UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanocarreadores contendo ftalocianina de cloroalumínio:
desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação *in vitro*
da fotocitotoxicidade em melanoma**

Marigilson Pontes de Siqueira Moura

Ribeirão Preto

2011

RESUMO

SIQUEIRA-MOURA, M. P. **Nanocarreadores contendo ftalocianina de cloroalumínio: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da fotocitotoxicidade em melanoma.** 2011. 114f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) contra o melanoma cutâneo tem encontrado várias limitações devido à interferência de cromóforos endógenos (melanina) na irradiação deste tipo de câncer de pele. Agentes fotossensibilizantes que absorverem em comprimentos de onda superiores a 650 nm evitam a competição com a melanina (absorção máxima 530 nm). Neste cenário, surge a ftalocianina de cloroalumínio com forte absorção entre 670-680 nm. Entretanto, esta molécula é lipofílica, o que impede sua aplicação na terapêutica. Para superar este problema, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos hidrofóbicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito fotodinâmico de CIAIPc encapsulada em nanocápsulas e nanopartículas de organogel. As nanocápsulas contendo CIAIPc foram obtidas pelo método de nanoprecipitação por meio de um planejamento fatorial 2^3 e as nanopartículas de organogel contendo CIAIPc foram preparadas pela dispersão a quente do organogel em solução aquosa. Ambas as formulações coloidais foram caracterizadas com relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão (IPd), potencial zeta, eficiência de encapsulação (E.E.) e estabilidade física. Os ensaios *in vitro* de toxicidade e fotocitotoxicidade de CIAIPc nanoencapsulada e/ou livre foram realizados sobre as linhagens melanocíticas WM1552C, WM278, WM1617 e B16-F10. O método de nanoprecipitação foi capaz de produzir nanocápsulas em tamanho nanométrico (233,0 nm $\pm$ 2,00), com uma distribuição de tamanho homogênea e monodispersa (0,309 $\pm$ 0,0038), bem como potencial zeta significativamente negativo de - 29,6 mV ($\pm$ 3,91). A formulação de nanocápsulas apresentou uma boa E.E. de 63,7% para a CIAIPc. O conteúdo de CIAIPc presente nas formulações de nanocápsulas foi determinado pelos métodos analíticos espectrofotométrico e espectrofluorimétrico validados, os quais foram capazes de quantificar a CIAIPc com precisão e exatidão. O estudo de estabilidade física das formulações de nanocápsulas revelou o caráter estável desta formulação por um período de até 12 meses. As nanopartículas de organogel contendo CIAIPc apresentaram diâmetro médio de 282,7 nm ($\pm$ 2,99), IPd de 0,343 ($\pm$ 0,0280) e potencial de superfície de + 49,3 mV ($\pm$ 1,84). A formulação de nanopartículas de organogel apresentou uma E.E. de CIAIPc de 60%. O estudo de estabilidade física também revelou um comportamento estável das nanopartículas de organogel por um período de 6 meses. Os estudos de toxicidade na ausência de luz demonstraram o caráter biocompatível das nanocápsulas desenvolvidas e foi possível comprovar o excelente efeito fototóxico da CIAIPc nanoencapsulada sobre todas as linhagens melanocíticas com combinação de 0,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIAIPc nanoencapsulada e doses de luz de 150 ou 500 mJ.cm^{-2} , nestas condições a fração de morte celular foi superior a 90%. Portanto, estes resultados confirmam o potencial de nanocarreadores contendo CIAIPc como sistema de veiculação de compostos hidrofóbicos aplicados à TFD.

Palavras-chave: Nanocápsulas, Nanopartículas de organogel, Ftalocianina de cloroalumínio, Terapia Fotodinâmica, Melanoma.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A pele e o melanoma maligno

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa, aproximadamente, 16% do total do peso corporal. É constituída essencialmente, por três camadas histológicas superpostas: epiderme, derme (Figura 1) e hipoderme (WICKETT e VISSCHER, 2006).

A pele tem a função principal de barreira de defesa, a qual está intrinsecamente associada a sua camada mais externa, a epiderme. Tal função tem sido chamada “*la raison d’être*” da epiderme, uma vez que a barreira epidermal é responsável por limitar a perda de água pelo organismo, reduzir a absorção de compostos químicos e prevenir infecções microbianas (Le HIR, 2006; WICKETT e VISSCHER, 2006).

O tipo de célula predominante na epiderme é o queratinócito, que no seu passo final de diferenciação celular é transformado em corneócito (escamoso). Há várias camadas epidermais, entre elas destacam-se a mais externa, chamada estrato córneo, e a mais interna, a camada basal (germinativa). O estrato córneo é formado pelos corneócitos, os quais são circundados por uma densa porção proteica (envelope celular) e regiões lipídicas, composição primordial na função de defesa (barreira) da pele humana (BOUWSTRA e PONEC, 2006).

Figura 1. Ilustração da epiderme mostrando as camadas principais (Adaptada de WICKETT e VISSCHER, 2006).

O câncer de pele se inicia na epiderme, a qual é composta essencialmente por três tipos de células: escamosas, basais e melanocíticas. A neoplasia cutânea pode ser dividida em dois tipos: o tipo não melanocítico derivado de células epiteliais (carcinomas basocelular e epidermoide ou escamoso) e o tipo melanoma originado dos melanócitos, células estas responsáveis pela produção do pigmento conhecido como melanina (WICKETT e VISSCHER, 2006; MADAN et al., 2010).

A causa principal dos cânceres cutâneos está associada à exposição crônica à radiação solar UVB e UVA desde a infância e a fatores hereditários. Além disso, devido à depleção da camada de ozônio, o aumento da exposição à radiação UVB tem elevado a preocupação com a futura incidência mundial do câncer de pele (SLAPER et al., 1998; CHO e CHIANG, 2010; MADAN et al., 2010).

Para ambos os sexos, o câncer de pele é o mais incidente em todo o mundo, e tem se tornado um grande problema de saúde pública, uma vez que desde a década de 1940 a incidência global da neoplasia cutânea teve um aumento de mais de 600% (ODASHIRO et al., 2005; ZAIDI et al., 2008).

Em 2010, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que o câncer de pele do tipo não melanocítico seja o mais incidente na população brasileira, com cerca de 115 mil novos casos/ano. Por outro lado, o melanoma de pele é menos frequente do que os carcinomas basocelulares e escamosos, porém sua letalidade é mais elevada, com previsão no Brasil de 6000 novos casos de melanoma cutâneo para o ano de 2010, ao passo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorreram anualmente 132 mil novos casos de melanoma maligno em todo mundo. Um fato tem preocupado as autoridades de saúde pública: um expressivo crescimento na incidência do melanoma de pele no mundo inteiro, sobretudo em população de cor de pele tipo branca. Na França e nos Estados Unidos, no período entre 1975-2005, a incidência do melanoma maligno cutâneo triplicou (REMONTET et al., 2003; GOLDBERG et al., 2007; JEMAL et al., 2008; INCA, 2009; MUHRER, 2009; CHO e CHIANG, 2010).

O estabelecimento do melanoma maligno é um processo que envolve vários estágios (Figura 2) (ZAIDI et al., 2008). O modelo descrito por Meier et al. (1998) para a progressão do melanoma segundo suas características clínicas e

histopatológicas propõe o estabelecimento de cinco estágios principais: (1) nevo comum congênito ou adquirido: melanócitos estruturalmente normais; (2) nevo displásico: melanócitos com atipia estrutural e arquitetural; (3) melanoma em fase de crescimento radial (*radial growth phase*, RGP): confinado à epiderme, crescendo lateralmente; (4) melanoma primário em fase de crescimento vertical (*vertical growth phase*, VGP): início da invasão da derme e aquisição de competência para a metástase e (5) melanoma metastático (Figura 2). Contudo, dados clínicos sugerem que nem todos os melanomas surgem de forma tão gradual e esta neoplasia cutânea metastática pode surgir em pacientes sem melanoma primário diagnosticado (ZAIDI et al., 2008).

O diagnóstico precoce do melanoma é fundamental para atingir a cura. No entanto, apesar dos significantes progressos científicos no entendimento da biologia e genética do melanoma, nenhum tratamento efetivo contra esse tipo de câncer está disponível atualmente (VILLANUEVA e HERLYN, 2008; ZAIDI et al., 2008; MUHRER, 2009).

Figura 2. Esquema mostrando os cinco estágios principais do desenvolvimento do melanoma cutâneo humano (Adaptada de ZAIDI et al., 2008).

1.2 – Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como um tratamento promissor para diversas patologias dermatológicas, sobretudo as neoplasias cutâneas (BROWN et al., 2004; BUGGIANI et al., 2008; MacCORMACK, 2008).

A TFD é um tratamento clínico baseado na administração de uma molécula fotossensibilizante por via sistêmica ou tópica ao paciente. Em seguida, após um período de tempo adequado, a região lesionada é seletivamente irradiada com uma fonte de luz com um comprimento de onda capaz de excitar a molécula fotoativa, a qual, na presença do oxigênio tecidual, resulta na produção de espécies citotóxicas e, conseqüentemente, na morte celular (ROBERTSON et al., 2009; RAI et al., 2010).

Os processos de absorção da luz e transferência de energia são os dois aspectos mais importantes que regem a TFD (Figura 3).

Um composto fotossensibilizante em seu estado normal é caracterizado por elétrons emparelhados com *spins* contrários em orbital molecular de baixo nível de energia, configuração conhecida como estado singlete, e a configuração dos elétrons em orbital energeticamente inferior chamada de estado fundamental (PS^0). Entretanto, seguida a absorção de luz na forma de fótons, um destes elétrons da molécula fotoativa é impulsionado para um orbital de maior nível energético, atingindo o primeiro estado singlete excitado ($^1PS^*$), mas sem mudança de seu *spin*. Logo após um curto período de tempo (nanossegundos), a molécula excitada retorna ao seu estado fundamental emitindo fótons (emissão de fluorescência) ou por meio de conversão interna em calor. Além disso, o agente fotossensibilizante no estado singlete excitado pode sofrer também um processo conhecido como cruzamento intersistemas, invertendo o *spin* do elétron excitado, o que propicia a formação do estado triplete excitado ($^3PS^*$), estado este distinguido por elétrons desemparelhados e com o mesmo *spin*, bem como por tempo de vida longo dos estados excitados (microsegundos). O composto fotoativo no seu estado triplete excitado retorna ao seu estado fundamental emitindo um quantum de radiação eletromagnética e este processo é conhecido como fosforescência (Figura 3) (CASTANO et al., 2004; PLAETEZER et al., 2009; ROBERTSON et al., 2009).

Os compostos fotossensibilizantes no estado triplete excitado podem induzir reações fotoquímicas em moléculas próximas. Tais reações são conhecidas como Reações do Tipo I e Tipo II (Figura 3) (KONAN et al., 2002).

Na reação fotoquímica do Tipo I ocorre transferência de elétrons ou prótons ao oxigênio ou outras moléculas adjacentes produzindo ânions ou cátions radicais, respectivamente. É provável que estes radicais reajam com o oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando frequentemente na formação de íons superóxido devido à transferência de um elétron da molécula fotoativa para o oxigênio molecular. Na reação do Tipo II a molécula fotossensibilizante no seu estado triplete excitado transfere sua energia, e não elétrons, diretamente ao oxigênio molecular para formar o primeiro estado excitado do oxigênio, mais conhecido como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (MACHADO, 2000; KÜBLER, 2005; FICHEUX, 2009; PLAETEZER et al., 2009). Ambas as reações fotoquímicas podem ocorrer simultaneamente e a proporção entre estas reações depende do agente fotoativo usado, bem como das concentrações de substrato e oxigênio (ROBERTSON et al., 2009; PLAETEZER et al., 2009).

Figura 3. Diagrama de Jablonski para o processo de fotoativação. E - energia; PS - molécula fotossensibilizante; PS^0 - PS estado fundamental; $^1\text{PS}^*$ - PS estado singleto excitado; $^3\text{PS}^*$ - PS estado triplete excitado (Adaptada de KONAN et al., 2002).

De forma geral, os mecanismos de ação farmacodinâmica de uma molécula fotossensibilizante são provenientes das reações fotoquímicas Tipos I e II e são o resultado de uma combinação de fenômenos físicos (interação da luz com a molécula), fenômenos químicos (produção de espécies reativas, ERO) e fenômenos biológicos (destruição do tumor) (FICHEUX, 2009).

O efeito final da aplicação terapêutica da TFD contra o câncer é o fotodano das células neoplásicas e destruição dos tecidos tumorais. A concentração, propriedades físico-químicas e localização subcelular do fármaco fotossensibilizante, além da concentração de oxigênio, comprimento de onda apropriado, intensidade de irradiação e propriedades específicas da célula podem afetar o modo e extensão da morte celular (CASTANO et al., 2005a; PLAETEZER et al., 2009).

O fotodano celular é causado, principalmente, pelas ERO e oxigênio singlete; os íons superóxido não são muito reativos em sistemas biológicos, mas podem reagir entre si, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. O peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas e não está restrito a um único compartimento nas células, o que o torna uma espécie relevante em produzir danos celulares. Íons superóxido são também importantes na produção de radical hidroxila altamente reativo ($HO^\bullet$), o qual pode atacar e oxidar várias moléculas intracelulares e, da mesma forma que o peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxila se difundem facilmente através das membranas causando danos generalizados (CASTANO et al., 2004; PLAETEZER et al., 2009).

O oxigênio singlete é também uma molécula altamente reativa e causa danos em vários alvos biológicos como membranas celular ou lisossomal, mitocôndrias, proteínas e ácidos nucleicos, o que proporciona excelente efeito citotóxico. Contudo, devido à alta reatividade e curto tempo de meia-vida do oxigênio singlete e radical hidroxila, somente moléculas e estruturas que estão próximas à área de localização da molécula fotoativa são diretamente afetadas pela TFD. Portanto, tal fotoativação é capaz de promover a destruição irreversível dos tecidos tumorais por meio de três formas principais (KONAN et al., 2002; PLAETEZER et al., 2003; CASTANO et al., 2005a; CASTANO et al., 2005b; KESSEL, 2006; FICHEUX, 2009):

- I – Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e oxigênio singlete causando diretamente a morte das células tumorais;

II – Efeito antivascolar, o qual pode causar trombose e hemorragia dos vasos tumorais levando à morte das células neoplásicas por privação de oxigênio e nutrientes;

III – Ativação da resposta imune contra as células tumorais por meio do processo de inflamação aguda e liberação de citocinas no tumor, resultando num influxo de macrófagos e leucócitos que podem contribuir para a destruição tumoral, bem como estimular o sistema imune a reconhecer e eliminar as células neoplásicas.

Na TFD, após o fotodano induzido pelas espécies citotóxicas, pode ocorrer reparo por meio dos mecanismos de sobrevivência celular ou morte das células via apoptose e/ou necrose (Figura 4) (PLAETEZER et al., 2003).

A apoptose é conhecida como morte celular “programada ou ativa” e é controlada por fatores intra e extracelulares, resultando em uma sequência de mudanças morfológica, bioquímica e energética. A necrose, por outro lado, é uma forma violenta e rápida de degeneração celular, a qual afeta uma grande extensão de células, sendo caracterizada por turgescência citoplasmática, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação do conteúdo intracelular e inflamação (PLAETEZER et al., 2003; CASTANO et al., 2005a).

Os principais fatores que determinam o tipo de morte celular após aplicação da TFD são o tipo de célula, tipo de agente fotossensibilizante e sua localização subcelular e dose de luz aplicada durante o tratamento (MOOR, 2000).

A literatura científica relata que fármacos fotossensibilizantes hidrofóbicos localizam-se na membrana mitocondrial e que a localização subcelular da molécula fotoativa é primordial no processo fotodinâmico, pois ela determina o sítio do dano primário. Assim, compostos fotossensibilizantes localizados na mitocôndria induzem rapidamente a apoptose, ao contrário daqueles encontrados na membrana lisossomal ou plasmática e este fato é explicado pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com rápida liberação de citocromo c no citoplasma e posterior ativação da cascata apoptótica. De uma forma geral, acredita-se também que doses mais baixas de irradiação resultam em mortes por apoptose e, por outro lado, elevadas doses de luz induzem morte celular via necrose (MOOR, 2000;

OLEINICK et al., 2002; PLAETEZER et al., 2003; CASTANO et al., 2005a; KESSEL, 2006).

Figura 4. Representação esquemática do princípio de tratamento fotodinâmico. PS_{ext} – agente fotossensibilizante (PS) no espaço extracelular; PS_{int} – PS no citoplasma; $^3PS^*_{int}$ – PS fotoativado; R1 – reação fotoquímica Tipo I; R2 – reação fotoquímica Tipo II (Adaptada de PLAETEZER et al., 2003).

1.2.1 – Agentes Fotossensibilizantes

Fundamentalmente, os agentes fotossensibilizantes são definidos como moléculas que produzem oxigênio singlete após estímulo luminoso (ALLISON et al., 2008).

A primeira geração de fármacos fotossensibilizantes foi constituída por compostos derivados de hematoporfirina (Hp). Contudo, estas primeiras moléculas demonstraram várias limitações, como baixa penetração tecidual da luz nos comprimentos de onda de absorção desses derivados da Hp. Esta e outras limitações impulsionaram a pesquisa de novos compostos, chamados de moléculas fotossensibilizantes de segunda geração, como ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas (PASZKO et al., 2011).

As características ideais de um agente fotossensibilizante são (CASTANO et al., 2004; BECHET et al., 2008):

- ✓ Composição estável e fotoestável;
- ✓ Síntese relativamente fácil e capaz de produzir em grande escala;
- ✓ Baixo nível de toxicidade quando não exposto à luz;
- ✓ Absorver a luz entre os comprimentos de onda (λ) de 600 a 800 nm, uma vez que as bandas de absorção em comprimentos de ondas inferiores (< 600 nm) têm menor penetração tecidual e bandas de absorção em comprimentos de ondas mais elevados (> 800 nm) não têm energia suficiente para excitar uma molécula ao seu estado tripleto;
- ✓ Ter um perfil farmacocinético de eliminação rápido do organismo evitando a fotossensibilidade tardia.

Entre tais compostos de segunda geração, as ftalocianinas recebem destaque por apresentarem um forte coeficiente de absorvidade molar na faixa espectral conhecida como “*Janela Fototerapêutica*”, entre 600 e 800 nm, uma vez que nesta faixa a penetração da luz no tecido (tumor) é elevada pela menor interferência de cromóforos endógenos do sistema biológico (hemoglobina, melanina) (SHARMAN et al., 1999).

1.2.1.1 – Ftalocianinas

As ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, o qual consiste de uma unidade cíclica tetrapirrólica (Figura 5). Entretanto, nas ftalocianinas, as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de hidrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via ponte de metileno. A conjugação do macrociclo da ftalocianina é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível (650-680 nm), que é a região do espectro mais útil no tratamento de tumores (NUNES et al., 2004; IDOWU e NYOKONG, 2007).

Metaloftalocianinas são moléculas fotossensibilizantes (Figura 5) aplicadas à TFD que possuem um metal no centro de seu macrociclo, resultando em complexos com eficiente efeito fotossensibilizante. A complexação das ftalocianinas com íons metálicos, como Zn^{2+} e Al^{3+} , dá origem a complexos com tempo de vida longo dos estados excitados singlete e triplete, os quais são produzidos com bons rendimentos quânticos e, conseqüentemente, excelentes atividades fotoquímica e fotodinâmica (NUNES et al., 2004; NYOKONG, 2007).

Figura 5. Estrutura de uma ftalocianina, onde M é o metal central (Zn, Al) e R representa possíveis substituintes (SO_3H , S_2 , F, $COOH$) (Extraída de NUNES et al., 2004).

Uma das vantagens para o emprego das ftalocianinas na TFD relaciona-se à sua seletividade pelos tecidos tumorais, baixa toxicidade e eficiência na produção de oxigênio singlete. Entre as ftalocianinas metálicas, a Ftalocianina de Cloroalumínio (CIAIPc) apresenta a propriedade fotofísica mais favorável para aplicação na TFD, ou seja, longo tempo de vida dos estados excitados (singlete e triplete), os quais são produzidos com bons rendimentos quânticos (ROSENTHAL e BEN-HUR, 1989).

Além de todas estas vantagens, as ftalocianinas absorvem em comprimento de onda superior a 650 nm, portanto podem ser aplicadas na terapêutica contra as neoplasias cutâneas pigmentadas; como as lesões do tipo melanoma, uma vez que a competição com o pigmento melanina, de absorção máxima em 530 nm, é mínima (CARTOZE, 2009; MAMOON et al., 2009). Entretanto, o principal fator que limita a

utilização da CIAIPc na TFD é sua considerável hidrofobicidade e consequente impossibilidade de administração direta por dissolução em meio fisiológico. Para superar este problema, esforços significantes têm sido direcionados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos usando várias tecnologias, dentre elas a nanotecnologia (KONAN et al., 2002; CHATTERJEE et al., 2008; CHEN et al., 2011; PASZKO et al., 2011).

1.3 – Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia aplicada à área farmacêutica propõe desenvolver formulações à base de nanocarreadores biocompatíveis e biodegradáveis. A característica mais importante desses nanocarreadores é sua habilidade em aprimorar a interação e liberação do princípio ativo no seu sítio alvo (célula, órgão ou microrganismo), provendo o máximo de eficácia terapêutica. Além disso, estes carreadores coloidais podem apresentar as seguintes vantagens: prolongar a permanência do fármaco na corrente sanguínea (comum aumento da meia-vida plasmática), proteger o princípio ativo da degradação química ou enzimática após administração, diminuir os efeitos colaterais e aumentar a biodisponibilidade. Além de todas estas vantagens, os nanocarreadores são capazes de veicular (encapsular) moléculas lipofílicas, o que possibilita a sua utilização na terapêutica (BECHET et al., 2008; HAMIDI et al., 2008; CHEN et al., 2011; PASZKO et al., 2011).

Na literatura científica, os principais carreadores coloidais de fármacos são nanopartículas poliméricas biodegradáveis (nanoesferas e nanocápsulas), nanoemulsão, micelas poliméricas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas magnéticas e, mais recentemente, nanopartículas de géis (KONAN et al., 2002; CHATTERJEE et al., 2008; HAMIDI et al., 2008; KIRILOV et al., 2008; SOUSSAN et al., 2009; CHEN et al., 2011).

1.3.1 – Nanocápsulas

O termo nanopartículas é tipicamente usado para definir sistemas coloidais de veiculação de fármacos cujo diâmetro varia entre 1 e 1000 nm (RAO e GECKELER, 2011).

Nanopartícula polimérica é uma expressão coletiva usada para designar tanto nanoesfera quanto nanocápsula, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica compacta, enquanto as nanocápsulas (NC) são constituídas por um núcleo líquido (geralmente oleoso) envolvido por uma membrana polimérica caracterizando um sistema nanovesicular do tipo reservatório (Figura 6) (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; SCHAFFAZICK et al., 2003; LETCHFORD e BURT, 2007; ANTON et al., 2008).

Os fármacos veiculados através de NC podem estar localizados no núcleo oleoso e/ou adsorvido à parede polimérica externa. A NC é uma forma galênica de grande interesse devido a sua cavidade central oleosa, a qual permite altas taxas de encapsulação de substâncias hidrofóbicas. As vantagens das NC com relação às nanoesferas é seu baixo conteúdo de polímero e maior capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos (LIMAYEM BLOUZA et al., 2006). A veiculação do princípio ativo no interior de NC permite mudar o perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e farmacodinâmico (ação terapêutica) destes compostos encapsulados, com consequente melhoria de sua ação, biodisponibilidade e/ou redução da toxicidade (MOSQUEIRA et al., 2000; COUVREUR et al., 2002; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Atualmente, é possível distinguir dois tipos principais de nanopartículas poliméricas: convencionais e de longa circulação (chamados de furtivos ou “*Stealth*”). As convencionais são caracterizadas por uma superfície hidrofóbica e, quando introduzidas no organismo, são rapidamente capturadas pelo sistema fagocitário mononuclear (macrófagos), o que reduz sua permanência na corrente sanguínea, aumentando a presença desses nanocarreadores em órgãos como fígado, baço e pulmão. Já os sistemas do tipo furtivos têm sua superfície modificada

pela introdução de moléculas hidrofílicas (polietilenoglicol - PEG, polissorbatos, etc), as quais diminuem a hidrofobicidade das partículas, o que aumenta sua permanência no sangue favorecendo a biodistribuição para tecidos além do sistema retículo endotelial (REDHEAD et al., 2001; AVGOUSTAKIS et al., 2003; OWENS III e PEPPAS, 2006).

Figura 6. Representação de uma nanocápsula contendo ftalocianina no núcleo oleoso (Extraída de PRIMO et al., 2008).

As nanopartículas têm recebido considerável atenção como sistemas de administração de medicamentos devido aos seguintes benefícios (TEIXEIRA et al., 2005):

- Veiculação de princípio ativo lipofílico (insolúvel nos fluidos orgânicos);
- Proteção contra degradação (seja enzimática ou hidrolítica) do conteúdo encapsulado;
- Liberação controlada e/ou sustentada de fármacos encapsulados;
- Otimização da dose administrada com consequente diminuição da toxicidade e reação adversa inerente à substância;

- Direcionamento a sítios específicos (tecidos, células, microorganismos).

Os principais polímeros utilizados para a produção de nanopartículas são policaprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) e seu copolímero poli-láctico-co-glicólico (PLGA). Tais polímeros são conhecidos pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade através de vias metabólicas clássicas (JAIN, 2000; PILLAI e PANCHAGNULA, 2001; HANS e LOWMAN, 2002; SANTOS et al., 2005). As nanopartículas poliméricas têm sido investigadas como sistemas carreadores de agentes antitumorais, antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, hormônios entre outros (COUVREUR et al., 2002; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Até o presente momento, são descritos na literatura três métodos para obtenção de NC (RAO e GECKELER, 2011): polimerização *in situ* de monômeros dispersos (AL KHOURI et al., 1986), deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989) e a técnica de emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Entre todos estes, o método de deposição interfacial do polímero pré-formado é o mais simples, apresentando a vantagem de resultar em dispersões coloidais homogêneas, nas quais o tamanho médio das NC varia entre 20 e 500 nm. Esta técnica está fundamentada no deslocamento de um solvente miscível em água com formação espontânea da suspensão coloidal. A deposição do polímero acontece no momento em que o solvente rapidamente se difunde para a fase aquosa. Considerando que a cavidade central é formada por um óleo (não tóxico), altas taxas de encapsulação de fármacos hidrofóbicos em NC têm sido relatadas (MORA-HUERTAS et al., 2010). Contudo, este método não é adequado para encapsular substâncias hidrofílicas (PINTO REIS et al., 2006).

As principais metodologias utilizadas para a caracterização físico-química de NC poliméricas são a avaliação morfológica, distribuição de tamanho e potencial de superfície de partículas, pH das suspensões coloidais, doseamento e determinação da taxa de encapsulação do fármaco, cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir da formulação e estudo de estabilidade das NC (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Recentemente, Santos et al. (2006) avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* de NC de PLGA contendo ácido úsnico frente ao Sarcoma 180 em camundongos.

Os resultados mostraram uma inibição do crescimento do tumor por volta de 70% no grupo de animais que foram tratados com NC contendo ácido úsnico, enquanto no grupo tratado com o ácido úsnico livre a inibição foi de apenas 40%, ambos comparados com o grupo controle. Na avaliação de sobrevida dos animais, o grupo tratado com a formulação coloidal teve uma taxa de sobrevida 33% maior do que o grupo tratado com o ácido livre. Estes resultados mostram que a nanoencapsulação do ácido úsnico foi capaz de manter e melhorar a atividade antitumoral do composto.

1.3.2 – Nanopartículas de organogel

As nanopartículas de géis são um novo tipo de dispersão coloidal que, recentemente, têm atraído considerável atenção como um promissor sistema de liberação nanoparticulado de fármacos, devido ao potencial único de combinar as características dos géis com as das nanopartículas (KIRILOV, 2007; HAMIDI et al., 2008; KIRILOV et al., 2008; BOUDIER et al., 2010). Primeiramente, para compreender as nanopartículas de organogel (NPOG) é necessário entender a forma galênica base desta preparação, o gel.

Há cerca de 70 anos, Dr. Jordan Lloyd declarou que *“o gel; é mais fácil reconhecê-lo do que defini-lo”*. Após esta declaração, vários conceitos foram elaborados para melhor esclarecer esta forma farmacêutica. Comumente, o gel é definido como um sistema coloidal constituído por componentes sólido (agente gelificante) e líquido (água ou líquido orgânico), no qual a fase sólida está presente na forma de uma rede ramificada de agregados que imobiliza a fase líquida impedindo que esta flua. De acordo com a composição da fase dispersante dos géis, eles são classificados em hidrogel ou organogel, este último também conhecido como lipogel ou oleogel. Os géis podem ser ainda classificados em gel físico, o qual é constituído por interações não covalentes fracas e reversíveis e gel químico, formado por ligações químicas covalentes e irreversíveis (TERECH e WEISS, 1997; ABDALLAH e WEISS, 2000a; HOFFMAN, 2002; MURDAN, 2005; MAITY, 2007; SHAPIRO, 2011).

Os organogéis são formas farmacêuticas semissólidas cuja fase dispersante é um líquido orgânico, por exemplo, um óleo, imobilizado por uma rede tridimensional formada pelo agente gelificante. Os agentes gelificantes para líquidos orgânicos podem ser moléculas poliméricas ou de baixo peso molecular, e são classificados em cinco categorias: ácidos graxos, esteroides e seus derivados, derivados de antracenos, ciclo(dipeptídeos) e sorbitol (KANG et al., 2005; MURDAN, 2005; MAITY, 2007; VINTILOIU e LEROUX, 2008).

Os agentes gelificantes de baixo peso molecular (AGBPM) são moléculas relativamente pequenas (~ 3000 Da), tendo como principal representante os derivados de ácidos graxos. Os géis formados com AGBPM possuem a vantagem de apresentar uma grande flexibilidade de seu uso associada à capacidade de gelificar mesmo em baixa concentração do agente gelificante, tipicamente > 2% (m/m) (ABDALLAH e WEISS, 2000a; KANG et al., 2005; MAITY, 2007).

O ácido 12-hidroxiesteárico (HSA) é o mais conhecido entre os AGBPM e bastante utilizado em preparações cosméticas sendo obtido a partir do óleo de rícino hidrogenado (Figura 7). As moléculas de HSA organizam-se no líquido orgânico através de ligações não covalentes, as quais formam fibras rígidas em uma rede tridimensional. Tais associações são estabelecidas por meio de ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxilas presentes no C₁₂ da molécula e também pela sequência de ligações de hidrogênio formadas entre os grupamentos carboxílicos presentes nas extremidades das fibras de HSA. Além disso, as forças de interação do tipo van der Waals entre as cadeias carbônicas da molécula de HSA contribuem para a rigidez das fibras (Figura 7) (TERECH e WEISS, 1997; KIRILOV, 2007; ROGERS et al., 2009).

Figura 7. Estrutura química do ácido 12-hidroxiesteárico (HSA) e organização tridimensional das moléculas de HSA (Adaptada de TERECH e WEISS, 1997 e KIRILOV, 2007).

Os organogéis obtidos com AGBPM são normalmente preparados pelo aquecimento do agente gelificante no líquido orgânico com posterior resfriamento da solução abaixo da temperatura de transição de gelificação (T_{gel}), sendo esta definida como a temperatura abaixo da qual o fluxo do líquido não é possível durante longos períodos (TERECH e WEISS, 1997; MURDAN, 2005; MAITY, 2007; KIRILOV et al., 2008). Em solução, a reorganização dos AGBPM através de ligações não covalentes origina as estruturas fibrosas responsáveis pelo fenômeno de gelificação. As forças de interação intermolecular, tais como pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e, atrações eletrostáticas são responsáveis por estabilizar a estrutura do organogel preparado com AGBPM (ABDALLAH e WEISS, 2000a; ABDALLAH e WEISS, 2000b; ROGERS et al., 2009).

Os organogéis possuem uma variedade de aplicações em formulações cosméticas e de medicamentos e moldes em engenharia tecidual e preparação de

nanomateriais (LI et al., 2009). Entretanto, apesar da grande variedade de organogéis, estes sistemas têm sido relativamente pouco explorados como sistema de liberação de medicamentos (KANG et al., 2005; MURDAN, 2005; VINTILOIU e LEROUX, 2008). Na área farmacêutica, a aplicação mais importante desses géis está voltada para formulações contendo fármacos lipofílicos para administração tópica (dérmica) ou transdérmica, mas os organogéis também têm sido avaliados em administração oral, retal e parenteral (MURDAN, 2005; PÉNZES et al., 2005; LIM et al., 2008; IWANAGA et al., 2010).

O maior desafio no desenvolvimento de formulações para aplicação tópica ou transdérmica está intimamente relacionado com a propriedade de barreira da pele humana, uma vez que a composição lipoproteica do estrato córneo é responsável por limitar a absorção de princípios ativos, dificultando qualquer ação farmacológica em camadas mais profundas da epiderme ou derme. Nesta perspectiva, os organogéis despontam como potenciais sistemas de liberação de fármacos para aplicação dérmica ou transdérmica, pois os componentes típicos desses géis, como fosfolipídios, tensoativos e ácidos graxos são bons promotores de permeação devido à capacidade de penetrar na dupla camada lipídica do estrato córneo, com consequente formação de defeitos (espaços), o que facilita a permeação de fármacos (WILLIAMS e BARRY, 2004; MURDAN, 2005; VINTILOIU e LEROUX, 2008).

Uma abordagem importante na concepção de novos sistemas de liberação de fármacos utilizando organogéis tem sido a obtenção de NPOG (Figura 8) (KIRILOV et al., 2008; BOUDIER et al., 2010), o que propicia, por exemplo, a encapsulação de fármacos hidrofóbicos e, no caso de uma aplicação tópica ou transdérmica, uma melhor interação das partículas carreadoras com o próprio estrato córneo e folículos pilosos, visto que a escala nanométrica ($< 1 \mu\text{m}$) confere à formulação a capacidade de penetrar através dos espaços intercelulares e via aparelho pilo-sebáceo (ALLEC et al., 1997; HAMIDI et al., 2008).

As dispersões aquosas de NPOG são preparadas em duas etapas consecutivas. Inicialmente, o óleo contendo o agente gelificante é aquecido formando uma mistura homogênea. Esta mistura é resfriada à temperatura ambiente com consequente formação do organogel. Numa segunda etapa, o organogel obtido

na etapa inicial é disperso em meio aquoso por ação de ultrassom induzido pela presença do agente estabilizante na fase aquosa. Em seguida, as nanogotículas de óleo são gelificadas pelo resfriamento da formulação abaixo da temperatura de gelificação. A T_{gel} depende do tipo de agente gelificante e da concentração utilizada para produzir o organogel (KIRILOV, 2007).

Figura 8. Representação esquemática de uma nanopartícula de organogel (NPOG). A imagem à esquerda da figura representa a gotícula oleosa fluida (acima da temperatura de gelificação, $> T_{gel}$) e a imagem à direita a nanopartícula gelificada (abaixo da temperatura de gelificação, $< T_{gel}$) (Adaptada de KIRILOV, 2007 e KIRILOV et al., 2009).

Recentemente, Kirilov et al. (2008) obtiveram nanopartículas por meio de uma dispersão aquosa à base de NPOG constituído de óleo de éter dicaprílico e do agente gelificante HSA, bem como brometo de cetiltrimetilamônio como agente estabilizante presente na fase aquosa. As nanopartículas de óleo gelificado apresentaram um diâmetro médio de 260 nm e índice de polidispersividade em torno de 0,2; o que demonstra a capacidade do novo método em preparar formulações na escala nanométrica e com distribuição de tamanho uniforme. Além disso, o potencial

de superfície (zeta) desse nanocarreador foi de + 30 mV, um forte indicativo de uma boa estabilidade da formulação de acordo com a literatura, a qual estabelece que altos valores de potencial zeta ($> |30|$ mV), negativo ou positivo, são capazes de evitar a agregação devido à repulsão eletrostática entre as partículas.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ Neste trabalho, ambos os métodos utilizados na preparação dos nanocarreadores produziram formulações com as características desejadas para uma futura aplicação na terapia fotodinâmica, ou seja, carreadores em escala nanométrica, bem como formulações com distribuição de tamanho homogêneo e monodispersas. No desenvolvimento da formulação de nanocápsulas por meio do planejamento fatorial 2^3 foi possível determinar a forte influência da concentração do tensoativo lipofílico (1,75%) e do óleo de soja sobre os parâmetros diâmetro médio, IPd e potencial zeta das CIAIPc-NC. Além disso, as concentrações dos agentes estabilizante e gelificante afetaram diretamente também o tamanho, IPd e carga superficial das CIAIPc-NPOG. As concentrações de 0,30% de PEI e 6% de HSA demonstraram uma boa interação proporcionando a preparação de nanogotículas coloidais de distribuição homogênea e carregadas positivamente;
- ✓ O estudo da estabilidade física das formulações coloidais confirmou que nanocápsulas carregadas com CIAIPc e produzidas com 1,75% de fosfatidilcolina de soja, 1,25% de poloxamer 188 e óleo de soja apresentaram mínimas variações da formulação em um período mínimo de 12 meses. As nanopartículas gelificadas contendo CIAIPc com concentração mínima de 0,30% de PEI e 6% de HSA também foram estáveis por um período mínimo de 6 meses;
- ✓ Os métodos analíticos espectrofluorimétrico e espectrofotométrico são capazes de determinar com precisão e exatidão a CIAIPc encapsulada em nanocarreadores, assim como são adequados para aplicação na rotina de análises de qualidade de medicamentos (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010);
- ✓ A eficiência de encapsulação da CIAIPc em nanocápsulas constatou que a solubilidade do composto fotossensibilizante na fase oleosa governa esse parâmetro na formulação de nanopartículas de organogel. Além da solubilidade da CIAIPc no líquido orgânico, a eficiência de encapsulação foi

dependente da interação entre o PEI e HSA e consequente estabilização das gotículas gelificadas e, em ambos os nanocarreadores, o conteúdo total de CIAIPc foi bastante satisfatório;

- ✓ CIAIPc-NC foi efetiva em promover uma significativa morte celular em todas as linhagens melanocíticas estudadas (WM1552C, WM278, WM1617 e B16-F10). A sensibilidade das células de melanoma humano ao fotodano foi dependente do estágio de progressão tumoral, sendo constatado que as células de melanoma primário são mais sensíveis ao efeito fotodinâmico comparadas às células de crescimento intermediário e metastáticas. Por outro lado, as células de melanoma metastático e pigmentada são mais resistentes ao efeito fotocitotóxico da formulação de CIAIPc-NC. Enfim, o potencial da formulação de nanocápsulas contendo CIAIPc como sistema de veiculação de compostos fotossensibilizantes aplicados à TFD foi confirmado pela maior indução de morte celular em B16-F10, sendo esta cerca de seis vezes maior do que a morte alcançada com a CIAIPc livre.

7 – REFERÊNCIAS

ABDALLAH, D. J.; WEISS, R. G. Organogels and low molecular mass organic gelators. **Advanced Materials** v. 12, p. 1237-1247, 2000a.

ABDALLAH, D. J.; WEISS, R. G. The quest for the simplest possible organogelators and some properties of their organogels. **Journal of Brazilian Chemical Society** v. 11, p. 209-218, 2000b.

AL KHOURI, N.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.-PH.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** v. 28, p. 125-132, 1986.

ALLEC, J.; CHATELUS, A.; WAGNER, N. Skin distribution and pharmaceutical aspects of adapalene gel. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 36, p. S119-S125, 1997.

ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy - State of the art review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 5, p. 19-28, 2008.

AMC, Analytical Methods Committee. Is My Calibration Linear? **Analyst** v. 119, p. 2363-2366, 1994.

ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles from nano-emulsion templates – A review. **Journal of Controlled Release** v. 128, p. 185-199, 2008.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.; ITHAKISSIOSET, D.S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 259, p. 115-127, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Variar Tudo ao Mesmo Tempo, *in: Como Fazer Experimentos*. 3. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2007. p. 118-166.

BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.-L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends Biotechnology** v. 26, p. 612-621, 2008.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics** v. 280, p. 241-251, 2004.

BOUDIER, A.; KIRILOV, P.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; BELKHELFA, H.; HADIOUI, L.; ROQUES, C.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. Evaluation of biocompatible stabilised gelled soya bean oil nanoparticles as new hydrophobic reservoirs. **Journal of Microencapsulation** v. 27, p. 682-692, 2010.

BOUWSTRA, J. A. e PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1758, p. 2080-2095, 2006.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncology** v. 5, p. 497-508, 2004.

BUGGIANI, G.; TROIANO, M.; ROSSI, R.; LOTTI, T. Photodynamic therapy: Off-label and alternative use in dermatological practice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 5, p. 134-138, 2008.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 85, p. 530-536, 1996.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 1, p. 279-293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 2, p. 1-23, 2005a.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 2, p. 91-106, 2005b.

CATORZE, M. G. Laser: fundamentos e indicações em dermatologia. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana** v. 37, p. 5-27, 2009.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics** v. 250, p. 273-281, 2003.

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 60, p. 1627-1637, 2008.

CHEN, H.; KHEMTONG, C.; YANG, X.; CHANG, X.; GAO, J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discovery Today** v. 16, p. 354-360, 2011.

CHISTYAKOV, B. E. Theory and practical application aspects of surfactants. **Studies in Interface Science** v. 13, p. 511-618, 2001.

CHO, Y. R.; CHIANG, M. P. Epidemiology, Staging (New System), and Prognosis of Cutaneous Melanoma. **Clinics in Plastic Surgery** v. 37, p. 47-53, 2010.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsules Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems** v. 19, p. 99-134, 2002.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: An overview. **International Journal of Pharmaceutics** v. 355, p. 19-30, 2008.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B.; KACEROVSKA, D.; PIZINGER, K.; KIDSON, S. H. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 91, p. 67-76, 2008.

De ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** v. 349, p. 152-160, 2008.

DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. **Journal of Liposome Research** v. 18, p. 159-173, 2008.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods** v. 89, p. 271-277, 1986.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 66, p. 34-41, 2007.

DESCHEPPER, E.; THAS, O.; OTTOY, J.P. Regional residual plots for assessing the fit of linear regression models. **Computational Statistics & Data Analysis** v. 50, p. 1995-2013, 2006.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.-PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics** v. 55, p. R1-R4, 1989.

FICHEUX, H. Principes et applications thérapeutiques de la photothérapie dynamique. **Annales Pharmaceutiques Françaises** v. 67, p. 32-40, 2009.

GOLDBERG, M. S.; DOUCETTE, J. T.; LIM, H. W.; SPENCER, J.; CARUCCI, J. A.; RIGEL, D. S. Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/Skin Cancer Screening Program experience 2001-2005. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 57, p. 60-66, 2007.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G.; SAYAGO, A. The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance** v. 11, p. 256-258, 2006.

GUINEBRETIERE, S.; BRIANON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering: C** v. 21, p. 137-142, 2002.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights** v. 2, p. 147-157, 2007.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Materials Science** v. 6, p. 319-327, 2002.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 54, p. 3-12, 2002.

ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonization 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2008.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 188, p. 200-206, 2007.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2010.

IWANAGA, K.; SUMIZAWA, T.; MIYAZAKI, M.; KAKEMI, M. Characterization of organogel as a novel oral controlled release formulation for lipophilic compounds. **International Journal of Pharmaceutics** v. 388, p. 123-128, 2010.

JAFARI NEJAD, S. H.; ABOLGHASEMI, H.; MOOSAVIAN, M. A.; GOLZARY, A.; MARAGHEH, M. G. Fractional factorial design for the optimization of hydrothermal synthesis of lanthanum oxide nanoparticles under supercritical water condition. **Journal of Supercritical Fluids** v. 52, p. 292-297, 2010.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics** v. 338, p. 297-305, 2007.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials** v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** v. 58, p. 71-96, 2008.

KANG, L.; LIU, X. Y.; SAWANT, P. D.; HO, P. C.; CHAN, Y. M.; CHAN, S. Y. SMGA gels for skin permeation of haloperidol. **Journal of Controlled Release** v. 106, p. 88-98, 2005.

KATAS, H.; CEVHER, E.; ALPAR, H. O. Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v. 369, p. 144-154, 2009.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics** v. 342, p. 231-239, 2007.

KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. **Medical Laser Application** v. 21, p. 219-224, 2006.

KIRILOV, P. **Energie solaire**: Nouveaux complexes polypyridiniques de ruthenium a longues chaines; **Protection solaire**: Elaboration de gelsomes pour applications cosmetiques. 2007. 266 f. Tese (Doutorado em Química Molecular e Supramolecular) – Université Paul Sabatier, Toulouse-França, 2007.

KIRILOV, P.; FRANCESCHI, S.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I.; BORDAT, P. Nouvelles particules d'organogel, leur procédé de préparation, et leurs utilisations en cosmétique. N° 06 08371, patente depositada em 25 de setembro de 2006 pela *Société Pierre Fabre Dermo-Cosmétique*, PCT/EP2007/060126, WO/2008/037697, 03/04/2008.

KIRILOV, P.; LUKYANOVA, L.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PERIER, V.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** v. 328, p. 1-7, 2008.

KIRILOV, P.; GAUFFRE, F.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. Rheological Characterization of a New Type of Colloidal Dispersion Based on Nanoparticles of Gelled Oil. **Journal of Physical Chemistry B** v. 113, p. 11101-11108, 2009.

KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; BAJGAR, R.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K.; STRNAD, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in Vitro** v. 21, p. 249-253, 2007a.

KOLAROVA, H.; LENOBEL, R.; KOLAR, P.; STRNAD, M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. **Toxicology in Vitro** v. 21, p. 1304-1306, 2007b.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 66, p. 89-106, 2002.

KRESTYN, E.; KOLAROVA, H.; BAJGAR, R.; TOMANKOVA, K. Photodynamic properties of ZnTPPS₄, CIAIPcS₂ and ALA in human melanoma G361 cells. **Toxicology in Vitro** v. 24, p. 286-291, 2010.

KÜBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application** v. 20, p. 37-45, 2005.

LE HIR, A. Voie Percutanée. In: **Pharmacie Galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments**. 8. ed. Paris: Ed. Masson, 2006. P. 375-391.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 65, p. 259-269, 2007.

LI, J.-L.; WANG, R.-Y.; LIU, X.-Y.; PAN, H.-H. Nanoengineering of a Biocompatible Organogel by Thermal Processing. **Journal of Physical Chemistry B** v. 113, p. 5011-5015, 2009.

LIM, D.-S.; KO, S.-H.; LEE, W.-Y. Silkworm-pheophorbide a mediated photodynamic therapy against B16F10 pigmented melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 74, p. 1-6, 2004.

LIM, P. F. C.; LIU, X. Y.; KANG, L.; HO, P. C. L.; CHAN, S. Y. Physicochemical effects of terpenes on organogel for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v. 358, p. 102-107, 2008.

LIMAYEM BLOUZA, I.; CHARCOSSET, C.; SFARB, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics** v. 325, p. 124-131, 2006.

LIPINSKI, C. Poor aqueous solubility – an industry wide problem in drug discovery. **American Pharmaceutical Review** v. 5, p. 82–85, 2002.

LU, G. W.; GAO, P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *In: Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, cap. 3. Amsterdam: Ed. Elsevier, 2010. p. 59-94. ISBN 9780815520252.

MacCORMACK, M. A. Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery** v. 27, p. 52-62, 2008.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova** v. 23, p. 237-243, 2000.

MADAN, V.; LEAR, J. T., SZEIMIES, R.-M. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet** v. 375, p. 673-685, 2010.

MAITY, G. C. Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids. **Journal of Physical Sciences** v. 11, p. 156-171, 2007.

MAMOON, A.-M.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; RUPPEL, M. E.; SMITH, R. J.; TSANG, T.; MILLER, L. M. In vitro efficiency and mechanivtic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 6, p. 105-116, 2009.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.-Y.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience** v. 3, p. 1005-1010, 1998.

MEYSKENS, F. L.; FARMER, P.; FRUEHAUF, J. P. Redox Regulation in Human Melanocytes and Melanoma. **Pigment Cell Research** v. 14, p. 148-154, 2001.

MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, F. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 317, p. 458-468, 2008.

MOOR, A. C. E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 57, p. 1-13, 2000.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** v. 385, p. 113-142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 89, p. 614-626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials** v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MUHRER, J. C. Melanoma: Current Incidence, Diagnosis, and Preventive Strategies. **Journal for Nurse Practitioners** v. 5, p. 35-41, 2009.

MURDAN, S. Organogels in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery** v. 2, p. 489-505, 2005.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 37, p. 273-284, 2004.

NYOKONG, T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. **Coordination Chemistry Reviews** v. 251, p. 1707-1722, 2007.

ODASHIRO, A. N.; PEREIRA, P. R.; MARSHALL, J.-C.; GODEIRO, K.; BURNIER JR., M. N. Skin cancer models. **Drug Discovery Today** v. 2, p. 71-75, 2005.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences** v. 1, p. 1-21, 2002.

ORTONNE, J.-P. Photoprotective properties of skin melanin. **British Journal of Dermatology** v. 146, p. 7-10, 2002.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 307, p. 93-102, 2006.

PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** v. 8, p. 14-29, 2011.

PÉNZES, T.; BLAZSÓ, G.; AIGNER, Z.; FALKAY, G.; EROS, I. Topical absorption of piroxicam from organogels – in vitro and in vivo correlations. **International Journal of Pharmaceutics** v. 298, p. 47-54, 2005.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 33, p. 42-51, 2008.

PÉREZ-LOZANO, P.; GARCIA-MONTOYA, E.; ORRIOLS, A.; MIÑARRO, M.; TICÓ, J. R.; SUÑÉ-NEGRE, J. M. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 34, p. 979-987, 2004.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology** v. 5, p. 447-451, 2001.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine** v. 2, p. 8-21, 2006.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. **Medical Laser Application** v. 18, p. 7-19, 2003.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Medical Science** v. 24, p. 259-268, 2009.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical Studies and In Vitro Skin Permeation/Retention of Foscan[®]/Nanoemulsion (NE) Applicable to Photodynamic Therapy Skin Cancer Treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** v. 8, p. 340-347, 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymer by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research** v. 15, p. 1056-1062, 1998.

RAI, P.; MALLIDI, S.; ZHENG, X.; RAHMANZADEH, R.; MIR, Y.; ELRINGTON, S.; KHURSHID, A.; HASAN, T. Development and applications of photo-triggered theranostic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 62, p. 1094–1124, 2010.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science** v. 36, p. 887–913, 2011.

REDHEAD, H. M.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release** v. 70, p. 353-363, 2001.

REMONTET, L.; ESTÈVE, J.; BOUVIER, A.-M.; GROSCLAUDE, P.; LAUNOY, G.; MENEGOZ, F.; EXBRAYAT, C.; TRETARE, B.; CARLI, P.-M.; GUIZARD, A.-V.; TROUSSARD, X.; BERCELLI, P.; COLONNA, M.; HALNA, J.-M.; HEDELIN, G.; MACÉ-LESEC'H, J.; PENG, J.; BUEMI, A.; VELTEN, M.; JOUGLA, E.; ARVEUX, P.; LE BODIC, L.; MICHEL, E.; SAUVAGE, M.; SCHVARTZ, C.; FAIVRE, J. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. **Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique** v. 51, p. 3-30, 2003.

ROBERTSON, C. A.; HAWKINS EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 96, p. 1–8, 2009.

ROGERS, M. A.; WRIGHT, A. J.; MARANGONI, A. G. Crystalline stability of self-assembled fibrillar networks of 12-hydroxystearic acid in edible oils. **Food Research International** v. 41, p. 1026–1034, 2008.

ROGERS, M. A.; WRIGHT, A. J.; MARANGONI, A. G. Nanostructuring fiber morphology and solvent inclusions in 12-hydroxystearic acid / canola oil organogels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** v. 14, p 33-42, 2009.

ROGERS, M. A.; KIM, J. H. J. Rheological assessment of the sol–gel transition for self-assembling low molecular weight gelators. **Food Research International** v. 44, p. 1447–1451, 2011.

ROSENTHAL, I.; BEN-HUR, E. Phthalocyanines in photobiology. *In*: Leznoff, C. C.; Lever, A. B. P. **Phthalocyanines: Properties and Applications**. New York: VCH Publishers, vol.1, 1989, p. 397-420.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science Technology** v. 15, p. 355-361, 2005.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; OUTTES-WANDERLEY, M. S.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 64, p. 154-160, 2006.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; BENITA, S.; BASZKIN, A. Penetration of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymer surfactant into soya phospholipid monolayers. **Colloids Surfaces** v. 52, p. 195-206, 1991.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** v. 26, p. 726-737, 2003.

SHAPIRO, Y. E. Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. **Progress in Polymer Science**, in press, 2011.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today** v. 4, p. 507-517, 1999.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie** v. 65, p. 9-14, 2010.

SLAPER, H.; VELDEERS, G. J. M.; MATTHIJSEN, J. Ozone depletion and skin cancer incidence: a source risk approach. **Journal of Hazardous Materials** v. 61, p. 77-84, 1998.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene** v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SOUSSAN, E.; CASSEL, S.; BLANZAT, M.; RICO-LATTES, I. Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers. **Angewandte Chemie** v. 48, p. 274-288, 2009.

STEGEMANN, S.; LEVEILLER, F.; FRANCHI, D.; de JONG, H.; LINDÉN, H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 31, p. 249-261, 2007.

SURASSMO, S.; MIN, S.-G.; BEJRAPHIA, P.; CHOI, M.-J. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. **Food Research International** v. 43, p. 8-17, 2010.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 108 –109, p. 303–318, 2004.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry** v. 7, p. 187-196, 2003.

- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 59, p. 491-500, 2005.
- TERECH, P.; WEISS, R. G. Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels. **Chemical Reviews** v. 97, p. 3133-3159, 1997.
- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer** v. 56, p. 279-285, 1987.
- USP – The United States Pharmacopeia. in: Validation of Compendial Procedures, 30th ed., The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 680-683, 2007.
- VANDERVOORT, J.; LUDWING, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. **International Journal of Pharmaceutics** v. 238, p. 77-92, 2002.
- VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the Tumor Microenvironment. **Current Oncology Reports** v. 10, p. 439-446, 2008.
- VINTILOIU, A.; LEROUX, J.-C. Organogels and their use in drug delivery – A review. **Journal of Controlled Release** v. 125, p. 179-192, 2008.
- von HARPE, A.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. **Journal of Controlled Release** v. 69, p. 309-322, 2000.
- XU, Q.-S.; MASSART, D. L.; LIANG, Y.-Z.; FANG, K.-T. Two-step multivariate adaptive regression splines for modeling a quantitative relationship between gas chromatography retention indices and molecular descriptors. **Journal of Chromatography A** v. 998, p. 155-167, 2003.
- WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control** v. 34, p. S98-S110, 2006.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 56, p. 603-618, 2004.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINIT, S. Zeta Potential (ζ) Analysis for the Determination of Protein Content in Rice Flour. **Starch/Stärke** v. 57, p. 25-31, 2005.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology** v. 128, p. 2381-2391, 2008.

ZHOU, H.; YUE, Y.; LIU, G.; LI, Y.; ZHANG, J.; GONG, Q.; YAN, Z.; DUAN, M. Preparation and Characterization of a Lecithin Nanoemulsion as a Topical Delivery System. **Nanoscale Research Letters** v. 5, p. 224-230, 2010.