

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas
sólidas em tumores cutâneos**

Lucas de Andrade Huber

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas
sólidas em tumores cutâneos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientado: Lucas de Andrade Huber

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2013

RESUMO

HUBER, L. A. **Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O tratamento tópico do câncer de pele é uma estratégia promissora para aumentar a biodisponibilidade local de antineoplásicos e diminuir efeitos sistêmicos adversos. No entanto, altas concentrações do fármaco nos tumores, que acometem as camadas mais profundas da pele, são requeridas para que o tratamento seja adequado. Para promover a penetração cutânea dos antineoplásicos e atingir o tumor, sistemas de liberação nanoparticulados associados a métodos físicos, como a iontoforese, vêm sendo estudados. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas carreadores explorados para a administração tópica, principalmente, de produtos cosméticos. Pouco se sabe, no entanto, sobre sua influência na penetração cutânea de fármacos e sobre os mecanismos pelos quais as NLS agem para aumentar esta penetração. A iontoforese é um método físico que aumenta a permeação cutânea de fármacos através da aplicação de uma corrente elétrica de baixa densidade. Sua influência na penetração tumoral de fármacos carreados por NLS ainda não foi explorada. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da iontoforese na penetração tumoral do antineoplásico modelo doxorrubicina (DOX) a partir de NLS catiônicas. Para tanto, NLS contendo DOX foram preparadas e caracterizadas quanto a distribuição de tamanho, potencial zeta e pH. NLS idênticas, mas marcadas com um fluoróforo lipofílico, o BODIPY FSE-8 (BOD), sintetizado especificamente para este fim, também foram obtidas e caracterizadas. Estas nanopartículas fluorescentes contendo DOX e BOD foram utilizadas para estudar, por microscopia confocal de varredura a laser, *in vitro* e *in vivo*, as vias de penetração dos compostos lipofílicos presentes nas NLS e da própria DOX. A penetração da DOX nas diferentes camadas da pele foi avaliada *in vitro* usando-se células de difusão vertical e pele de suíno. *In vivo*, a penetração do fármaco foi avaliada também no tumor e no plasma, após 1 h de aplicação passiva e iontoforética das NLS em tumores de células escamosas induzidos em camundongos imunossuprimidos. Nos estudos de microscopia observou-se que a aplicação das NLS levou a uma distribuição mais homogênea da fluorescência no estrato córneo (EC) do que a aplicação de soluções dos fluoróforos livres. A iontoforese aumentou a fluorescência de todas as amostras testadas, levando inclusive a presença de agregados fluorescentes abaixo dos folículos pilosos e a formação de regiões de transporte localizadas mais permeáveis no EC. Nos estudos quantitativos *in vitro* a iontoforese anódica (a partir do eletrodo positivo) das NLS-DOX levou a concentrações cerca de 39 vezes maiores de DOX na epiderme viável do que todas as outras formulações, indicando um efeito positivo da eletromigração na penetração das NLS catiônicas. Nos estudos *in vivo*, o aumento da quantidade de DOX acumulada na pele após a iontoforese anódica das NLS-DOX foi bem acentuado frente às outras formulações. Já a presença de fármaco no tumor, apesar de apresentar uma tendência maior de acúmulo quando a iontoforese foi aplicada, não foi estatisticamente diferente das demais formulações. No entanto, a tendência das NLS de ficarem acumuladas na pele, diminuindo a presença da DOX na circulação, foi bastante característica. Pode-se concluir, portanto, que a aplicação de NLS associadas a iontoforese apresenta alto potencial de sucesso para o tratamento tópico, localizado, de tumores cutâneos.

Palavras-chave: Iontoforeses; Nanopartículas Lipídicas Sólidas; Doxorrubicina; Câncer de pele.

ABSTRACT

HUBER, L. A. **Influence of iontophoresis on the penetration of solid lipid nanoparticles in skin tumors**. 2013. 106f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Topical treatment of skin cancer is a promising strategy to increase local bioavailability of antineoplastic drugs and to reduce systemic adverse effects. However, elevated concentrations of the drug in tumors presented in deep skin layers are required for the adequate treatment. To increase drug skin penetration, nanoparticles associated with physical methods, such as iontophoresis, have been studied. Solid lipid nanoparticles (SLN) are drug carrier systems developed for topical administration, especially of cosmetic products. However, almost nothing is known about their influence on the skin penetration of drugs or on the mechanisms by which they enhance drug penetration through the skin. Iontophoresis is a physical method which increases the skin permeation of drugs through the application of a low density electrical current. Its influence on tumor penetration of drugs carried by SLN has not been explored yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of iontophoresis on the penetration of the antineoplastic model drug doxorubicin (DOX) carried by cationic SLN. To this end, SLN containing DOX were prepared and characterized according to their medium size, zeta potential and pH. Besides that, identical SLN containing a lipophilic fluorophore BODIPY FSE-8 (BOD), synthesized specifically for this study, has also been obtained and characterized. These fluorescent nanoparticles containing DOX and BOD were used to study the *in vitro* and *in vivo* penetration routes of both DOX and lipophilic compounds present in the SLN, by confocal laser scanning microscopy analysis. The penetration of DOX in the different skin layers was evaluated *in vitro* using vertical diffusion cells and pig skin. *In vivo*, the drug penetration was also measured in the tumor and plasma after 1 hour of iontophoretic and passive application of SLN on squamous cells tumors, previously induced in immunosuppressed mice. The microscopy studies showed that the application of SLN resulted in a more homogeneous distribution of fluorescence in the stratum corneum (SC) compared to the application of solutions containing free fluorophores at the same conditions. Iontophoresis increased fluorescence for all samples tested, leading yet to the presence of fluorescent aggregates below the hair follicles and the formation of localized transport regions at the SC. The *in vitro* quantitative studies showed that anodic iontophoresis (from the positive electrode) of SLN-DOX led to about 39 times higher concentrations of DOX in viable epidermis than all the others formulations, indicating a positive effect of electromigration on the penetration of cationic SLN. In the *in vivo* studies, the amount of DOX accumulated in the skin after anodic iontophoresis of SLN-DOX was also well pronounced. The tendency of SLN accumulation in the skin, reducing the presence of DOX in the blood circulation, was very characteristic. Therefore, it can be concluded that the application of SLN associated with iontophoresis has a great potential for success in the topical treatment of localized skin tumors.

Keywords: Iontophoresis; Solid Lipid Nanoparticles; Doxorubicin; Skin Cancer.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem ganhado importância no cenário de descoberta de novos medicamentos durante os últimos anos. Dentre as razões para isso, uma das principais é o fato de que o estudo da síntese de novos fármacos não pode garantir por si só o progresso necessário no desenvolvimento de novos tratamentos para as doenças. Desta forma o desenvolvimento e uso de novos sistemas de liberação se coloca como uma alternativa por permitir o aperfeiçoamento de fármacos previamente estudados de forma eficiente (Mehnert; Mäder, 2001), permitindo o desenvolvimento de novas terapias.

Através da aplicação de sistemas de liberação de fármaco pode-se, por exemplo, modular parâmetros farmacocinéticos de um fármaco como: solubilidade (baixas solubilidades tendem a levar a baixa absorção), metabolização ou eliminação e toxicidade. (Mehnert; Mäder, 2001). Com a melhora das características de um determinado fármaco, tratamentos previamente rejeitados, ou de baixa eficácia, podem ser reaproveitados na farmacoterapia moderna de forma relativamente barata e rápida.

Entretanto o uso de novos sistemas de liberação de fármacos na terapia encontra alguns problemas. Entre eles, o elevado custo de produção, dificuldades de escalonamento industrial, eventuais resíduos de solventes provenientes da produção, toxicidade e instabilidade do fármaco em relação ao sistema de liberação desenvolvido (Mehnert; Mäder, 2001). Neste contexto, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), um sistema composto por uma mistura de lipídios, sólidos a temperatura ambiente, com tensoativos hidrofílicos e/ou lipofílicos e água, foram desenvolvidas com o objetivo de se tornar uma alternativa aos demais sistemas coloidais de carreamento de fármacos como lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e outros (Müller; Mäder; Gohla, 2000; Mühlen; Schwarz; Mehnert, 1998).

Entre as vantagens da utilização das NLS, pode-se citar: a possibilidade de controle de liberação do fármaco, o aumento da estabilidade do fármaco, o direcionamento do tratamento para alvos específicos (“drug targeting”), a possibilidade de esterilização e fácil escalonamento industrial e, principalmente, o uso de materiais biodegradáveis em sua produção. Entretanto, desvantagens como limitada capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e instabilidade do sistema durante o armazenamento (relacionada aos processos de agregação das nanopartículas e geleificação da formulação), já foram relatadas na literatura (Mehnert; Mäder, 2001, Shafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007).

São muitas áreas da farmacoterapia que podem se beneficiar das qualidades dos sistemas de liberação coloidais como as NLS. Uma que merece especial atenção pelo grande problema de saúde que representa é a quimioterapia para o tratamento de câncer.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer para 2012 (e também 2013), com prevalência do câncer de pele tipo não melanoma (134 mil casos), próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil) e pulmão (27 mil). É interessante ressaltar aqui a prevalência dos casos de câncer de pele tipo não melanoma entre os brasileiros, que sozinho, representa mais do que a soma dos segundo e terceiro colocados em números de casos no nosso país.

O termo “câncer de pele do tipo não melanoma” é usado principalmente para definir os carcinomas de células basais e de células escamosas (Madan; Lear; Szeimies, 2010). O carcinoma de células basais é mais comum na cabeça e pescoço (quase 80% dos casos) e normalmente se apresenta na forma de uma úlcera com bordas duras e centro ulcerado. Entretanto outras formas também são conhecidas como a nodular ou cística (mais comum na cabeça e pescoço), a superficial (mais comum no tronco) e a de células basais pigmentadas. O carcinoma de células escamosas, originado dos queratinócitos, está associado em alguns casos a pré-malignidades (doença de Bowen) ou lesões precursoras como a queratose actínica. Estas condições podem ser usadas como marcadoras para a identificação e tratamento antecipado do carcinoma de células escamosas *in situ*, a fim de se evitar o surgimento de metástases e destruição tecidual, já que este tipo de tumor é normalmente considerado mais invasivo do que o carcinoma de células basais (Madan; Lear; Szeimies, 2010; Ogden; Telfer, 2009).

O tratamento do câncer de pele do tipo não melanoma normalmente é cirúrgico, o que pode levar a cicatrizes, perda de função tecidual e desfiguramento, e desta forma à rejeição do paciente pelo tratamento, principalmente no caso de tumores localizados em regiões esteticamente importantes como o rosto. Além disso, o procedimento cirúrgico pode não ser viável em casos de tumores multifocais, muito extensos ou em locais não passíveis de remoção (Madan; Lear; Szeimies, 2010). Tratamentos não cirúrgicos vêm sendo propostos nas últimas décadas como alternativas para o tratamento do câncer de pele tipo não melanoma. Como exemplos, podemos citar a crioterapia, a terapia fotodinâmica (PDT), a radioterapia, e a quimioterapia.

A crioterapia é um procedimento não cirúrgico baseado na destruição tecidual por aplicação de nitrogênio líquido sobre a lesão. É um procedimento simples, mas que pode necessitar várias reaplicações e sessões de tratamento. Normalmente é indicado para o

tratamento de pré-condições tumorais (queratose actínica, doença de Bowen) e carcinomas menos avançados ou de menos risco como o carcinoma de células basais superficiais, de pequenos nódulos do carcinoma de células basais, ou pequenos carcinomas bem diferenciados de células escamosas (Ermertcan; Hellings; Cingi, 2012).

A PDT baseia-se na destruição tecidual do tumor através de radicais livres liberados de moléculas fotoativas, sendo este composto administrado sistemicamente ou topicamente. Resumidamente, o composto administrado é ativado através da aplicação de luz, de comprimento de onda específico, na região tumoral (Ermertcan; Hellings; Cingi, 2012; Dolmans; Fukumura; Jain, 2003). Experimentos recentes têm demonstrado que a PDT apresenta boa eficácia em células de carcinoma basal, apresentando respostas tumorais superiores a 80%, tanto para administração sistêmica quanto tópica do composto sensibilizante (Soler *et al.*, 2001; Fritsch; Goerz; Ruzicka, 1998, Kalka; Merk; Mukhtar; 2000). Entretanto, alguns inconvenientes foram encontrados na administração sistêmica, como fotossensibilização generalizada, inchaço e dor. Além disso, outros estudos concluíram que apesar da PDT apresentar eficácia satisfatória no tratamento de carcinoma de células escamosas *in situ*, o procedimento não é eficaz no tratamento do carcinoma de células escamosas invasivo, o tipo mais agressivo deste câncer, normalmente apresentado na região da cabeça e pescoço. Sendo que nos casos de cânceres avançados de cabeça e pescoço a PDT é indicada apenas como tratamento adjuvante (Tope; Bhardwaj, 2008; Dilkes *et al.*, 1996).

A radioterapia é baseada na aplicação da radiação ionizante na região tumoral. Em geral, pode ser usada para o tratamento de carcinoma de células escamosas ou basais no qual a cirurgia pode levar a resultado estético ruim ou à perda de função tecidual, ou como tratamento adjuvante pós-cirúrgico, quando as margens de segurança da excisão são ambíguas. Apresenta como principal problema a exposição do paciente ao risco de aparecimento de um segundo tumor na região irradiada, além de internação hospitalar e surgimento de cicatrizes em alguns casos. O NHMRC (“National Health and Medical Research Council’s”) indica a radioterapia somente como segunda linha de tratamento e apenas nos casos de contra-indicação cirúrgica ou recusa do paciente, tratamento adjuvante à cirurgia nos casos de recorrência tumoral ou tumores avançados, residuais tumorais não removíveis por cirurgia e manejo de metástases.

Pode-se constatar, portanto, que apesar do avanço na descoberta de alternativas não cirúrgicas para o tratamento do câncer de pele tipo não melanoma, os procedimentos ainda estão aquém do esperado, seja por apresentar efeitos adversos indesejáveis, ou pela ineficácia no tratamento de tumores avançados, como os tumores sólidos de cabeça e pescoço.

Entre os tratamentos quimioterápicos de tumores sólidos em geral, um dos mais utilizados é a administração endovenosa de doxorubicina (DOX). A DOX é uma molécula do grupo das antraciclina (Figura 1) e caracteriza-se pela presença de um anel quinona e um anel aromático rígido e planar ligado por uma ligação glicosídica a um anel de um amino açúcar (Arcamone *et al.*, 1997). Seu mecanismo de ação (assim como das antraciclina em geral) baseia-se na inibição da enzima topoisomerase II α , impedindo a ligação das cadeias do DNA e assim à morte celular (Tewey *et al.*, 1984).

O uso terapêutico da DOX, entretanto, apesar de incluir diferentes tipos de tumores como linfomas de Hodgkins e não Hodgkins, mielomas múltiplos, sarcoma de ovário, pulmão, estômago e seio, além de cânceres no ovário e cervical (Israel *et al.*, 2000), agrega diversos problemas. Como exemplo, pode-se citar a via de administração, que requer a presença do paciente no hospital para a aplicação. Além disso, mesmo com a administração endovenosa, a DOX sofre metabolização de aproximadamente 22% da dose inicial administrada *in vivo* e leva a formação de diferentes metabólitos hidroxilados potencialmente menos eficazes (Arnold *et al.*, 2004, Bandak *et al.*, 1999), além de ser instável frente à luz (Carmichael; Riesz, 1985) o que dificulta seu armazenamento e aplicação em ambiente hospitalar. Ainda, outro grave problema da utilização da DOX na quimioterapia é a elevada cardiotoxicidade relacionada ao grupo quinona das antraciclina utilizadas na terapia (Arcamone *et al.*, 1997).

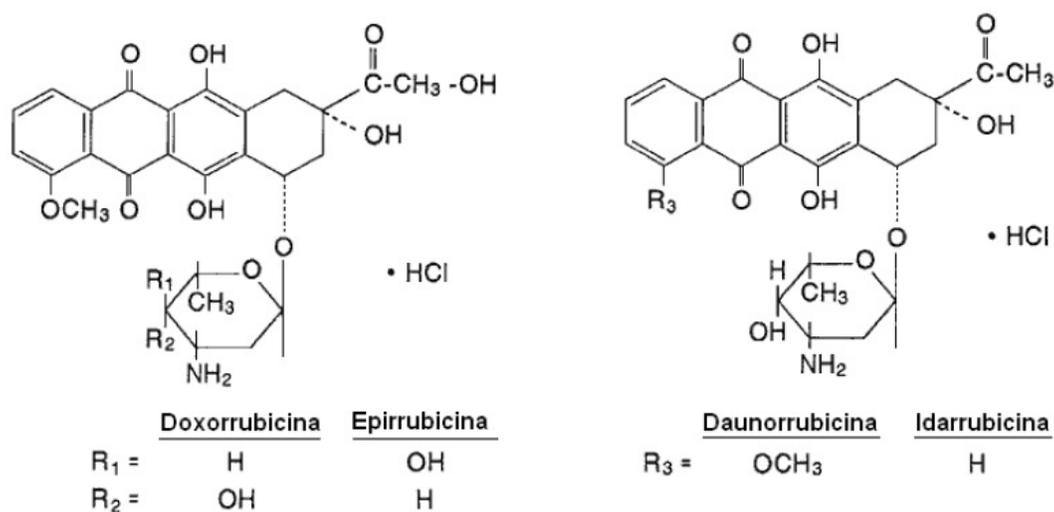


Figura 1. Estrutura molecular das antraciclina: doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina e idarrubicina (retirado de Taveira, 2009)

A administração tópica da DOX pode, portanto, ser uma alternativa para tratar tumores cutâneos com menos efeitos colaterais sistêmicos. Já foi observado, por exemplo, que promotores de absorção cutânea, como a monoleína, são capazes de aumentar a penetração da DOX no estrato córneo (EC) (principal barreira para a penetração de substâncias na pele) através da desorganização reversível do mesmo (Herai *et al.*, 2007). Entretanto, apesar do aumento da permeação da molécula, a mesma não difundia para as camadas mais profundas da pele devido à forte interação da DOX com o EC (Herai *et al.*, 2007). A influência da iontoforese, um método físico que utiliza uma corrente elétrica de baixa densidade, em soluções contendo DOX também já foi avaliada por Taveira e colaboradores (Taveira *et al.*, 2009). Contudo, apesar da iontoforese ter aumentado significativamente a penetração da DOX quando comparada com o uso do promotor de absorção, uma alta porcentagem de fármaco continuou retida no EC. Como se sabe que a aplicação da iontoforese extrapola a barreira conferida à pele pelo EC, esta retenção inesperada indica interações muito fortes da DOX com esta camada da pele, dificultando sua difusão para camadas mais profundas e até promovendo a degradação do fármaco.

Desta forma, visando diminuir a interação da DOX com o EC, além de protegê-la da degradação, o presente trabalho propôs a encapsulação da DOX em NLS contendo monoleína em sua composição. A monoleína (Figura 2) é um lipídio sólido conhecido pela sua propriedade tensoativa e promotora de absorção além da capacidade de se auto-organizar em diferentes arranjos conformacionais sob diferentes condições (Briggs; Caffrey, 1994; Shah; Sadhale; Chilukuri, 2001; Kulkarni *et al.*, 2011). Essa capacidade reorganizacional poderia favorecer a ação promotora de absorção das NLS, ao se levar em consideração a teoria do mecanismo promotor de absorção das NLS mais aceita atualmente. Segundo esta teoria, a NLS, devido ao seu caráter lipofílico e menor tamanho em relação aos sistemas microparticulados, tem a capacidade de formar um filme coeso e apolar sobre a pele (oclusividade), diminuindo a evaporação da água, levando a hidratação do EC. Essa hidratação pode desorganizar parcialmente o EC, gerando a perda parcial de sua capacidade de barreira, facilitando a difusão de fármacos (Schafer-Korting; Mehnert; Korting, 2007; Pardeike; Hommos; Müller, 2009). Neste caso, NLS baseadas em monoleína poderiam apresentar uma maior capacidade de coesão e auto-organização sobre a pele, levando a formação de um filme mais eficiente na retenção de água, e assim a uma maior hidratação do EC.

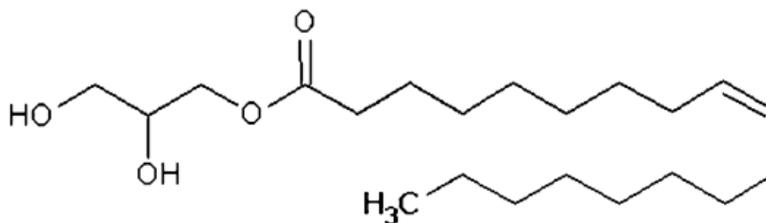


Figura 2. Estrutura Molecular: monoleína

Ainda, considerando-se que para o tratamento eficaz de tumores cutâneos a formulação deve liberar a DOX nas camadas mais profundas da pele, objetivou-se verificar a influência da iontoforese na capacidade de permeação da formulação. A iontoforese é uma técnica física promotora de absorção de fármacos baseada no princípio geral da eletricidade, no qual cargas opostas se atraem e cargas iguais se repelem.

Para a aplicação da iontoforese utiliza-se um dispositivo composto por dois compartimentos, um com a formulação aquosa contendo o fármaco e o outro com meio condutor. Em cada compartimento insere-se um eletrodo, um de carga positiva e outro de carga negativa, e aplica-se então uma corrente elétrica de baixa intensidade (menor ou igual a 0,5 mA/cm² de área tratada) a qual é responsável pelo aumento da permeação do fármaco na pele. Os eletrodos normalmente utilizados são os de prata e cloreto de prata para o compartimento positivo e negativo respectivamente. A corrente aplicada, apesar de apresentar baixa voltagem, inferior a da eletrólise da água (evitando mudanças de pH na formulação), é capaz de promover a permeação do fármaco através da pele por 2 mecanismos: a eletromigração e a eletrosmose (Panchagnula *et al.*, 2000; Marro *et al.*, 2001; Kalia *et al.*, 2004; Gratieri; Gelfuso; Lopez, 2008).

A eletromigração baseia-se na repulsão existente entre a formulação (ou o fármaco) e o eletrodo de mesma carga no qual é aplicada a corrente elétrica. Esta repulsão gera um movimento ordenado de cargas em direção oposta ao eletrodo, ou seja, em direção à barreira de permeação do fármaco, fazendo com que ocorra um aumento da permeação do mesmo. A eletrosmose deve-se a condição natural na qual ocorre o fluxo de certo volume do solvente devido à movimentação de cargas quando uma diferença de potencial é aplicada sobre a pele. Em condições fisiológicas a pele se encontra carregada negativamente e o fluxo de cátions é favorecido em relação ao fluxo de ânions, prevalecendo o fluxo de solvente do eletrodo positivo para o eletrodo negativo. Mas em condições de pH abaixo do ponto isoelétrico da pele (pI entre 4 e 4,5) (Merino *et al.* 1997), a pele pode apresentar característica mais positiva, favorecendo o transporte de ânions e prevalecendo o fluxo de solvente do eletrodo negativo para o positivo (Gratieri; Gelfuso; Lopez, 2008).

Devido à fluorescência emitida pela DOX em comprimento de onda em torno de 500 nm, a influência da iontoforese e das NLS na distribuição e via de penetração da DOX na pele pode ser avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Esta técnica, cujo princípio consiste na excitação de compostos fluorescentes (fluoróforos) com lasers de diferentes comprimentos de ondas, com subsequente captura da emissão da fluorescência em regiões espectrais específicas para cada substância (Alvarez-Román *et al.*, 2004), é capaz de permitir a visualização da DOX nas diferentes camadas de pele ao se avaliar à emissão de fluorescência característica deste fármaco, em contraste com o meio em que se encontra.

A MCVL é uma técnica que tem ganhado importância nos últimos anos para a obtenção de imagens de alta resolução de amostras de pele (e outras origens), tendo demonstrado potencial para se avaliar inclusive possíveis mecanismos de permeação de diferentes sistemas de liberação na pele. Por exemplo, Verma *et al.* (2003) avaliaram a influência do tamanho de diferentes lipossomas (120-810 nm) carregados com carboxifluoresceína (fluoróforo hidrofílico) ou 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tertrametilindocarbocianina perclorato (DiI, fluoróforo lipofílico) na permeação cutânea desses fármacos. Através da relação entre estudos de permeação e de visualização da fluorescência por MCVL, Verma e colaboradores demonstraram que existe uma relação inversa entre a capacidade de permeação e marcação de fluorescência na pele e o tamanho dos lipossomas marcados. Em outro estudo, Lopez *et al.* (2011) comparou a permeação de “quantum dots” (QD), que são partículas metálicas altamente fluorescentes, com diferentes cargas superficiais e tamanho entre 10 e 20 nm, em peles tratadas com ultrassom e lauril sulfato de sódio (US-LSS) através de estudos de permeação e MCVL. Foi observado que a aplicação de US-LSS aumentou de 500% a 1300% a permeação dos QD em relação a pele não tratada, sendo o QD catiônico (potencial zeta: $27,6 \pm 0,8$ mV em pH 5) o de maior permeação. A MCVL permitiu a observação dos QD em camadas profundas das peles tratadas com o US-LSS.

No entanto, para se avaliar a influência da iontoforese ou de qualquer outra estratégia na penetração de NLS, que diferente dos QD não são fluorescentes, é preciso marcar a nanopartícula com um fluoróforo. A fluorescência emitida pelo fluoróforo marcado da NLS deve também ser diferente da fluorescência emitida pelo fármaco que ela carrega para ser possível diferenciar a via de penetração de ambos. Existem diversos estudos envolvendo marcação de NLS na literatura. Uma técnica comumente utilizada para este fim é a ligação química de um componente da NLS a um composto fluorescente. Sandri *et al.* (2010) desenvolveu NLS associada a quitosana para carrear ciclosporina A para dentro das células da córnea. Em seu estudo, além da caracterização físico-química das NLS desenvolvidas,

também foi estudada a captação celular das NLS por MCVL. Para isto, a quitosona foi ligada quimicamente ao FITC (“Fluorescein Isothiocyanate”, Figura 3), um fluoróforo comumente utilizado para a marcação de proteínas, e posteriormente utilizada para a produção das NLS. Apesar do sucesso na visualização de fluorescência em seus estudos na córnea, e na interpretação desta marcação como a própria NLS, já que a fluorescência está “ligada” aos componentes da partícula, é necessário observar que este tipo de técnica apresenta uma limitação para a interpretação de seus resultados. Ao ligar covalentemente um marcador, como a fluoresceína (FITC), por exemplo, em um dos lipídeos que compõe a partícula modifica-se também a própria estrutura química do componente, alterando suas interações intra e intermoleculares, estabilidade, e o próprio tamanho da molécula. Estas modificações podem afetar diretamente a NLS desenvolvida, alterando inclusive mecanismos de permeação ou tempo de liberação do fármaco, quando comparada a NLS produzida sem a utilização de um componente marcado. Portanto, resultados de análises envolvendo sistemas de liberação marcados desta maneira não devem ter seu comportamento comparado ao de outros experimentos envolvendo o mesmo sistema não marcado, como se estes fossem exatamente os mesmos.

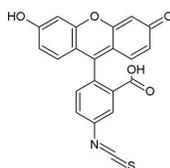


Figura 3. Estrutura molecular do FITC, Peso Molecular de 389

Outra técnica comumente utilizada para a marcação de NLS é a adição de um marcador de fluorescência (normalmente lipofílico) diretamente na formulação, para que esta substância faça parte da composição da mesma. Esta técnica, por utilizar uma baixa quantidade de marcador (quando comparada a técnica de marcação por ligação química, na qual se marca todo o componente lipídico da NLS), tende a influenciar muito pouco na matriz do sistema nanoestruturado, além dessa modificação ser facilmente visualizada por análise de parâmetros físico-químicos como tamanho e potencial zeta da partícula, aumentando a confiabilidade na comparação de resultados entre sistemas marcados e não marcados. Entretanto, existe a desvantagem de não se saber exatamente se o marcador se encontra dentro ou ao menos em contato com o sistema de liberação, quando em condições de experimentação. Dentre os marcadores utilizados para este tipo de teste, o “nile red” é um dos

mais utilizados. Vighi *et al.* (2010) realizaram um estudo semelhante ao de Sandri *et al.* (Sandri *et al.*, 2010) no qual demonstraram a internalização de NLS fluorescentes contendo protamina em células COS-I. Para a marcação das NLS, entretanto, foi adicionado uma solução metanólica contendo 200 μL de “nile red” diretamente na fase lipídica. Os autores, posteriormente, avaliaram células incubadas com NLS fluorescentes por 12 horas por MCVL e inferiram seus resultados em função da fluorescência do “nile red”, como parte da própria NLS.

Em outro estudo, desenvolvido por Kùchler *et al.* (2009), foi comparada uma formulação controle de uma emulsão de “nile red” com outros dois sistemas nanoestruturados, sendo um de NLS e outro de multinúcleos dendríticos (“dendritic core-multishell” (CMS)), ambos com “nile red” incorporado em sua formulação, quanto a interação destes sistemas com a pele, assim como a sua capacidade de internalização em queratinócitos humanos. Para os estudos com a pele, peles tratadas com as formulações foram cortadas em cortes verticais de 20 μm e levadas para análise em um microscópio de fluorescência invertido. A intensidade de fluorescência emitida pelo EC, epiderme viável e derme, quando as amostras foram excitadas com laser de 546 nm (leitura de emissão em 585 nm) foi avaliada. Para os estudos de internalização, os autores utilizaram um MCVL para analisar queratinócitos tratados com os sistemas nanoestruturados marcados. Novamente, o “nile red” foi utilizado como marcador de fluorescência para a própria NLS e todos os resultados e interpretações partiram do pressuposto de que o marcador estaria dentro da NLS e estável.

Abdel-Mottaleb *et al.* (2011) compararam a permeação de ibuprofeno através da pele quando carregado por diferentes sistemas de liberação lipídicos e poliméricos. Foram estudadas um total de 16 formulações, e destas, selecionadas 4 formulações com características mais próximas entre si para os estudos no MCVL. Destas 4 formulações foram selecionadas uma de NLS (núcleo: Witepsol H15), uma de nanocápsula lipídica (núcleo: Mygliol 812), uma de carreador lipídico nanoestruturado (núcleo: Mygliol 812+ Witepsol H15) e uma de nanopartícula polimérica a base de PLGA. O ibuprofeno foi encapsulado nas nanopartículas e o corante “nile red” adicionado às formulações para ser visualizado na pele por MCVL. Os resultados indicaram que todas as nanopartículas lipídicas aumentaram a permeação e o fluxo do fármaco através da pele em quantidades semelhantes, mas provavelmente por caminhos distintos (Abdel-Mottaleb, *et al.* 2011).

Muitos outros estudos podem ser citados utilizando o “nile red” como marcador de sistemas nanoestruturados (Jore *et al.*, 2005, Roman *et al.*, 2002, Roman *et al.*, 2004, Roman *et al.*, 2005,), da influência de técnicas físicas promotoras de absorção de fármacos como a

iontoforese ou a sonoforese (Guy *et al.*, 1992, Turner *et al.*, 1997, Roman *et al.*, 2003) e da influência de agentes promotores de absorção (Saunders *et al.*, 1999). Entretanto, apesar de bem estabelecida, a utilização do “nile red” como marcador possui algumas limitações. O “nile red” (Figura 4) é uma benzofenoxazona lipofílica conhecida pela forte fluorescência em amplo espectro de emissão quando dissolvida em solventes orgânicos. No entanto, quando disperso em meio aquoso, o composto perde toda sua cor e fluorescência. Além disso, o “nile red” apresenta uma característica conhecida como solvatocromismo, isso é, sua banda de absorção de energia varia em relação à sua forma, posição espectral e intensidade dependendo da natureza do solvente ou do meio onde ele está disperso, como em preparações lipídicas (microemulsões, lipossomas, NLS, CLN). O mesmo ocorre com seu espectro de emissão, tendo uma relação direta com a apolaridade do meio em que o “nile red” se encontra (Jore *et al.*, 2005). Estas características podem atrapalhar a detecção do mesmo e em alguns casos levar a uma interpretação equivocada de resultados.

Outro problema do Nile Red advém de seu amplo espectro de emissão. Em situações onde são utilizados mais de um agente fluorescente em uma mesma formulação para análise, é necessário que estes compostos apresentem emissões em regiões diferentes, o que é mais facilmente alcançado quando ambos componentes apresentam faixas estreitas e distantes de fluorescência. Este é o problema específico que inviabiliza a utilização do “nile red” como marcador para NLS encapsuladas com DOX, pois a região de emissão do corante inclui regiões de emissão da DOX, o que dificulta ou até impossibilita a diferenciação de ambos por MCVL.

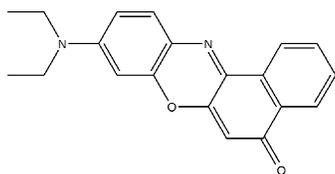


Figura 4. Estrutura Molecular do “nile red”. Peso Molecular de 318,37

Desta forma, um marcador “ideal” para as NLS contendo DOX deve ser suficientemente apolar para se dispersar facilmente na fase lipídica da formulação, ter peso molecular próximo ao do FITC e ao do “nile red”, com região de absorção e emissão de fluorescência distintos da DOX e da pele, além de alta intensidade de fluorescência. Dentro destes conceitos de um corante “ideal” para a marcação da NLS carregada com DOX, o laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal da FCFRP-USP sob a responsabilidade do professor doutor Flávio da Silva Emery desenvolveu uma série de compostos fluorescentes derivados do 4,4-Difluoro-

4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Figura 5). Este composto, mais conhecido pela sua abreviatura BODIPY, se trata de uma pequena molécula apolar (cujo cromóforo se apresenta eletricamente neutro) conhecido como um corante de alta absorção na região do Ultra Violeta (UV) e pela emissão de picos intensos e estreitos de fluorescência com altos rendimentos quânticos em regiões normalmente abaixo de 600 nm (Loudet; Burgess, 2007). Além disso, seus derivados normalmente estão relacionados a características espectrais superiores a corantes tradicionais como a fluoresceína, o “Texas Red” ou a tetrametilrodamina (Ulrich; Ziessel; Harriman, 2008).

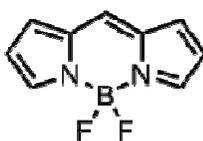


Figura 5. Estrutura molecular do BODIPY (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno)

De uma ampla série de compostos desenvolvidos pelo Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal, um composto nomeado BODIPY FSE-8 (Figura 6) foi escolhido como marcador padrão para as NLS fluorescentes deste projeto. Esta molécula foi selecionada como modelo para os primeiros testes de marcação por diversas razões. A começar pela característica fortemente apolar e planar (Figura 7) de seu núcleo, o que estabelece uma maior afinidade do corante pela NLS, além de poder facilitar a sua acomodação no sistema nanoparticulado sem a consequente desestabilização do mesmo. O corante ainda apresentou peso molecular de 330,2, próximo ao do “nile red”, já muito utilizado como marcador fluorescente incorporado em sistemas de liberação. Além disso, apresentou forte estabilidade a temperatura, luz e solventes orgânicos em testes prévios realizados pelo aluno Lucas Rezende, no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal. Entretanto, entre todas as características, a razão principal para a escolha do BODIPY FSE-8 foi a sua forte emissão de fluorescência em 522 nm, quando excitado em 512 nm, longe dos picos de emissão mais energético da DOX na faixa de 545-555 nm e 596 nm (itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2), e suficientemente intenso para poder ser diferenciado da autofluorescência da pele quando analisado por MCVL.

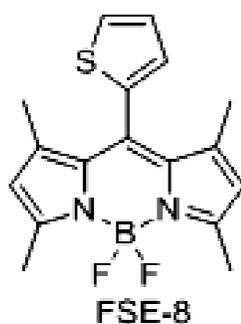


Figura 6: Estrutura Molecular do BODIPY FSE-8

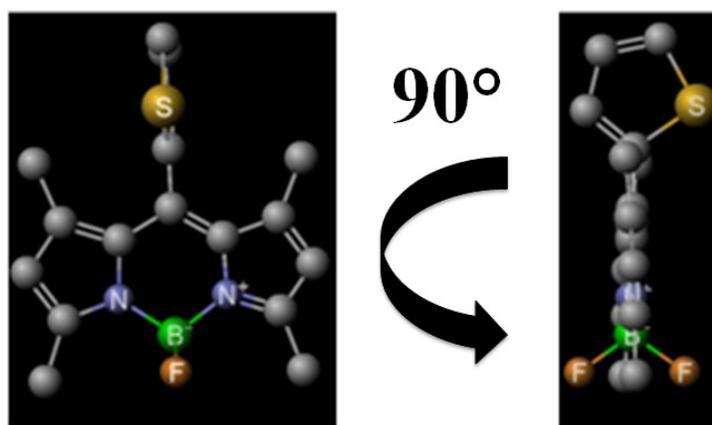


Figura 7. Vista frontal e lateral do BODIPY FSE-8 em 3D.

2. CONCLUSÃO

Neste projeto foram desenvolvidos estudos *in vitro* e *in vivo* para se verificar a influência da iontoforese e da encapsulação da DOX em NLS na permeação do fármaco através da pele.

Os estudos demonstraram que foi possível desenvolver NLS (contendo monoleína em sua composição), adequadas para tratamento tópico cutâneo, a partir do método de microemulsão associado à homogeneização de alta pressão. As NLS apresentaram tamanho médio na faixa de 200 nm, potencial zeta por volta de 60 a 70 mV e PDI próximo à 0,2 e pH ácido. Foi possível, ainda, encapsular DOX nas NLS com uma taxa de eficiência de encapsulação de 50%. Os estudos de integridade da pele frente ao pH ácido, indicaram que a acidez não levou a modificações do EC que inviabilizassem os estudos, dentro das condições testadas (1 hora de permeação passiva ou iontoforética). Além disso, a fim de se considerar o

efeito da acidez na interpretação dos resultados, os estudos de encapsulação em NLS e de iontoforese, foram realizados tendo como padrão de comparação, uma solução aquosa, contendo os principais componentes do sistema nanoparticulado, acidificada até o pH 2,8.

Os estudos de permeação passiva e iontoforética das NLS fluorescentes indicaram que tanto a aplicação da NLS, quanto da iontoforese, levaram a uma melhora no perfil de distribuição e permeação da DOX na pele. Esse efeito pôde ser percebido tanto com a aplicação isolada quanto conjunta de cada técnica, mas foi consideravelmente maior com a associação das mesmas, indicando um efeito sinérgico entre elas.

Tanto os experimentos *in vitro*, quanto *in vivo*, demonstraram que a administração da DOX nas NLS aumentou a homogeneidade de distribuição do fármaco na superfície da pele. Além disso, ocorreram modificações na distribuição da DOX nas camadas mais profundas da pele, que apontaram a presença de aglomerados de fluorescência de DOX e BOD, colocalizados. Essas regiões indicam que a encapsulação favorece o acúmulo da DOX (a partir de NLS) em regiões mais profundas da pele, levando possivelmente a uma liberação sustentada do fármaco por um maior período de tempo.

A aplicação da iontoforese também afetou a distribuição do fármaco, levando a regiões de transporte localizadas na superfície da pele, com grande acúmulo de DOX nessas regiões. Aparentemente, a iontoforese aumentou a permeação da DOX nessas regiões, principalmente por favorecer a entrada do fármaco pelos apêndices cutâneos (folículos pilosos), apesar de algum grau de permeação transcelular ter sido observado na iontoforese das NLS. Foi observado ainda que o principal mecanismo promotor de absorção da iontoforese, quando a mesma é aplicada com as NLS positivas ou com a DOX ionizada na solução ácida, é a eletromigração. Além disso, as regiões de transporte não-localizado observadas após administração da solução de DOX e BOD e da NLS, também apresentaram sinais de fluorescência, mas com um perfil de distribuição e intensidade muito semelhantes aos seus correspondentes na permeação passiva. As análises quantitativas tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, indicaram que apesar da DOX ter apresentado algum nível de permeação no EC e epiderme viável em todas as formulações testadas, a permeação iontoforética das NLS foi capaz de aumentar significativamente a permeação do fármaco até as camadas mais profundas da pele. Este resultado reforça a ideia de que a associação da NLS e da iontoforese apresenta efeito “sinérgico” e benéfico, em relação a aplicação isolado de cada técnica.

Por fim, pode-se concluir que o sistema desenvolvido neste projeto, aliando a encapsulação da DOX em NLS e a aplicação da iontoforese, apresentou resultados

promissores como um futuro tratamento tópico para o câncer de pele. Foi possível aumentar significativamente a distribuição do fármaco nas diferentes camadas da pele, sem que o mesmo atingisse a corrente sanguínea. Isto aumenta a possibilidade de sucesso do tratamento tópico, ao mesmo tempo em que reduz os efeitos adversos sistêmicos graves da quimioterapia com a DOX.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-CEDRÓN, L.; SAYALERO, M.L.; LANA O, J.M. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.22; p.271-278, 1999.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Enhanced dermal delivery from poly(1-caprolactone) nanospheres: an evaluation by confocal laser scanning microscopy, **AAPS**, 2002.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; MERINO, G.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.92, p.1138–1146, 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement to topical delivery from biodegradable nanoparticle, **Pharmaceutical Research**, v.10, p.1818-1825, 2004.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.301-316, 2004.

AQUILANO, D.; CAVALLI, R.; GASCO, M.R. Solid lipospheres obtained from hot microemulsions in the presence of different concentrations of cosurfactant: the crystallization of stearic acid polymorphs. **Thermochemica Acta**, v.230, p.29-37, 1993

ARCAMONE, F.; FRANCESCHI, G.; PENCO, S.; SELVA, A. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. **Tetrahedron Letters**, v.13, p.1007-1010, 1969.

ARNOLD, R. D.; SLACK, J. E.; STRAUBINGER, R. M. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.808, n.2, p.141-152, 2004.

BANDAK, S.; RAMU, A.; BARENHOLZ, Y.; GABIZON, A. Reduced UV-induced degradation of doxorubicin encapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes. **Pharmaceutical Research**, v.16, n.6, p.841-846, 1999.

BERNARDI, S, D. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. Ribeirão Preto, 131p. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2011.

BRIGGS, J.; CAFFREY, M. The Temperature-Composition Phase Diagram and Mesophase Structure Characterization of Monopentadecenoin in Water. **Biophysical Journal**. V. 67, p.1594-1602, 1994

CARMICHAEL, A. J.; RIESZ, P. Photoinduced reactions of anthraquinone antitumor agents with peptides and nucleic acid bases: an electron spin resonance and spin trapping study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.237, n.2, p.433-444, 1985.

CULLANDER, C.; GUY, R.H. Visualization of iontophoretic pathway with confocal microscopy and the vibrating probe electrode. **Solid State Ionics** v. 53-56, p.197-206, 1992.

DILKES MG, DEJODE ML, ROWNTREE-TAYLOR A.; MCGILLIGAN, J. A.; KENYON, G. S.; MCKELVIE, P. m-THPC photodynamic therapy for head and neck cancer. **Lasers in Medical Science**, v.11, p.23-29, 1996.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. Nature Publishing Group, v.3, p.380-387, 2003

ERICSON, M. B.; SIMONSSON, C.; GULDBRAND, S.; LJUNGBLAD, C.; PAOLI, J.; SMEDH, M. Two-photon laser-scanning fluorescence microscopy applied for studies of human skin. **Journal of Biophotonics**, v.1, p.320-330, 2008.

ERMERTCAN, A.T.; HELLINGS, P.W.; CINGI, C. Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck Nonsurgical Treatment. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.20, p.445-454, 2012.

FRITSCH, C.; GOERZ, G.; RUZICKA, T. Photodynamic therapy in dermatology. **Archives of Dermatology** , v.134, p.207-214, 1998.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 69, p.1-9, 2008

GLIKFELD, P.; CULLANDER, C.; HINZ, R. S.; GUY, R. H. A new system for *in vitro* studies of iontophoresis. **Pharmaceutical Research**, v.5, n.7, p.443-446, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Basic principles and applications of iontophoresis for cutaneous application of drugs. **Quimica Nova**, v.31, p.1490-1498, 2008.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINI, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; LOPEZ, R.F.V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 88 – 93, 2007.

ISRAEL, V. P.; GARCIA, A. A.; ROMAN, L.; MUDERSPACH, L.; BURNETT, A.; JEFFERS, S.; MUGGIA, F. M. Phase II study of liposomal doxorubicin in advanced gynecologic cancers. **Gynecologic Oncology**, v.78, n.2, p.143-147, 2000.

JENSEN, L.B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H.M. *In vitro* penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**. v.79, p.68-75, 2011

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. . **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.619-658, 2004.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.42, p.389–413, 2000.

KASTING G, B.; BOWMAN, L, A. DC electrical properties of frozen, excised human skin. **Pharmaceutical Research** v.7, p.134-143, 1990

KULKARNI, C.V.; WACHTER, W.; IGLESIAS-SALTO, G.; ENGELSKIRCHEN, S.; AHUALLI, S. Monoolein: a magic lipid?. **Physical Chemistry Chemical Physics**. V. 13, p.3004–3021, 2011

LO, I.; FLORENCE, A.T.; TREGUIER, J.P.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the diagrams of nonionic surfactant-oil-water systems. **Journal Colloid and Interface Science**. V. 59, p.319-327, 1977

LOPEZ, R. F. V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica de câncer de pele. Ribeirão Preto: Dissertação (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000

LOPEZ, R.F.V.; SETO, J. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, p. 933-941, 2011.

LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. **Chemical Reviews**, v.107, p.4891–4932, 2007

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, n.1-2, p.132-138,2008.

MARRO, D.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v.18, p.1701-1708, 2001.

MASSIRONI, S.M.; GIACÓIA, M.R.; MAIORKA, P.C.; KIPNIS, T.L.; DAGLI, M.L. Skin morphology of the mutant hairless USP mouse. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.38, p.33-39, 2005

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SANTANA, D. C.; TAVEIRA S. F.; VERMEULEN D. M.; DE OLIVEIRA, A.R.; DA SILVA R.S.; LOPEZ, R. F. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 843-851, 2010.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V 47, p.165–196, 2001.

MERINO, V.; KALIA, Y.N.; GUY, R. H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.288-290, 1997 .

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SAS/INCA/COMPREV. **Estimativas 2012. Incidência de Câncer no Brasil**. INCA: Rio de Janeiro,2009

MITRI K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, Characterization, Stability and Performance. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 414, p.267-275, 2011

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 45, p. 149–155, 1998

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, p.161-177, 2000

PANCHAGNULA, R.; PILLAI, O.; NAIR, V. B.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoresis revisited. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.4, p.468-473, 2000.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366 p.170–184, 2009.

SANDRI, G.; BONFERONI¹, M, C.; GÖKÇE, E, H.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; PATRINI, M.; CARAMELLA, C. Chitosan-associated SLN: *in vitro* and *ex vivo* characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. **Journal of Microencapsulation**, v.27(8), p.735–746, 2010.

SAUNDERS, J.; DAVIS, H.; COETZEE, L.; BOTHA, S.; KRUGER, A.; GROBLER, A. A novel skin penetration enhancer: evaluation by membrane diffusion and confocal microscopy, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p.99–107, 1999.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.59, p.427 – 443, 2007.

SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 47, p. 229–250, 2001

SOLER, A.M.; WARLOE, T.; BERNER, A.; GIERCKSKY, K.E. A follow up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. **British Journal of Dermatology**, v.145, p.467–471, 2001.

SOUZA, J. G. Iontoforese *in vitro* e *in vivo* de uma ftalocianina de zinco aniônica em tecidos sadios e tumores induzidos para a terapia fotodinâmica de tumores cutâneos. 2010. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with Doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 508-513, 2009.

TANG, H.; MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-Frequency Sonophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n.5, p. 531–666, 2001

TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p.35-40, 2008

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico de câncer de pele**. Ribeirão Preto, Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v.226, n.4673, p.466-468, 1984.

TOPE, W.D.; BHARDWAJ, S.S. Photodynamic therapy. Bologna JL, Jorizzo JL, Papini RP, editors. **Dermatology**. 2nd edition. St. Louis: Elsevier Ltd; p. 2071–87, 2008.

TREGUIER, J.P.; LO, I.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. Emulsions and water-surfactant-oil diagrams. A system of water-Brij 92 and 96-oil of Vaseline. Effect of surfactant hydrophilicity. **Pharmaceutica Acta Helvetica**. V. 50, p. 421-431, 1975

TURNER, N.G.; GUY, R.H. Iontophoretic transport pathways: dependence on penetrant physicochemical properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, p.1385–1389, 1997.

ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HARRIMAN, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. **Angewandte Chemie International Edition**, Inglaterra, v.47, p.1184-1201, 2008

VERMA, A.; STELLACI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. **Small** v. 6, p.12–21, 2010

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.258, p. 141–151, 2003.

VIGHI, E.; MONTANARI, M.; RUOZI, B.; TOSI, G.; MAGLI, A.; LEO, E. Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing Protamine as transfection promoter. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p.384–393, 2010.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, n.1, p.65-68, 2003.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.9, p.1257-1272, 2004.