), granuloso (ausência de núcleo, com grânulos de querato-hialina) e mais superficialmente, o estrato córneo (núcleos ausentes, corado em tom de rosa) (Boelsma et al., 2000). Quando do tratamento com SDS (C +), é possível observar separação e fragmentação do estrato córneo, formação de vacúolos na epiderme, desordenamento (espaços intercelulares) e morte celular, que podemos visualizar na camada basal pela ausência de núcleos corados em azul.

Não foram observadas diferenças marcantes nos tecidos tratados em NE comparado ao tratado com PBS. Já o tratamento com ME resultou em formação de alguns vacúolos na epiderme. Através desses resultados, podemos então, sugerir a segurança dos nanocarreadores para aplicação tópica. Entretanto, como o tratamento com a nanoemulsão resultou em maior viabilidade do tecido e ausência de alterações histológicas, além de promover a penetração de quantidades maiores

dos compostos ativos na pele, essa formulação foi selecionada para estudos subsequentes.

Figura 23- Histologia dos tecidos. Potencial irritativo 42 hs após o tratamento com as formulações comparado ao PBS (controle negativo) e SDS 5% (controle positivo). Coloração: HE; barras = 100 μm; 40 X e 100 X de ampliação.

5.7 Avaliação *In Vitro* do Efeito Citotóxico da Nanoemulsão

5.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular

Os estudos iniciais foram realizados com NE vazia (sem fármacos), contendo ou não a tributirina para examinar se a presença desse lipídio poderia ajudar de forma global na citotoxicidade da formulação. A citotoxicidade da formulação foi avaliada pelo método de MTT em duas linhagens de melanoma humano, SK MEL 147 e SK MEL 19 (Figura 24).

Figura 24- Comparação entre a porcentagem de viabilidade celular e a concentração de NE vazia com ou sem Tributirina. **(A)** SK MEL 147 e **(B)** SK MEL 19. A citotoxicidade foi medida por ensaio de viabilidade MTT após 24 hs de tratamento. **** $p < 0,0001$ vs NE sem tributirina; *** $P < 0,001$ vs NE sem tributirina. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de 9-12 replicatas obtidas em 3-4 experimentos independentes.

Para ambas a formulações e linhagens, pode-se observar que a viabilidade celular é reduzida de forma significativa com o aumento da concentração da formulação. Também é possível observar diferença na viabilidade celular após tratamento com as formulações com e sem tributirina em ambas as linhagens. A presença de tributirina aumentou a citotoxicidade da formulação em ambas as linhagens estudadas, mas de forma significativa na SK MEL 147 em diluições menores ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$).

A linhagem SK MEL 147 parece ser mais sensível; na concentração mais alta de NE com tributirina testada (0,7 mg/mL) a viabilidade celular caiu para $41,4\% \pm 4,1$ (Figura 24 A) em relação ao controle negativo, enquanto que a viabilidade da linhagem SK MEL 19 a caiu para $61,3\% \pm 6,7$ (Figura 24 B). Ou seja, na menor

diluição da formulação observamos quase 1,5 vezes menos células viáveis da linhagem SK MEL 147.

Também observamos que para obtermos 100% de viabilidade celular, na SK MEL 147 (Figura 24 A) a formulação tem que estar 2 vezes mais diluída do que para obtermos a mesma quantidade de células viáveis de SK MEL 19 (Figura 24 B). Baseado no fato da SK MEL 19 ter se mostrado mais resistente à formulação com tributirina, escolhemos essa linhagem para prosseguir com os experimentos incorporando os fármacos na NE, devido à possibilidade de reduzir a diluição da formulação e com isso, explorar os efeitos citotóxicos de uma faixa mais ampla de concentração dos fármacos encapsulados.

Subsequentemente, avaliamos se a incorporação dos fármacos individualmente na nanoemulsão resultava em maior citotoxicidade comparado ao fármaco em solução (Figura 25).

Figura 25. Viabilidade celular resultante da exposição de células SK MEL 19 por 24 hs aos fármacos incorporados na NE ou livres em solução controle de DMSO. A citotoxicidade foi medida por ensaio de viabilidade MTT após 24 hs de tratamento. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de 6-10 replicatas em 3-4 experimentos independentes.

Comparado ao fármaco em solução, a curva de viabilidade celular em função da concentração do paclitaxel (Figura 25 A) foi ligeiramente deslocada para a esquerda com a incorporação do fármaco em NE. A concentração do fármaco que provoca diminuição da viabilidade celular para 50% quando em NE foi estimada em 2,37μM enquanto que para o paclitaxel administrado em solução, esse valor foi estimado em 7,32 μM. Isso significa que quando incorporado na NE, é necessário

uma concentração cerca de 3 vezes menor de paclitaxel para obter um efeito próximo ao fármaco em solução de DMSO.

De forma semelhante, A curva de viabilidade celular em função da concentração de ceramida (Figura 25 B) também sofreu deslocamento para a esquerda quando da sua incorporação na nanoemulsão, mas de forma mais marcante. Usando a mesma base racional descrita acima, observamos que foram necessários 9,25 μM de ceramida C6 para reduzir a viabilidade celular para aproximadamente 50% quando incorporada em NE, quantidade 23,6 vezes menor do que o necessário para este composto em solução (218,75 μM). Estudos anteriores demonstraram que esse efeito se deve a um aumento da biodisponibilidade intracelular dos fármacos quando incorporados em NE, possivelmente decorrente de uma entrega mais eficiente mediada pelo nanocarreador (Van Vlerken et al., 2008).

A fim de examinar o efeito sinérgico da combinação de paclitaxel e ceramida C6, os dois compostos foram administrados em NE juntos e comparados com a formulação vazia ou contendo os fármacos separados nas mesmas concentrações de formulação. Os resultados estão representados na figura 26.

Figura 26- Relação entre a viabilidade celular e a concentração de NE sem fármacos, NE com os fármacos separadamente e NE com os dois fármacos administrados em cultura celular de melanoma humano linhagem SK MEL 19. A citotoxicidade foi avaliada por MTT após 24 horas de tratamento. # $P < 0,0001$ NE com os dois fármacos vs NE vazia. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 6- 13 replicatas em 4 -5 experimentos individuais.

Na figura 26 é possível observar que, a porcentagem de viabilidade celular quando administrados 0,0875 mg/mL do nanocarreador (indicado pela seta) foi 99% quando do tratamento com NE vazia, 82,9% quando acrescentamos somente ceramida à NE, 68,8% ao acrescentar somente paclitaxel à NE e 50,4% quando paclitaxel e ceramida foram co-encapsulados em NE. Quando paclitaxel e ceramida foram administrados juntos em solução de DMSO na mesma diluição (representado pelo símbolo★na figura 26), observamos que a viabilidade foi de 96,8%, valor próximo a NE vazia e quase 2 vezes menos citotóxicos comparado aos compostos co-encapsulados em NE. Estes resultados demonstram que a coadministração de paclitaxel e ceramida C6 foi significativamente ($p < 0,0001$) mais citotóxica em linhagem SK MEL 19 de melanoma humano em comparação com a NE vazia e/ou fármacos em solução de DMSO.

Para melhor observar a relação entre a concentração da nanoemulsão e a citotoxicidade, a viabilidade celular resultante da exposição a 3 concentrações de nanoemulsão contendo os fármacos individualmente e em combinação está representada na Figura 27. A viabilidade celular diminuiu conforme aumentamos a concentração de NE, e consequentemente a dose dos compostos encapsulados. Também observamos que em concentrações mais baixas não há diferença significativa entre NE contendo os compostos isolados ou com paclitaxel e ceramida C6 co-encapsulados. Porém, a medida que aumentamos a concentração, podemos observar que a combinação de paclitaxel e ceramida C6 aumenta de forma significativa a citotoxicidade da NE (segundo e terceiro grupo de colunas), comparado aos compostos ativos encapsulados isoladamente.

Figura 27- Porcentagem das células viáveis em função da concentração de paclitaxel, ceramida, e a combinação de paclitaxel e ceramida incorporados na nanoemulsão administrados em cultura celular de melanoma humano linhagem SK MEL 19. A citotoxicidade foi medida por ensaio de viabilidade MTT após 24 h de tratamento. # $p < 0,05$ NE Combinação vs NE Paclitaxel, ** $p < 0,01$ NE Combinação vs NE Ceramida, *** $p < 0,001$ NE Combinação vs NE Ceramida. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão de 6-13 replicatas.

5.9.2 Avaliação Histológica do efeito citotóxico de NE contendo Paclitaxel e Ceramida C6 em modelos de pele reconstruída de melanoma

Havendo demonstrado que a combinação de paclitaxel e ceramida na nanoemulsão reduz de forma mais pronunciada a viabilidade celular comparado aos compostos ativos individuais, avaliamos o efeito citotóxico em modelos tridimensionais de melanoma, gerados em equivalentes cutâneos. Como controle, foram utilizando equivalentes de pele saudáveis (sem melanoma). Cortes histológicos foram observados em diferentes magnificações em microscópio ótico a fim de visualizar alterações nos tecidos decorrentes do tratamento.

Na figura 28 estão representados cortes histológicos de tecidos saudáveis após 21 dias de diferenciação, utilizado como controle para o tecido com melanoma. Na figura 28 A, que representa tecido não tratado, é possível observar as camadas derme e epiderme. A epiderme apresenta estratificação e organização adequadas, com a presença de núcleos celulares típicos da camada basal (epiderme) e a diferenciação dos queratinócitos. Na derme podemos observar fibroblastos e a presença de fibras de colágeno.

A aplicação da NE vazia (sem fármacos, figura 28 B) por 48 h promoveu alteração na espessura da epiderme e aumento da desorganização dessa camada, resultado já esperado, baseado no fato de que a formulação contém promotores de absorção e tensoativos, conhecidos pela capacidade de desorganizar o estrato córneo. Ainda, esse resultado também é compatível com o aumento da perda de água transepidérmica mediada pela nanoemulsão. Notamos ainda a presença de células na camada basal da epiderme e que a estrutura da derme foi mantida. O tratamento com a nanoemulsão contendo ceramida e paclitaxel (figura 28 C) resultou em um efeito bem mais pronunciado, sendo observada morte celular mais acentuada na epiderme, e alterações maiores quanto à espessura e organização dessa camada.

Figura 28- Microscopia óptica mostrando um modelo de pele (3D) reconstituído. (A) Não Tratado, (B) tratamento com NE vazia (30 μ L) e (C) com NE + Paclitaxel + Ceramida C6 (30 μ L). O tratamento foi feito durante 48 hs e as peles mantidas em atmosfera a 37 °C e CO₂ 5%. Coloração HE; barras = 50 μ m; 20 X e 40 X de ampliação.

Havendo observado a citotoxicidade da formulação contendo a combinação de fármacos em tecidos saudáveis, avaliamos sua citotoxicidade em tecidos com melanoma, ou seja, modelo de pele obtido mediante o cultivo de células de melanoma SKMEL 19 com os componentes da epiderme, a fim de avaliar o efeito da formulação sobre a proliferação e invasão dessas células.

A avaliação histológica dos tecidos mostrou que a presença das células de melanoma prejudicou a diferenciação do tecido, resultando em múltiplos focos tumorais (Figura 29 A). Há redução no número de camadas da epiderme, não sendo possível distinguir a camada basais, estrato espinhoso e granuloso. Ainda é possível notar que há maior quantidade de células na epiderme, característico da diferenciação celular acelerada observada em tumores. Na Figura 29 B, é possível observar infiltração das células de melanoma na derme de tecidos não tratados, com presença de ilhas de invasão, focos de maior celularidade, em regiões próximas à epiderme. Isso reflete a invasão de células tumorais na derme através da camada basal, que é degradada por células de melanoma, e através dela invadem a derme, formando os focos de invasão (Santos et al., 2011).

Tal como observado na Figura 29 C, o tratamento do modelo de pele com melanoma com NE vazia mostrou que a NE por si só é capaz de promover a desorganização da epiderme (como observado também em tecidos saudáveis, na figura 28 B) e promover morte celular, embora ainda seja possível visualizar células viáveis na pele, principalmente na camada basal da epiderme.

No entanto, quando o tecido foi tratado com NE contendo paclitaxel e ceramida C6 (Figura 29 D), observamos grande destruição do tecido. As poucas células remanescentes apresentaram coloração castanha escura dos núcleos, o que é representativo de células apoptóticas, mostrando que a formulação promove morte das células tumorais da epiderme e derme, eliminando a invasão. Porém, resultante do efeito citotóxico da formulação, notamos que houve também a morte das células saudáveis que compõe a epiderme e derme, além de eliminação do estrato córneo. Esse efeito dá suporte à importância de localizar os compostos na pele a fim de reduzir os efeitos adversos resultantes de sua exposição sistêmica.

Figura 29- Microscopia óptica mostrando um modelo de pele (3D) reconstituído com melanoma humano linhagem SK MEL 19. (A) Não Tratado, (B) Não Tratado, (C) tratamento com NE vazia (30 μ L) e (D) com NE + Paclitaxel + Ceramda C6 (30 μ L). O tratamento foi feito durante 48 hs e as peles mantidas em atmosfera a 37° C e CO2 5%. Coloração HE; barras = 50 μ m; 20 X de ampliação.

6 DISCUSSÃO

Diferentes tipos de microemulsões com estruturas internas variáveis podem ser obtidas dependendo dos tipos e razão entre os componentes utilizados (Kreilgaard, 2002). Um dos principais fatores que controla a emulsificação é a estrutura e concentração de tensoativos e consequentemente a tensão interfacial do sistema. A razão entre tensoativos é um fator fundamental para a formação de sistemas emulsionados e sua capacidade de incorporação de água (Bouchemal et al., 2004). Sabe-se também que a composição e proporção dos componentes da fase oleosa também influencia o processo de emulsificação. Sendo assim, diferentes diagramas de fase foram obtidos para avaliar a relação entre composição e fase formada.

Foram observadas diferenças quanto à capacidade de solubilização de água e consequentemente, áreas de formação de microemulsões, em função da proporção entre os componentes da mistura de tensoativos e da fase oleosa. O aumento na proporção de propilenoglicol (Figura 7 B, Tabela 3) promoveu uma redução na área de formação de microemulsão, e muito embora estudos anteriores demonstrem que a presença de propilenoglicol na mistura de tensoativos auxilia a incorporação de água por microemulsões (Hosmer et al., 2009), nossos resultados sugerem a possibilidade de existência de uma quantidade ótima deste co-tensoativo, acima da qual ocorre redução da área de formação de microemulsões. O aumento na proporção de vitamina E TPGS ou BRIJ não alterou de forma muito marcante a área de formação das microemulsões (Figura 7 C e D, Tabela 3). Por isso, optamos pelo uso de tensoativos na proporção de 1:1:1:1 (Brij: vitE: PG: etanol, m/m/m/m).

Com relação à influência da fase oleosa sobre a área de formação da microemulsões observamos que utilizando somente tributirina como fase oleosa, a área de existência microemulsão foi de apenas 29% (Figura 8 A, tabela 3). Essa área aumentou ao acrescentar monocaprilina à fase oleosa, sendo maximizada quando da utilização de monocaprilina:tributirina na proporção de 6:1 (Figura 8 D). Esses resultados são consistentes com estudos prévios que demonstram que a utilização de triglicerídeos (ex: tributirina) na fase oleosa diminui a incorporação de água nas formulações comparado a monoglicerídeos (como a monocaprilina) (Lopes et al., 2010). Também entram em acordo com outros estudos demonstrando que o uso de monoglicerídeos de cadeia mais curta, com pequeno volume molecular ou alta polaridade, permite maior incorporação de água na formulação, ou seja, a área

de microemulsão no diagrama de fase diminui à medida que o comprimento de cadeia do monoglicerídeo aumenta (Pepe et al., 2012).

Enquanto a monocaprilina é um conhecido promotor de absorção cutânea e sua maior concentração pode promover uma penetração dos fármacos mais eficiente (Hosmer et al., 2013; Lopes, 2009; Pepe et al., 2012) a maximização da concentração de tributirina pode auxiliar na eficácia da formulação (Heidor et al., 2012). Por esses motivos, selecionamos 2 microemulsões para avaliar a influência da fase oleosa sobre a penetração cutânea: ME 4-1 (monocaprilina: tributirina 4:1, m/m) e ME 2-1 (monocaprilina: tributirina 2:1, m/m). Essas formulações foram preparadas com a mesma quantidade de água (40%) e com as mesmas proporções entre tensoativos:fase oleosa (6:4, m/m), tendo como diferencial apenas a fase oleosa, uma contendo maior quantidade de monocaprilina (ME 4-1) do que a outra (ME 2-1). Juntamente com a nanoemulsão, essas microemulsões foram submetidas à caracterização mais detalhada.

Ao avaliarmos as características das formulações, observamos que todas as formulações apresentaram diâmetro na faixa nanométrica, potencial zeta levemente negativo e comportamento reológico do tipo newtoniano. Estudos anteriores sugeriram que propriedades reológicas de nanocarreadores dispersos como as micro e nanoemulsões são afetadas pelo tamanho das partículas e proporção de fase dispersora, sendo partículas de tamanhos maiores e em maior quantidade resultam em viscosidades mais altas em decorrência da diminuição da camada aquosa entre as gotículas, o que favorece as interações (atração/repulsão) e o atrito entre as mesmas (Mason, et al., 1996; Mason, 1999). Também podemos observar que a nanoemulsão é um fluido menos viscoso comparado às microemulsões, o que pode influenciar a espalhabilidade da formulação na superfície cutânea e melhorar a disponibilidade dos fármacos mediante aumento de sua difusão e liberação (Cross et al., 2001; De Mattos et al., 2015; Jumaa et al., 1999; Rassu et al., 2015).

Os valores negativos de potencial zeta encontrados para as formulações pode estar relacionado à presença dos tensoativos Tween e Brij. Embora considerado não iônicos, eles frequentemente promovem potencial zeta levemente negativo em decorrência da dissociação ou solubilização de suas moléculas, que existiam previamente como pares iônicos neutros, e por isso tendem a reduzir o valor absoluto do potencial zeta (Kong, Park, 2001; Legrand et al., 1999). Outros estudos que relacionaram o uso de tensoativos não-iônicos e o potencial zeta de sistemas

dispersos, como o de Vleeschauwer (1999) e colaboradores, mostram que a adição de tensoativos não- iônicos ocasiona a queda no valor absoluto do potencial zeta das gotículas de emulsões.

Sabe-se que o potencial zeta está relacionado com a estabilidade física da formulação e morfologia da superfície das partículas, ou seja, se a carga da superfície for relativamente alta, os glóbulos vizinhos vão se repelir e tendem a se manter separados. Sendo assim, glóbulos altamente carregados tendem a permanecer em dispersão. Caso contrário, esses glóbulos podem se aglomerar e alterar as características físicas do sistema (Delgado et al., 2007). Um potencial zeta mínimo menor do que -30 mV ou superior a +30 mV é geralmente associado à uma boa estabilidade física da dispersão por períodos de tempo prolongados (Capek, 2004). Entretanto o estudo de Kong, Park (2011) também indica que esse valor é baseado em teorias experimentais e não deve ser usado como a única forma de prever a estabilidade do sistema. O estudo de Rohrer (2015) e colaboradores por exemplo, mostra que em um sistema emulsionado com potencial zeta variando entre -0.8 ± 0.9 mV e -7.1 ± 0.2 mV manteve-se estável após estresse gravitacional. O estudo de Han (2008) e colaboradores também demonstra que formulações dispersas com potencial zeta de -16,0 mV, apresentaram estabilidade durante mais de 1 ano, o que foi atribuído provavelmente ao efeito da estabilização estérica resultante do tensoativo não- iônico utilizado, e que por sinal, é o mesmo utilizado no desenvolvimento da nanoemulsão (Tween) e do poloxamer, o polímero adicionado a formulação que atua como co-tensoativo para facilitar o a emulsificação, reduzir o tamanho das partículas e aumentar a estabilidade da formulação devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, e mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas (Derakhshandeh et al., 2010; Tan et al., 2009).

O valor do pH também foi avaliado e os valores encontrados (5-6) estão dentro da faixa desejada para formulações destinadas à aplicação cutânea, uma vez que o pH da pele encontra-se normalmente ao redor de 5,5 (Nogueira, Correia, 1995).

Para averiguar possíveis alterações nas formulações em função do tempo foi realizado o teste de estresse gravitacional. Este é considerado um teste preliminar de estabilidade. A centrifugação gera um estresse na formulação que permite antecipar possíveis alterações de estabilidade, podendo ser observadas através de

alterações no tamanho e carga das gotículas, separação de fases e pH da formulação (Nogueira, Correia, 1995). A centrifugação não alterou de maneira pronunciada o tamanho das gotículas, índice de polidispersidade, potencial zeta e pH. A ausência de alterações no potencial zeta após a centrifugação das formulações pode estar associada à ausência de mudanças nos valores de pH, uma vez que estudos anteriores sugerem que o potencial zeta é dependente de pH, e através de modificações no pH pode-se controlar a carga de partículas dispersas (Liu et al., 2006). A incorporação dos fármacos também não afetou de maneira pronunciada esses parâmetros, mostrando que as características da formulação permaneceram constantes após a incorporação dos fármacos.

Para investigar se as formulações têm capacidade de alterar a função barreira da pele, desorganizando o estrato córneo e aumentando a permeabilidade dos fármacos, o efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica foi avaliado (Figura 16). Todas as formulações aumentaram a perda de água transepidérmica, o que está de acordo com observações anteriores relacionadas com a capacidade de formulações tópicas nanodispersas contendo monicaprilina ou ácido oleico de perturbar a função barreira da pele (Hosmer et al., 2012; Leonardi, 2004; Lopes, et al., 2015). Outros componentes das formulações, como os tensoativos também podem ter influenciado esses resultados. Em comparação com o controle, o efeito da formulação ME 4-1 foi mais pronunciado, sugerindo que possivelmente maiores quantidades de monicaprilina atuem de forma mais pronunciada desorganizando o estrato córneo. Entretanto, comparando as formulações entre si, não observamos diferença significativa.

Tendo sido observado que as formulações possuem a capacidade de modular o estrato córneo e promover penetração cutânea, avaliamos a penetração dos compostos ativos e os quantificamos nas camadas da pele e fase receptora. Dessa forma, pudemos avaliar a eficácia das formulações em promover a penetração especificamente do paclitaxel e ceramida C6 (figuras 19 e 20 respectivamente).

Observa-se, em relação ao controle, que todas as formulações proporcionaram um aumento na penetração e retenção do paclitaxel no estrato córneo e na fração epiderme + derme após as 8 h do experimento. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que descrevem micro e nanoemulsões como sistemas de liberação tópica mais eficientes comparado a formulações convencionais (Constantinides et al., 2008; Lawrence; Rees, 2000).

As duas microemulsões desenvolvidas apresentaram habilidade semelhante em aumentar a penetração de paclitaxel e ceramida C6 na pele. Estudos anteriores mostraram que uma diferença de 10% de monocaprilina entre formulações foi suficiente para promover maior penetração cutânea (Lopes, Murphy, 2009). Em nossos experimentos tivemos uma diferença de aproximadamente 4% desse monoglicerídeo entre as microemulsões, mas essa diferença não modulou a penetração cutânea do fármaco. A nanoemulsão foi a formulação de maior eficácia na promoção da penetração dos fármacos na pele, promovendo a penetração de quantidades de paclitaxel e ceramida 2,24 – 2,44 e 1,63-1,71 superior, respectivamente, às microemulsões, enquanto promovendo menor permeação transepidermica (112 vezes inferior à sua localização na pele para o paclitaxel, enquanto a permeação da ceramida ficou abaixo do limite de quantificação do método analítico).

Esses resultados foram fundamentais na escolha da formulação NE para darmos continuidade aos nossos experimentos. A diferença na penetração dos fármacos pode estar relacionada à composição das formulações: NE contém ácido oleico como promotor de permeação cutânea e tween como tensoativo, enquanto as microemulsões contém monocaprilina e uma mistura de tensoativos e co-tensoativos que inclui BRIJ e etanol (Leonardi, 2004; Lopes et al., 2015). Uma possibilidade é que o ácido oleico seja mais eficiente para promover desorganização do estrato córneo e aumentar a permeabilidade dessa camada. No entanto, essa suposição não encontra suporte em nossos resultados, pois não houve diferença significativa entre NE e as microemulsões com relação à perda de água transepidermica.

Diferenças na composição podem influenciar o tamanho das gotículas e a viscosidade do sistema. Estudos anteriores sugerem que a morfologia dos agregados é importante para a sua interação com o estrato córneo, e que o tamanho reduzido da fase interna dos nanocarreadores favorece a penetração (Yuan et al., 2010). Geralmente, tem sido aceito que a redução do tamanho das partículas de macro para a ordem nano aumenta a penetração (Lopes, 2014; Yuan et al., 2010). Como exemplo, temos que o transporte de diazepam aumentou quando da diminuição do tamanho das gotículas de emulsões para abaixo de 1 micrômetro (100-300 nm) (McCarley et al., 2001). Friedman (1995) e colaboradores mostraram também que houve melhoria significativa na liberação transdérmica de valerato e dipropionato de betametasona, indometacina, diclofenaco, piroxicam e naproxeno

usando formulações com partículas de óleo de cerca de 100 nm em comparação com emulsões convencionais. Mais recentemente, Sahle (2013) e colaboradores, observaram que ceramidas penetram em camadas mais profundas e em maior quantidade através de microemulsões com gotículas menores. As gotículas da nanoemulsão estudada aqui apresentaram diâmetro aproximadamente 10-14 nm inferior ao das microemulsões. Entretanto, em decorrência da existência de poucas evidências em relação à influência do tamanho da fase interna comparando sistemas dentro da gama nanométrica, não julgamos possível tecer conclusões sobre a influência da diferença de diâmetro das formulações estudadas.

A viscosidade da formulação é relevante para a liberação dos fármacos, e influencia a disponibilidade deles para entrar na pele (Cross et al., 2001; De Mattos et al., 2015; Jumaa et al., 1999; Rassu et al., 2015). Tsai (1999) e colaboradores mostraram que a penetração *in vitro* do alcaloide berberina através da pele de ratos foi inversamente relacionada à viscosidade da pomada aplicada, e Potter (1999) e colaboradores mostraram que a absorção de benzo(a)pireno a partir de óleos de aplicação tópica foi reduzida com o aumento da viscosidade do óleo. Como vimos nas figuras 10 e 11, a nanoemulsão possui viscosidade cerca de 3,8 vezes inferior às microemulsões, fator que pode ajudar a justificar a maior eficácia da NE em promover a penetração cutânea dos fármacos.

Por fim, é importante levar em consideração o teor de água das formulações. O teor aquoso da nanoemulsão é maior (66%) comparado à microemulsão (40%). Além de influenciar a viscosidade, a literatura nos traz informações de que a água é considerada um intensificador de permeação, e este efeito pode contribuir para as propriedades de aumento de penetração de formulação (Williams et al., 2004). Alterações no teor de água de uma formulação é uma abordagem de longa data para alterar a penetração: Walkley, (1972) já estudava os efeitos da água sobre a penetração cutânea na década de 70. A imersão da pele em água, expondo a membrana à humidade elevada, pode promover o intumescimento dos corneócitos e promover aumentos na penetração de fármacos (Walkley, 1972; Williams et al., 2004).

De maior relevância é o fato que o aumento de água em formulações também poder aumentar a atividade termodinâmica e difusão do fármaco na formulação (Zhang, Michniak-Kohn, 2011). Podlogar e colaboradores (2005) mostraram que a taxa de liberação do fármaco aumentou com o teor de água e atribuiu o fenômeno a

um aumento da difusão do cetoprofeno dentro das formulações com maior quantidade de água. Sintov e Shapiro (2004) relataram o aumento da permeação junto com o aumento do teor de água em sistemas emulsionados. Os autores observaram que com o aumento de água na formulação, o fluxo de lidocaína aumentou de $12,5 \pm 4,31$ (12% água) para $45,78 \pm 5,15$ (20% água) e finalmente para $61,60 \pm 9,99$ $\mu\text{g}/\text{cm}$. Outros estudos mostram que a permeação de fármacos lipofílicos aumenta com o teor de água de uma forma exponencial enquanto que para fármacos hidrofílicos, a permeação parece aumentar linearmente (Walkley, 1972; Zhang, Michniak-Kohn, 2011).

A atividade termodinâmica do fármaco representa sua tendência em sair do veículo, ou seja, a força motriz para que o fármaco seja liberado do veículo e penetre na pele (Aulton, 2005; Barry, 1985; Hadrgraft, 2001; Kuswahyuning et al., 2014). Supõe-se que aumento na atividade leva a aumento da velocidade de permeação do fármaco através da pele. A atividade termodinâmica depende da solubilidade do fármaco no veículo (que pode ser modulada através de alteração do pH e composição da formulação) e é máxima quando a solução está saturada (Asmussen, 1991; Hadgraft, 1999; Michaels et al., 1975). Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da quantidade de água incorporada na nanoemulsão comparado às microemulsões pode estar aumentando a atividade termodinâmica do paclitaxel e ceramida C6, e assim favorecendo a liberação dos compostos ativos para a pele e sua penetração (Kuswahyuning et al., 2014; Nishihata et al., 1988; Ostrenga et al., 1971). Essa afirmação encontra suporte no trabalho de Barry (1985) e colaboradores que mostrou que a liberação de álcool benzílico na pele era diretamente proporcional à sua atividade termodinâmica.

Após a escolha da formulação por sua maior capacidade em promover a penetração cutânea, e visando observar a co-localização dos fármacos com a NE, utilizamos a técnica de microscopia de fluorescência, em que observamos claramente as diferenças de penetração cutânea dos fármacos através das camadas da pele. Através das imagens, é possível observar maior penetração tanto do paclitaxel como da ceramida C6 em relação aos controles. Este experimento comprova a capacidade da NE de promover a retenção cutânea dos fármacos paclitaxel e de ceramida C6, bem como sua co-localização principalmente na epiderme, o que é desejável considerando que é nesta camada que a maioria dos tumores cutâneos se desenvolve. O padrão sinuoso dos feixes (figura 21 F), sugere

que a ceramida tenha se acumulado nas fibras de colágeno presentes na derme, ou seja, na matriz extracelular, o que pode ser devido a sua afinidade pelas membranas celulares (Cha et al., 2016; Kendall et al., 2015). Estudos em linhagem celular de fibroblastos tem demonstrado que a ceramida C6 exógena acumula-se no complexo de Golgi sendo usada pelas células em vias de biossíntese dos esfingolipídeos, e há evidências de que induz a formação de vesículas endocíticas e aumento dos endossomos tardios nessas células (Li et al., 1999; Lipsky, Pagano 1983; Martin et al., 1993).

O interesse em formulações tópicas que visam aumentar a localização do paclitaxel na pele tem crescido ao longo dos últimos anos; sendo assim, na primeira parte deste estudo, diferentes tipos de nanocarreadores foram desenvolvidos, caracterizados e investigados quanto a sua capacidade de promover a penetração cutânea de paclitaxel e ceramida C6. Visando então obter maiores informações sobre a segurança desses sistemas, o próximo passo foi o teste de irritação cutânea em equivalentes epidérmicos.

Em comparação com a nanoemulsão (NE), as microemulsões (ME) têm a vantagem de fácil preparação, estabilidade termodinâmica, e versatilidade de composição (Lopes, 2014; McClements, 2012); porém, devido à alta concentração de tensoativos, a ME tende a exibir uma maior tendência quanto ao potencial de irritação cutânea (Hosmer et al., 2009; Lopes, 2014). Esse efeito foi observado neste estudo. Apesar de possuir um maior potencial irritativo comparada a NE, o uso da ME não deve ser totalmente descartado como um potencial nanocarreador de uso tópico, pois o tratamento com a mesma resultou em viabilidade celular superior a 50%, sugerindo que seu uso deve ser tolerado pela pele. No entanto, escolhemos a NE para prosseguirmos com nossos experimentos em decorrência da combinação de sua melhor capacidade em promover a penetração cutânea dos compostos com menor potencial de irritação na pele, o que nos leva a crer que seja um sistema mais seguro e eficaz comparado aos sistemas microemulsionados de nosso estudo.

Avançamos o presente estudo avaliando a eficácia da formulação contra células tumorais cutâneas (melanoma) através do ensaio de viabilidade celular por MTT em monocamada e estudo de alterações histológica em um modelo 3D de pele reconstituída com melanoma para, então, relacionar os resultados a uma potencial utilidade clínica do sistema selecionado.

Em primeiro lugar, utilizamos duas linhagens celulares de melanoma humano (SK MEL 147 e SK MEL 19) e avaliamos se NE contendo tributirina, mas sem a adição do paclitaxel e ceramida C6, possui algum efeito citotóxico. E como esperado, observamos que nas duas linhagens celulares, NE mostrou ser citotóxica, cerca de 1,4 vezes mais do que a formulação sem tributirina. Esse resultado era esperado, visto que a tributirina foi inicialmente utilizada na fase oleosa da formulação por ser conhecida na literatura como um pró- fármaco do ácido butírico e possuir atividade citotóxica em algumas linhagens celulares como células de câncer de mama, cólon, intestino, próstata, melanoma, entre outras (Heidor et al., 2012; Kuefer et al., 2004). O potencial anticancerígeno da tributirina foi mostrado em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, e, seu mecanismo de ação está relacionado a indução de apoptose nas células através da ativação de caspase-3 da família de proteínas Bcl-2 (Heidor et al., 2012; Kuefer et al., 2004). Vale ressaltar que mesmo a formulação sem tributirina apresentou citotoxicidade em concentrações mais elevadas, o que deve ser decorrente da presença de tensoativos e promotores de absorção, capazes de promover lise celular (Lopes, 2014; Manaargadoo-Catin et al., 2015).

Também avaliamos, qual das duas linhagens mostrou-se menos sensível à formulação, para que, ao adicionarmos os fármacos, não houvesse a necessidade de altas diluições. Observamos que a linhagem SK MEL 147 é mais sensível à formulação sem os compostos ativos (cerca de 1,5 vezes mais) do que a SK MEL 19. Esse resultado foi surpreendente, pois a linhagem SK MEL 147 é resistente a quimioterápicos e expressa altos níveis de agentes anti-apoptóticos (Brohem et al., 2009; Soengas et al., 2001). A SK MEL 19 possui mutação em RAF (BRAF V600E) que ocorre em aproximadamente 60% dos casos de melanoma e está envolvida em uma variedade de processos celulares, como crescimento, proliferação, sobrevivência, diferenciação, senescência, invasão, metástase e insensibilidade ao feedback negativo; e por si só, a mutação BRAF V600E mostra uma capacidade 138 vezes maior de transformação (transformação da célula geneticamente alterada em maligna) e atividade oncogênica sobre BRAF WT, forma não mutada do gene presente na SK MEL 147 (Bucheit et al., 2013; Davies et al., 2002; Jarell et al., 2007; Oikonomou et al., 2014). Essa diferença na citotoxicidade, indicada pelos valores de viabilidade celular, pode ser devido às diferentes características celulares, como a composição das membranas e as diferenças entre os alvos de ação dos componentes de NE nas células, lembrando que NE possui em sua composição a tributirina (pró- fármaco do ácido butírico). Neste sentido, NE pode estar

contornando essas barreiras e aumentando a morte celular na linhagem SK MEL 147 (Brandão et al., 2013). Dessa forma, a redução mais acentuada da viabilidade dessas células mediada pela nanoemulsão contendo tributirina pode representar uma nova estratégia a ser explorada. Para prosseguir com os experimentos de citotoxicidade da NE contendo os dois compostos ativos, escolhemos utilizar a SK MEL 19, em que é possível alcançar 100% de viabilidade celular com a formulação 2 vezes mais concentrada comparado à outra linhagem, possibilitando avaliar uma faixa maior de concentração dos compostos ativos.

Os estudos iniciais para examinar os efeitos do paclitaxel e ceramida C6 nas células tumorais foram realizados com os agentes administrados individualmente incorporados na NE ou em solução de DMSO. Como mostrado na figura 23, a administração de paclitaxel e ceramida C6 isoladamente na formulação (NE) aumentou os efeitos citotóxicos dos dois compostos nas células de melanoma. Além de promover aumento da penetração celular e biodisponibilidade, o nanocarreador pode proteger a ceramida contra hidrólise enzimática em cultura de células e *in vivo*, (Stover et al., 2005), justificando a maior citotoxicidade do composto quando incorporada em NE (Kim et al., 2001; Sashu et al., 2016). A formulação também proporcionou um aumento da citotoxicidade de paclitaxel contra células de melanoma o que pode ser atribuído a uma penetração celular mais eficaz, já que este composto é altamente hidrofóbico e possui elevada massa molecular (Brain et al., 2007; Silva et al., 2010). E quando administrado em NE, a melhora da eficácia pode estar associada ao aumento da quantidade e do acúmulo do composto na célula (Devalapally et al., 2007; Shenoy et al., 2005). Esses resultados demonstram o benefício do uso do nanocarreador, e são consistentes com estudos anteriores que demonstraram o aumento da citotoxicidade contra células de tumores cutâneos do tipo não melanoma (basocelular, espinocelular e lesões como queratoses actínicas) e melanoma mediante a nanoencapsulação de fármacos (Fu et al., 2015; Paolino et al., 2012; Pepe et al., 2016).

Além disso, os resultados obtidos demonstram que a combinação dos fármacos resulta em um maior potencial citotóxico da formulação que foi observado após o tratamento combinado de paclitaxel e ceramida C6. Estes resultados estão de acordo com observação prévias demonstrando aumento da atividade citotóxica do paclitaxel quando da sua associação com ceramida em outras células tumorais como as de pâncreas, mama, ovário, tumores cerebrais e até mesmo células do

músculo liso da aorta (atividade anti-proliferativa dos compostos) (Best et al., 2013; Deshpande et al., 2008; Qiu et al., 2006; Van Vlerken et al., 2008). Considerando que a máxima concentração de paclitaxel que pôde ser incorporada foi 0.5%, sua combinação com a ceramida representa uma estratégia viável para aumentar ainda mais a citotoxicidade sem o aumento na concentração de paclitaxel, o que iria requerer um novo design do nanocarreador. Apesar de a NE vazia ter demonstrado citotoxicidade em altas concentrações, é notável que a presença dos fármacos potencializa este efeito e reduz a concentração da formulação necessária para redução da viabilidade celular; posto isto, podemos concluir que a maior eficácia de NE está relacionada à presença dos compostos.

Sistemas que entregam os fármacos em locais específicos aumentam o benefício terapêutico, fornecendo uma maior fração da dose no local alvo, o que minimiza a quantidade terapêutica que se acumula em alvos não específicos (Van Vlerken et al., 2008). Visto isso, avançamos avaliando a eficácia da formulação em células tumorais de melanoma em modelo de pele 3D. Observamos, no grupo de equivalentes cutâneos saudáveis, que apesar de não possuir um potencial irritativo como avaliado conforme normas OECD GUIA 439, a formulação vazia causa algumas alterações histológicas na epiderme, principalmente no estrato córneo, quando do tratamento do tecido por longos períodos (48 h). Esse feito pode ser decorrente da presença de tensoativos e promotores de absorção, capazes de causar desorganização das camadas superficiais da pele, bem como da presença da tributirina, que é capaz de aumentar a citotoxicidade da formulação como observado em cultura celular.

Além disso, podemos visualizar que a NE contendo paclitaxel e ceramida C6 em tecidos de melanoma obteve sucesso e eliminou as células tumorais de maneira muito eficiente. Entretanto, vale aqui uma discussão acerca da permeabilidade do modelo utilizado. A rota de permeação através dos canais intercelulares é significativa para o transporte de fármacos na pele, e pode-se dizer que o empilhamento dos corneócitos no estrato córneo poderá ditar o comprimento do percurso da difusão do ativo pela pele (Christophers et al., 1974; Golden et al., 1987). Dessa forma, a resistência ao transporte através do estrato córneo depende do arranjo e das propriedades das camadas alternadas hidrofóbicas e hidrofílicas do estrato córneo, bem como de sua espessura, a qual varia de espécie para espécie e no modelo artificial de pele (Golden et al., 1987; Schmook et al., 2001; Zghoul et al.,

2001). Dito isto, é importante ressaltar que espera-se uma penetração maior dos fármacos no equivalente cutâneo comparado à pele humana ou de orelha de porco, pois como já foi demonstrado em estudos anteriores, esses modelos de bioengenharia são mais permeáveis, apresentando valores de fluxo de permeação 500-800 vezes superiores comparado à pele humana, sendo que esta diferença parece ser mais pronunciada com compostos lipofílicos (Pepe et al., 2016; Zghoul et al., 2001).

Também é necessário ressaltar que o efeito citotóxico da formulação não é seletivo para as células tumorais, atingindo também as células normais do tecido. Esse dado está de acordo com outros estudos que demonstram efeitos citotóxicos promovidos pelo paclitaxel contra vários tipos de células, tumorais e normais não seletivamente (Akhlaghi et al., 2010; Pepe et al., 2016). Isso reforça a importância da localização desses fármacos na pele para reduzir possíveis efeitos adversos causados pelos mesmos em células saudáveis do nosso organismo. Nossos resultados ressaltam o potencial da NE para melhorar a penetração cutânea e co-localização tópica de paclitaxel e ceramida C6, que conduziram a uma eficácia mais pronunciada em modelo de melanoma em equivalentes de pele.

7 CONCLUSÕES

- As formulações selecionadas apresentaram diâmetro da fase dispersa inferior à 100 nm; todas foram capazes de incorporar os fármacos nas concentrações de 0,35% (ceramida) e 0,5% (paclitaxel). Além disso, através do ensaio de estresse gravitacional foi observado que as formulações possuem boa estabilidade.
- O tratamento com todas as formulações, durante 8 horas aumentou a perda de água transepidérmica em comparação com a água, o que sugere a capacidade das mesmas de modular o estrato córneo a fim de aumentar a permeabilidade da pele.
- Embora ambas as ME e NE tenham aumentado a penetração dos compostos ativos, a formulação NE mostrou-se mais eficaz. A penetração cutânea não foi acompanhada de aumento na mesma dimensão através do tecido, o que torna a NE uma formulação favorável para o tratamento localizado de tumores da pele.
- O baixo potencial irritativo de NE sugere sua segurança para aplicação tópica.
- NE contendo paclitaxel e ceramida C6 isolados e em combinação resultou em significativo aumento na citotoxicidade, o que demonstra o benefício do uso do nanocarreador e da associação dos compostos.
- A administração tópica do nanocarreador contendo paclitaxel e ceramida promoveu desorganização e destruição celular em equivalentes de pele com e sem melanoma, sugerindo que os compostos ativos não afetam apenas células tumorais, mas também as células normais no tecido, mostrando a importância de co-localização desses compostos para evitar possíveis reações adversas.
- Esses resultados demonstram o benefício da co-encapsulação de paclitaxel e ceramida em nanoemulsão como uma nova estratégia para tratamento tópico de tumores cutâneos.

REFERÊNCIAS*

- Aboofazeli R, Barlow D, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS PharmSci*. 2000;2(3):E19.
- Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, Dinarvand R, Atyabi F. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine*. 2010 Oct;6(5):689-97.
- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;Sep;58(2):301-16.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>. Acessado em junho de 16 de junho de 2015.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
- Amini S, Viera MH, Valins W, Berman B. Nonsurgical innovations in the treatment of nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Jun;3(6):20-34.
- Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Feb;65(2):169-90. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.009. Epub 2012 May 7. Review.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 52 p.
- Arad S, Zattra E, Hebert J, Epstein EH Jr, Goukassian DA, Gilchrest BA. Topical thymidine dinucleotide treatment reduces development of ultraviolet-induced basal cell carcinoma in Ptch-1+/- mice. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1248-55.
- Araújo LM, Thomazine JA, Lopez RF. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 May;75(1):48-55.
- Armstrong BK, Kricker A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res*. 1993;3:395-401.
- Asmussen B. Transdermal therapeutic systems—actual state and future developments. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1991;13(5): 343.

*De acordo com:

International Committee of Medical journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. [2011 jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Aszterbaum M, Rothman A, Johnson RL, Fisher M, Xie J, Bonifas JM, Zhang X, Scott MP, Epstein EH Jr. Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome. *J Invest Dermatol*. 1998 Jun;110(6):885-8.

Baby AR, Haroutiounian-Filho CA, Sarruf FD, Tavante-Júnior CR, Pinto CASO, Zague V, Arêas EPG, Kaneko TM, Velasco MVR. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008 Ju;44(2):233-48.

Bakos L, Mastroeni S, Bonamigo RR, Melchi F, Pasquini P, Fortes C. A melanoma risk score in a Brazilian population. *An Bras Dermatol*. 2013 Mar-Apr;88(2):226-32. doi: 10.1590/S0365-05962013000200007. Erratum in: *An Bras Dermatol*. 2013 May-Jun;88(3):486. Mastroeni, Simeona [corrected to Mastroeni, Simona].

Barnes HA., Hutton JF, Walters K. *An introduction to Rheology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers;1989. 199 p.

Barry BW. Formulation of dermatologic vehicles. in: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1983. 296 p.

Barry BW, Harrison SM, Dugard PH. Correlation of thermodynamic activity and vapour diffusion through human skin for the model compound, benzyl alcohol. *J Pharm Pharmacol*. 1985 Feb;37(2):84-90.

Baspinar Y, Keck CM, Borchert HH. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. *Int J Pharm*. 2010 Jan 4;383(1-2):201-8.

Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jan 24;(1):CD003412.

Bernardy N, Romio AP, Barcelos EI, Dal Pizzol C, Dora CL, Lemos-Senna E, Araujo PH, Sayer C. Nanoencapsulation of quercetin via miniemulsion polymerization. *J Biomed Nanotechnol*. 2010 Apr;6(2):181-6.

Best C, Calianese D, Szulak K, Cammarata G, Brum G, Carbone T, Still E, Higgins K, Ji F, DI W, Wanebo H, Wan Y. Paclitaxel disrupts polarized entry of membrane-permeable C6 ceramide into ovarian cancer cells resulting in synchronous induction of cell death. *Oncol Lett*. 2013 Jun;5(6):1854-58.

Betti R, Facchetti M, Menni S, Crosti C. Basal cell carcinoma of the sole. *J Dermatol*. 2005;32: 450-3.

Blickenstaff NR, Coman G, Blattner CM, Andersen R, Maibach HI. Biology of percutaneous penetration. *Rev Environ Health*. 2014;29(3):145-55.

Boelsma E, Gibbs S, Faller C, Ponec M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm Venereol.* 2000;80:82–8

Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* 2004Aug 6;280(1-2):241-51.

Brain KR, Green DM, Lalko J, Api AM. In-vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. *Toxicol In Vitro.* 2007Feb;21(1):133-8.

Brandão LF, Alcantara GB, Matos Mde F, Bogo D, Freitas Ddos S, Oyama NM, Honda NK. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2013;61(2):176-83.

Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant JF, Couarraze G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. *J Control Release.* 1999Jun 28;60(1):67-76.

Brodkey RS. *The Phenomena of Fluid Motions.* New York: Dover Publications Inc.; 1967. 737 p.

Brohem CA, Sawada TC, Massaro RR, Almeida RL, Rivelli DP, Ropke CD, da Silva VV, de Lima TM, Curi R, Barros SB, Maria-Engler SS. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2009 Feb;23(1):111-9.

Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, Bassett RL Jr, Curry JL, Gershenwald JE, Kim KB, Hwu P, Lazar AJ, Davies MA. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer.* 2013Nov 1;119(21):3821-9.

Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 Mar 19;107(2-3):125-55.

Carvalho CA, Cunha ME da, Giugliani R, Bakos L, Ashton-Prolla P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 2004 Feb;79 (1): 53-60.

Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, An S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med.* 2016 Jul;38(1):16-22.

Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 May;47(5):444-50.

Chitwood K, Etzkorn J, Cohen G. Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: efficacy and cost comparisons. *Dermatol Surg.* 2013 Sep;39(9):1306-16.

Christophers E, Wolff HH, Laurence EB. The formation of epidermal cell columns. *J Invest Dermatol*. 1974 Jun;62(6):555-9.

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. *J Pharm Pharmacol*. 2013 Jun;65(6):817-26. doi: 10.1111/jphp.12045. Epub 2013 Feb 26.

Collnot EM, Baldes C, Schaefer UF, Edgar KJ, Wempe MF, Lehr CM. Vitamin E TPGS P-glycoprotein inhibition mechanism: influence on conformational flexibility, intracellular ATP levels, and role of time and site of access. *Mol Pharm*. 2010 Jun 7;7(3):642-51. doi: 10.1021/mp900191s.

Constantinides PP, Chaubal MV, Shorr R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Mar 17;60(6):757-67. Epub 2007 Nov 6. Review.

Constantinides PP, Yiv SH. Particle-Size Determination of Phase-Inverted Water-in-Oil Microemulsion under Different Dilution and Storage-Conditions. *Int J Pharm*. 1995 Mar 7;115(2):225-34.

Cross SE, Jiang R, Benson HA, Roberts MS. Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone? *J Invest Dermatol*. 2001 Jul;117(1):147-50.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*. 2006 Apr;81(4):500-7. Review.

Barry BW. Formulation of dermatologic vehicles. in: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1983. 296 p.

Daltin, D. Tensoativos: Química, propriedade e aplicações. São Paulo: Blucher; 2011. 327 p.

Damasceno BPGL, Silva JÁ, Oliveira EE, Silveira WLL, Araújo IB; Oliveira AG; Egito EST. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2011;32(1):9-18.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

De Mattos CB, Argenta DF, Melchiades Gde L, Cordeiro MN, Tonini ML, Moraes MH, Weber TB, Roman SS, Nunes RJ, Teixeira HF, Steindel M, Koester LS. Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design. *Int J Nanomedicine*. 2015 Sep 1;10:5529-42.

Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J; International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division IUPAC Technical Report. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci*. 2007 May 15;309(2):194-224.

Derakhshandeh K, Soheili M, Dadashzadeh S, Saghiri R. Preparation and in vitro characterization of 9-nitrocamptothecin-loaded long circulating nanoparticles for delivery in cancer patients. *Int J Nanomedicine*. 2010 Aug 9;5:463-71.

Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci*. 2008 Jul;97(7):2745-56.

Deshpande D, Devalapally H, Amiji M. Enhancement in anti-proliferative effects of paclitaxel in aortic smooth muscle cells upon co-administration with ceramide using biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharm Res*. 2008 Aug;25(8):1936-47. doi: 10.1007/s11095-008-9614-3. Epub 2008 May 15.

Devalapally H, Duan Z, Seiden MV, Amiji MM. Paclitaxel and ceramide co-administration in biodegradable polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1830-8.

Dhanikula AB, Khalid NM, Lee SD, Yeung R, Risovic V, Wasan KM, Leroux JC. Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification. *Biomaterials*. 2007 Feb;28(6):1248-57.

Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2009 Sep;35(9):1311-23.

Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):790-803. doi: 10.1038/nrd3253. Review. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Nov;9(11):897.

Egawa M, Hirao T, Takahashi M. In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta Derm. Venereol.*, 2007; 87: 4-8.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol*. 2010;159(7):1463-74

Fernandez P, André V, Rieger J, Kuhnle A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion, *Coll. Surf.* 2004; 251: 53-8. DOI:10.1016/j.colsurfa.2004.09.029

Feuerstein I, Geller AC. Skin cancer education in transplant recipients. *Prog Transplant.* 2008 Dec;18(4):232-41; quiz 242. Review.

Field JJ, Díaz JF, Miller JH. The binding sites of microtubule-stabilizing agents. *Chem Biol.* 2013 Mar 21;20(3):301-15.

Firnhaber JM. Diagnosis and treatment of Basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician.* 2012 Jul 15;86(2):161-8. Review.

Formariz TP, Urban MCC, Junior AAS, Gremião MPD, Oliveira AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *RBCF. Rev bras ciênc farm. (Impr).* 2005; 41(3): 301-13.

Friedman DI, Schwarz JS, Weisspapir M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pharm Sci.* 1995 Mar;84(3):324-9.

Galiczynski EM, Vidimos AT. Nonsurgical treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Clin.* 2011 Apr;29(2):297-309, x. doi: 10.1016/j.det.2011.01.011.

Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, Threlfall WJ. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995 Feb;131(2):157-63.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005 Jan;41(1):45-60. Review.

Gloster HM Jr., Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg.* 1996;22:217-26.

Golden GM, McKie JE, Potts RO. Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J Pharm Sci.* 1987 Jan;76(1):25-8.

Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs.* 2013 Aug;29(3):160-9. doi: 10.1016/j.soncn.2013.06.002. Review.

Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7:1041-53.

Hackbarth M, Haas N, Fotopoulou C, Lichtenegger W, Sehouli J. Chemotherapy-induced dermatological toxicity: frequencies and impact on quality of life in women's cancers. Results of a prospective study. *Support Care Cancer.* 2008;16:267-73.

Hadgraft J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* 1999 Jul 5;184(1):1-6. Review.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996 Jun 14;85(6):841-51.

Haines, R. *Optical Microscopy of Materials*. Glasgow: International Textbook Company; 1984. 199 p.

Han F, Li S, Yin R, Liu H, Xu L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physiochem Eng Asp*. 2008;Feb315(1–3):210-6.

Harris JR, Graham JM, Rickwood D. *Cell biology protocols*. England: John Wiley & Sons Ltd.; 2005. 418 p.

Hashimoto N, Nakamichi N, Uwafuji S, Yoshida K, Sugiura T, Tsuji A, Kato Y. ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of the skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate. *J Control Release*. 2013 Jan 10;165(1):54-61.

Hathout RM, Woodman TJ, Mansour S, Mortada ND, Geneidi AS, Guy RH. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *Eur J Pharm Sci*. 2010 Jun 14;40(3):188-96.

Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 May 22;60(8):876-85.

Hegde UP, Grant-Kels JM. Metastatic melanoma in the older patient: special considerations. *Clin Dermatol*. 2013 May-Jun;31(3):311-6.

Heidary N, Naik H, Burgin S. Chemotherapeutic agents and the skin: An update. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Apr;58(4):545-70.

Heidor R, Ortega JF, de Conti A, Ong TP, Moreno FS. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Curr Drug Targets*. 2012 Dec;13(14):1720-9.

Hosmer J, Reed R, Bentley MV, Nornoo A, Lopes LB. Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(2):589–596.

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 Apr;100(4):1444-55.

Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of Paclitaxel: impact of the monoglyceride. *Pharm Res*. 2013;30(3):694–706.

Hyde ST. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001 chap 16: 299-332.

Iglesias GG, Hurtado Y, Palma-Lara I, López-Marure R. Resistance to the antiproliferative effect induced by a short-chain ceramide is associated with an increase of glucosylceramide synthase, P-glycoprotein, and multidrug-resistance gene-1 in cervical cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Oct;74(4):809-17.

Ingham PW. The patched gene in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb;8(1):88-94. Review. Erratum in: *Curr Opin Genet Dev* 1998 Jun;8(3):371.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acessado em: 16/06/2014 as 20:39 horas.

Jafari SM, Assadpoor E, He, Y, Bhandari B. Re- coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 2008; 22:1191- 1202.

Jarell AD, Lawrence D, Tsao H. The RAS/mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in melanoma biology and therapeutics. *Biologics*. 2007 Dec;1(4):407-14.

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.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science (Wash DC)* 1996;272:1668–71.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):253-65.

Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto EK, Takahashi K, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs I. Prescription design, *J Controlled Release*, 2002;81:65–74.

Kendall AC, Pilkington SM, Massey KA, Sassano G, Rhodes LE, Nicolaou A. Distribution of bioactive lipid mediators in human skin. *J Invest Dermatol*. 2015 Jun;135(6):1510-20. doi: 10.1038/jid.2015.41.

Kibbi N, Ariyan S, Faries M, Choi JN. Treatment of in-transit melanoma with intralesional bacillus Calmette-Guérin (BCG) and topical imiquimod 5% cream: a report of 3 cases. *J Immunother*. 2015 Nov-Dec;38(9):371-5. doi: 10.1097/CJI.0000000000000098.

Kim CK, Cho YJ, Gao ZG. Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery. *J Control Release*. 2001 Jan 29;70(1-2):149-55.

Kitson N, Thewalt JL. Hypothesis: the epidermal permeability barrier is a porous medium. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 2000;208:12-5.

Klang V, Schwarz JC, Matsko N, Rezvani E, El-Hagin N, Wirth M, Valenta C. Semi-solid Sucrose Stearate-Based Emulsions as Dermal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2011 May 30;3(2):275-306.

Kogan A, Aserin A, Garti N. Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution. *J Colloid Interface Sci*. 2007 Nov 15;315(2):637-47.

Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006 Nov 16;123-126:369-85. Epub 2006 Jul 14. Review.

Kong M, Park HJ. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers*, 2011; 83:1303-10, 2011.

Kopke LFF, Schmidt SM. Carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2002;77:249-82.

Kreilgaard M, Pedersen EJ, Jaroszewski JW. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release*. 2000 Dec 3;69(3):421-33.

Kreilgaard M. Influence of microemulsionson cutaneous drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev*. 2002 Nov 1;54:S77-S98.

Kuefer R, Hofer MD, Altug V, Zorn C, Genze F, Kunzi-Rapp K, Hautmann RE, Gschwend JE. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26;90(2):535-41.

Kuswahyuning R, Roberts MS. Concentration dependency in nicotine skin penetration flux from aqueous solutions reflects vehicle induced changes in nicotine stratum corneum retention. *Pharm Res*. 2014 Jun;31(6):1501-11. doi: 10.1007/s11095-013-1256-4. Epub 2014 Jan 23.

Lau DH, Xue L, Young LJ, Burke PA, Cheung AT. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm*. 1999 Feb;14(1):31-6.

Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Dec 6;45(1):89-121.

Legrand P, Barratt G, Mosqueira V, Fessi H, Devissaguet J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *S.T.P. Pharma Sci.*, Paris 1999; 9:411-18.

Leonardi GR. *Cosmetologia aplicada*. São Paulo: Medfarma, 2004. 234 p.

Li R, Blanchette-Mackie EJ, Ladisch S. Induction of endocytic vesicles by exogenous C(6)-ceramide. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23;274(30):21121-7. PubMed PMID: 10409665.

Lipsky NG, Pagano RE. Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 May;80(9):2608-12.

Liu W, Sun D, Li C, Liu Q, Xu J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J Colloid Interface Sci*. 2006 Nov 15;303(2):557-63.

Lopes LB, Carvalho VF, de Lemos DP. Potential of peptide-based enhancers for transdermal delivery. *Curr Pharm Des*. 2015;21(20):2814-22. Review.

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.

Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*. 2014 Feb 28;6(1):52-77. doi: 10.3390/pharmaceutics6010052.

Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 ° Å resolution. *J Mol Biol*. 2001;313(5):1045–57.

Maden V, Leah JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet* 2010; 375:673-85.

Malcolmson C, Lawrence MJ. Three-component non-ionic oil-in-water microemulsions using polyoxyethylene ether surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1995; 4: 97-109.

Malheiro AR, Varanda LC, Perez J, Villullas HM.. The aerosol OT+n-butanol+n-heptane+water system: phase behavior, structure character-ization, and application to Pt70Fe30 nanoparticle synthesis. *Langmuir*, 2007 (23), 11015–20.

Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pougna JL, Perrin C. Hemolysis by surfactants- -A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016 Feb;228:1-16. doi: 10.1016/j.cis.2015.10.011. Epub 2015 Nov 11. Review.

Martin OC, Comly ME, Blanchette-Mackie EJ, Pentchev PG, Pagano RE. Cholesterol deprivation affects the fluorescence properties of a ceramide analog at the Golgi apparatus of living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 1;90(7):2661-5.

Martini, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química 106f. [Dissertação (mestrado)] - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Mason TG, Krall A H, Gang H, Bibette J, Weitz DA. *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Becher New York: Dekker; 1996;4:299.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM, J. *Phys.: Condens. Matter*, 2006;18:R635–R66.

Mason TG. New fundamental concepts in emulsion rheology Curr. Opin. 4Colloid Interface Sci. 1999;4:231.

McCarley KD, Bunge AL. Pharmacokinetic models of dermal absorption. J Pharm Sci. 2001 Nov;90(11):1699-719. Review.

McClements DJ. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. Crit Rev Food Sci Nutr. 2007;47(7):611-49.

McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter. 2012;8:1719-29.

Micali G, Lacarrubba F, Nasca MR, Ferraro S, Schwartz RA. Topical pharmacotherapy for skin cancer: part II. Clinical applications. J Am Acad Dermatol. 2014 Jun;70(6):979.e1-12; quiz 9912. doi: 10.1016/j.jaad.2013.12.037.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. AIChE J. 1975;21(5):985–96.

Miles A, Berthet A, Hopf NB, Gilliet M, Raffoul W, Vernez D, Spring P. A new alternative method for testing skin irritation using a human skin model: a pilot study. Toxicol In Vitro. 2014 Mar;28(2):240-7.

Morad SA, Levin JC, Shanmugavelandy SS, Kester M, Fabrias G, Bedia C, Cabot MC. Ceramide--antiestrogen nanoliposomal combinations--novel impact of hormonal therapy in hormone-insensitive breast cancer. Mol Cancer Ther. 2012 Nov;11(11):2352-61. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0594.

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.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Myrick D, Blackinton D, Klostergaard J, Kouttab N, Maizel A, Wanebo H, Mehta S. Paclitaxel-induced apoptosis in Jurkat, a leukemic T cell line, is enhanced by ceramide. Leuk Res. 1999;23:569–78.

Nishihata T, Kamada A, Sakai K, Takahashi K, Matsumoto K, Shinozaki K, Tabata Y, Keigami M, Miyagi T, Tatsumi N. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. International Journal of Pharmaceutics, sep;1988, 46:1-7.

Nogueira PL, Correia AA, Morgado R. Tecnologia Farmacêutica. 3 ed., vol. II. Lisboa (Portugal): Fundação Calouste Gulbenkian; 1995. 1442 p.

Norling T, Lading P, Engström S, Larsson K, Krog N, Nissen SS. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use

in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1992 Oct;19(9 Pt2):687-92.

OECD (2015), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Publishing, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):11752-77. Review.

Orsini RC, Catanzariti A, Saltrick K, Mendicino RW, Stokar L. Basal cell carcinoma of the nail unit: a case report. *Foot Ankle Int*. 2001;22:675-8.

Ostrega J, Steinmetz C, Poulsen B. Significance of vehicle composition. I. Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability, and clinical efficacy. *J Pharm Sci*. 1971 Aug;60(8):1175-9.

Pandit AS, Geiger EJ, Ariyan S, Narayan D, Choi JN. Using topical imiquimod for the management of positive in situ margins after melanoma resection. *Cancer Med*. 2015 Apr;4(4):507-12.

Paolino D, Celia C, Trapasso E, Cilurzo F, Fresta M. Paclitaxel-loaded ethosomes(R): potential treatment of squamous cell carcinoma, a malignant transformation of actinic keratoses. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(1):102–112.

Patel K, Patil A, Mehta M, Gota V, Vavia P. Oral delivery of paclitaxel nanocrystal (PNC) with a dual Pgp-CYP3A4 inhibitor: preparation, characterization and antitumor activity. *Int J Pharm*. 2014 Sep 10;472(1-2):214-23.

Patel N, Schmid U, Lawrence MJ. Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods. *J Agric Food Chem*. 2006 Oct 4;54(20):7817-24.

Pepe D, McCall M, Zheng H, Lopes LB. Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent. *J Pharm Sci*. 2013 102(5):1476-87.

Pepe D, Phelps J, Lewis K, Dujack J, Scarlett K, Jahan S, Bonnier E, Milic-Pasetto T, Hass MA, Lopes LB. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. *Int J Pharm*. 2012 Sep 15;434(1-2):420-8.

Pianovski AR, Vilela AFG, Da Silva AAS, Lima CG, Silva KK, Carvalho VFM, Muis CR, Machado SRP, Ferrari M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008 Apr./June;44(2).

Podlogar F, Gasperlin M, Tomsic M, Jamnik A, Rogac MB. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm*. 2004 May 19;276(1-2):115-28.

Podlogar F, Bester Rogac M, Gasperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofene release. *Int J Pharm.* 2005 Sep 30;302(1-2):68-77.

Porter RS. The Merck manual of diagnosis and therapy. 19th ed. West Point, (PA): Merck Sharpe & Dohme Corp; 2011. 4103 p.

Potter D, Booth ED, Brandt HC, Loose RW, Priston RA, Wright AS, Watson WP. Studies on the dermal and systemic bioavailability of polycyclic aromatic compounds in high viscosity oil products. *Arch Toxicol.* 1999 Apr-May;73(3):129-40.

Prista LN, Alves AC, Morgado R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 2ª ed., vol. II. Lisboa (Portugal): Fundação Calouste Gulbenkian;1979. 786 p.

Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, Wanebo H, Kouttab N, Chu W, Wan Y. Paclitaxel and ceramide synergistically induce cell death with transient activation of EGFR and ERK pathway in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 2006 Oct;16(4):907-13. PubMed PMID: 16969513.

Quillet-Mary A, Jaffrézou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21388-95.

Rassu G, Cossu M, Langasco R, Carta A, Cavalli R, Giunchedi P, Gavini E. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015 Oct 31;136:908-917.

Renliang XU. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology.* 2008 Apr; 6(2): 112–5.

Ridder KB, Davies-Cutting CJ, Kellaway IW. Surfactant solubility and aggregate orientation in hydrofluoroalkanes. *Int J Pharm.* 2005 May 13;295(1-2):57-65.

Rocha FP, Menezes AMB, Almeida Jr. HL, Tomasi E. Marcadores e fatores de risco para queratoses actínicas e carcinomas basocelulares: um estudo de casocontrole. *An Bras Dermatol.* 2004;79:441-54.

Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2007;157(Suppl 2):47-51.

Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, Coldiron BM. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the U.S. Population, 2012. *JAMA Dermatol.* 2015 Oct;151(10):1081-6.

Rohrer J, Partenhauser A, Hauptstein S, Gallati C, Matuszczak B, Abdulkarim M, Gumbleton M, Bernkop-Schnürch A. Mucus permeating thiolated self emulsifying drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Nov 17. pii: S0939-6411(15)00454-3.

Rongioletti F, Zaccaria E, Viglizzo G. Failure of topical 0.1% alitretinoin gel for classic Kaposi sarcoma: first European experience. *Br J Dermatol*. 2006 Oct;155(4):856-7.

Roozeboom MH, Arits AH, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Overall treatment success after treatment of primary superficial basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized trials. *Br J Dermatol*, 167 (2012), pp. 733–56.

Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, Sterry W, Stockfleth E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol*. 2007 May;156 Suppl 3:8-12. Erratum in: *Br J Dermatol*. 2007 Aug;157(2):431.

Sahle FF, Wohlrab J, Neubert RH. Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014 Feb;86(2):244-50.

Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan;42(1 Pt 2):4-7. Review.

Santos, Manoela Tiago dos. Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico [Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2011.

Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*. 2001 Mar 14;215(1-2):51-6.

Scott MP, Epstein EH Jr. Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome. *J Invest Dermatol*. 1998 Jun;110(6):885-8.

Selimovica D, Hassana M, Haikelc Y, Hengge UR. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cellular Signalling*. 2008 Feb 20 (2): 311-22.

Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rüdiger HA, Sindram D, Hannun YA, Clavien PA. Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):1233-40.

Shai A, Maibach HI, Baran R. *Handbook of Cosmetic Skin Care*: 2. ed. London: Informa UK Ltd.; 2009. 296 p.

Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int J Pharm*. 2005 Apr 11;293(1-2):261-70.

Shi VY, Tran K, Patel F, Leventhal J, Konia T, Fung MA, Wilken R, Garcia MS, Fitzmaurice SD, Joo J, Monjazeb AM, Burrall BA, King B, Martinez S, Christensen SD, Maverakis E. 100% Complete response rate in patients with cutaneous metastatic melanoma treated with intralesional interleukin (IL)-2, imiquimod, and topical retinoid combination therapy: results of a case series. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Oct;73(4):645-54.

Silva JA, Apolinário AC, Souza MSR, Damasceno BPGL, Medeiros ACD. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2010;31(3):125-31 ISSN 1808-4532.

Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação In Vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quím Nova*. 2009; 32(6):1389-93.

Sintov AC, Shapiro L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J Control Release*. 2004 Mar 5;95(2):173-83.

Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM. P glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Exp Dermatol*. 2011 May;20(5):450-2.

So PL, Lee K, Hebert J, Walker P, Lu Y, Hwang J, Kopelovich L, Athar M, Bickers D, Aszterbaum M, Epstein EH Jr. Topical tazarotene chemoprevention reduces Basal cell carcinoma number and size in Ptch1+/- mice exposed to ultraviolet or ionizing radiation. *Cancer Res*. 2004 Jul 1;64(13):4385-9.

Soares AS, Costa VM, Diniz C, Fresco P. Potentiation of cytotoxicity of paclitaxel in combination with CI-IB-MECA in human C32 metastatic melanoma cells: A new possible therapeutic strategy for melanoma. *Biomed Pharmacother*. 2013, Oct;67(8):777-89.

Soengas MS, Capodiec P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):207-11.

Solans C, Izqueiro P, Nolla J, Azemar N, Celma MJG. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005;10:102-10.

Stover TC, Sharma A, Robertson GP, Kester M. Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3465-74.

Swetter SM, Chen FW, Kim DD, Egbert BM. Imiquimod 5% cream as primary or adjuvant therapy for melanoma in situ, lentigo maligna type. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Jun;72(6):1047-53. doi: 10.1016/j.jaad.2015.02.008. Epub 2015 Mar 17.

Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 May 20;108-109:303-18.

Tan Y, Xu K, Li L, Liu C, Song C, Wang P. Fabrication of size-controlled starch-based nanospheres by nanoprecipitation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2009 Apr;1(4):956-9.

Tang J, Wang Y, Wang D, Wang Y, Xu Z, Racette K, Liu F. Key structure of brij for overcoming multidrug resistance in cancer. *Biomacromolecules.* 2013;11;14(2):424-30.

Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006;19(2):106-21. Epub 2006 May 9.

Trotta M, Morel S, Gasco MR. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. *Pharmazie.* 1997 Jan;52(1):50-3.

Tsai CJ, Hsu LR, Fang JY, Lin HH. Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. *Biol Pharm Bull.* 1999. Apr;22(4):397-401. PubMed PMID: 10328561.

Tull S; Nunley K; Sengelmann R. Nonsurgical treatment modalities for primary cutaneous malignancies. *Dermatol Surg.* 2008; 34(7):859-72. Doi: 10.1111/j.1524-4725.2008.34170.x

Van Vlerken LE, Duan Z, Little SR, Seiden MV, Amiji MM. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of Paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model. *Mol Pharm.* 2008 Jul-Aug;5(4):516-26. doi: 10.1021/mp800030k.

Vleeschauwer DD, Meeren PVD. Colloid chemical stability and interfacial properties of mixed phospholipid–non-ionic surfactant stabilised oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 15 July 1999; 152 (1–2): 59-6.

Wainstein AJA., Belfort FA. Conduta para o melanoma cutâneo. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2004, June; 31(3): 204-14.

Walkley K. Bound water in stratum corneum measured by differential scanning calorimetry. *J Invest Dermatol.* 1972 Sep;59(3):225-7.

Wang Z, Diao Z, Liu F, Li G, Zhang G. Microstructure and rheological properties of liquid crystallines formed in Brij 97/water/IPM system. *J Colloid Interface Sci.* 2006 May 15;297(2):813-8.

Wasutrasawat P, Al-Obaidi H, Gaisford S, Lawrence MJ, Warisnoicharoen W. Drug solubilisation in lipid nanoparticles containing high melting point triglycerides. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Nov;85(3 Pt A):365-71.

Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677–2681.

Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, Baker JR Jr, Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*. 1990 Jul;8(7):1263-8.

Wertz PW, Downing DT. Stratum corneum: biological and biochemical considerations. J. Hadgraft, R.H. Guy (Eds.), *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*. New York: Marcel Dekker;1989. pp 1–22.

Wetzig T, Maschke J, Kendler M, Simon JC. Treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009 Dec;7(12):1075-82; quiz 1083.

Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004; 27;56(5):603-18. Review.

Woodcock J. Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life*. 2006 Aug;58(8):462-6. Review.

Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*. 1999 Oct;291(10):555-9.

Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):299-305.

Yuan JS, Yip A, Nguyen N, Chu J, Wen XY, Acosta EJ. Effect of surfactant concentration on transdermal lidocaine delivery with linker microemulsions. *Int J Pharm*. 2010 Jun 15;392(1-2):274-84.

Zaffaroni M, Frapolli R, Colombo T, Fruscio R, Bombardelli E, Morazzoni P, Riva A, D'Incalci M, Zucchetti M. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of the novel C-Seco-taxane derivative (IDN 5390) in mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Nov 15;780(1):93-8.

Zghoul N, Fuchs R, Lehr CM, Schaefer UF. Reconstructed skin equivalents for assessing percutaneous drug absorption from pharmaceutical formulations. *ALTEX*. 2001;18(2):103-6. PubMed PMID: 11378682.

Zhang J, Michniak-Kohn B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *Int J Pharm*. 2011 Dec 12;421(1):34-44.

Zhang P, Fu C, Hu Y, Dong C, Song Y, Song E. C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKC ζ tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Sci Rep*. 2015 Mar 20;5:9275. doi: 10.1038/srep09275