

**VANESSA FRANCO CARVALHO DARTORA**

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

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

Versão original

São Paulo  
2016

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

### 1.1 Pele e transporte cutâneo

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

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

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

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

-estrato basal, a sub-camada mais profunda e constituída por células colunares com capacidade de multiplicação, sendo responsável pelo processo de renovação celular. Os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, estão presentes nesta camada (Barry, 1983; Gordon, 2013; Shai et al., 2009).

-camada espinosa: caracterizada pela abundância de desmossomos e pela presença dos "corpos lamelares", vesículas que contém discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas empacotados.

-estrato granuloso: onde as células perdem seus núcleos e secretam lipídios para os espaços intercelulares,

-estrato lúcido: presente na palma das mãos e planta dos pés, conferindo maior espessura à pele nessas regiões

-estrato córneo: mais superficial das subcamadas, composto de células queratinizadas frouxamente ligadas e embebidas em matriz lipídica altamente organizada. Tem a função de barreira, protegendo as camadas subjacentes.

O estrato córneo é formado por 15 a 25 camadas de corneócitos, intercaladas por camadas lipídicas densas, sendo portanto, muitas vezes descrito como uma estrutura do tipo "tijolos e argamassa". A matriz lipídica intracelular compreende principalmente uma mistura de ceramidas, colesterol, triglicérides e ácidos graxos (Anissimov et al., 2013; Wertz, Downing, 1989; Jepps et al., 2013). Embora o estrato

córneo seja uma camada relativamente fina, é reconhecida como a que oferece maior resistência para o transporte de substâncias através da pele. As propriedades de barreira são baseadas no conteúdo específico e composição dos lípidos do estrato córneo e, em particular, no arranjo estrutural excepcional da matriz intercelular e o envelope lipídico que rodeia as células (Egawa et al., 2007; Ya-Xian et al., 1999).

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

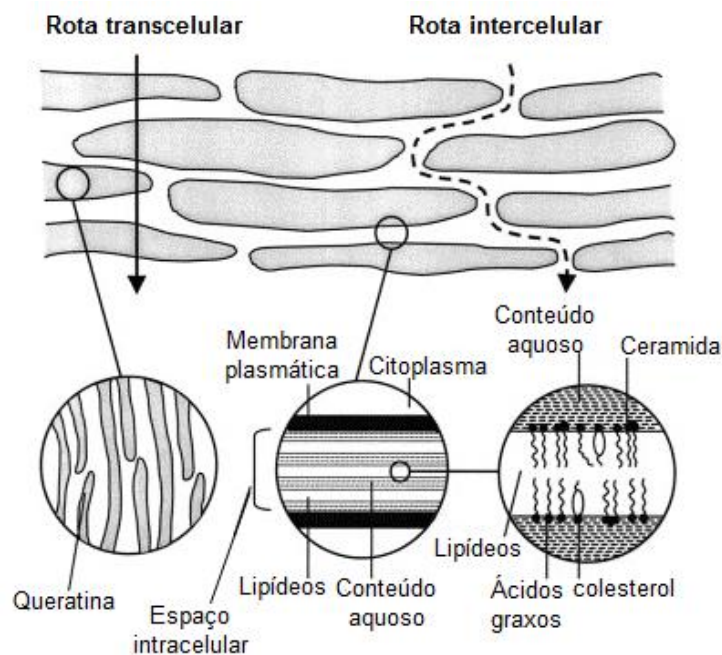


Figura 1- Rotas de permeação através do estrato córneo: (i) através da matriz de lípidos entre os corneócitos (via intercelular) e (ii) atravessando sucessivamente os corneócitos e a matriz lipídica intercelular (via transcelular) (adaptado de Moser et al., 2001).

## 1.2 Tumor Cutâneo

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

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

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

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

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

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

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

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



" significa cor (a pigmentação não é uniforme); 'D' significa diâmetro (superior a 6 mm); e " E " representa a evolução, elevação e / ou aumento de uma lesão (American Cancer Society, 2012; Cummins et al., 2006).

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

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

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

randomizados e estudos de coorte e de caso-controle bem conduzidos (Chitwood et al., 2013; Micali et al., 2014; Roozeboom et al., 2012).

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

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

### **1.3 Associação entre paclitaxel e ceramida C6**

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

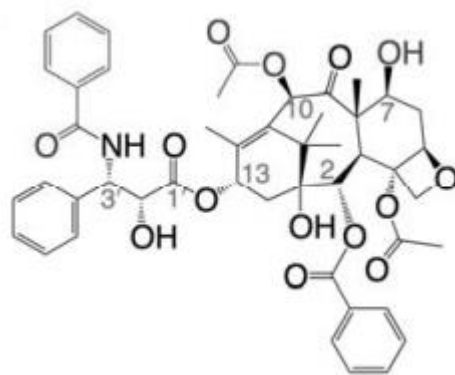


Figura 2- Representação da molécula de paclitaxel.

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

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

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

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

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

#### **1.4 Formulações nanodispersas**

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

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

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

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

Diferentes tipos de microemulsões com estruturas internas variáveis podem ser obtidas dependendo dos tipos e razão entre os componentes utilizados (Kreilgaard, 2002). Existem três tipos de microemulsão (Figura 3). O sistema água-em-óleo (A/O) é formado quando a água é envolvida por moléculas de tensoativos em um meio contínuo de óleo como fase externa. O contrário caracteriza sistemas óleo-em-água (O/A). O diâmetro da fase interna dessas microemulsões geralmente varia de 25 a 150 nm (Lawrence et al., 2000). Entre esses dois tipos de microemulsões, temos uma estrutura não esférica chamada de bicontínua (Constantinides, Yiv, 1995; Kreilgaard,

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

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

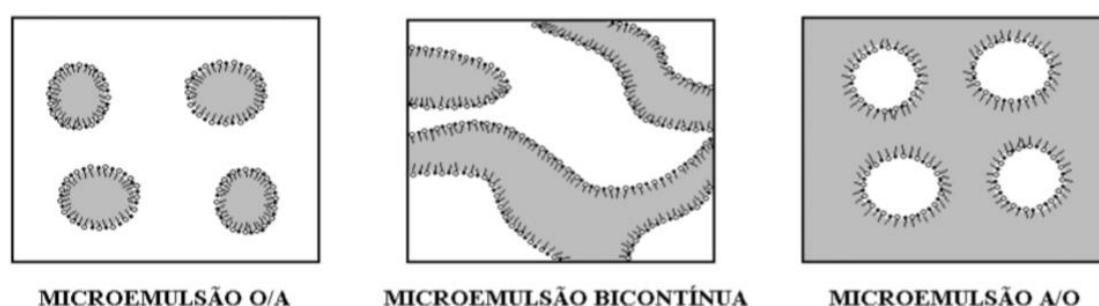


Figura 3- Tipos de Microemulsões. Fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca) e filme interfacial de tensoativos e co-tensoativos. (Fonte: Damasceno, B, et al., 2011).

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



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

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

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

## 7 CONCLUSÕES

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



## REFERÊNCIAS\*

Aboofazeli R, Barlow D, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS PharmSci*. 2000;2(3):E19.

Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, Dinarvand R, Atyabi F. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine*. 2010 Oct;6(5):689-97.

Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;Sep;58(2):301-16.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>. Acessado em junho de 16 de junho de 2015.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Amini S, Viera MH, Valins W, Berman B. Nonsurgical innovations in the treatment of nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Jun;3(6):20-34.

Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Feb;65(2):169-90. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.009. Epub 2012 May 7. Review.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 52 p.

Arad S, Zattra E, Hebert J, Epstein EH Jr, Goukassian DA, Gilchrest BA. Topical thymidine dinucleotide treatment reduces development of ultraviolet-induced basal cell carcinoma in Ptch-1+/- mice. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1248-55.

Araújo LM, Thomazine JA, Lopez RF. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 May;75(1):48-55.

Armstrong BK, Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res*. 1993;3:395-401.

Asmussen B. Transdermal therapeutic systems—actual state and future developments. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1991;13(5): 343.

---

### \*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Boelsma E, Gibbs S, Faller C, Ponec M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm Venereol.* 2000;80:82–8
- Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* 2004Aug 6;280(1-2):241-51.
- Brain KR, Green DM, Lalko J, Api AM. In-vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. *Toxicol In Vitro.* 2007Feb;21(1):133-8.
- Brandão LF, Alcantara GB, Matos Mde F, Bogo D, Freitas Ddos S, Oyama NM, Honda NK. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2013;61(2):176-83.
- Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant JF, Couarraze G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. *J Control Release.* 1999Jun 28;60(1):67-76.
- Brodkey RS. *The Phenomena of Fluid Motions.* New York: Dover Publications Inc.; 1967. 737 p.
- Brohem CA, Sawada TC, Massaro RR, Almeida RL, Rivelli DP, Ropke CD, da Silva VV, de Lima TM, Curi R, Barros SB, Maria-Engler SS. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2009 Feb;23(1):111-9.
- Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, Bassett RL Jr, Curry JL, Gershenwald JE, Kim KB, Hwu P, Lazar AJ, Davies MA. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer.* 2013Nov 1;119(21):3821-9.
- Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 Mar 19;107(2-3):125-55.
- Carvalho CA, Cunha ME da, Giugliani R, Bakos L, Ashton-Prolla P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 2004 Feb;79 (1): 53-60.
- Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, An S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med.* 2016 Jul;38(1):16-22.
- Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 May;47(5):444-50.
- Chitwood K, Etkorn J, Cohen G. Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: efficacy and cost comparisons. *Dermatol Surg.* 2013 Sep;39(9):1306-16.
- Christophers E, Wolff HH, Laurence EB. The formation of epidermal cell columns. *J Invest Dermatol.* 1974 Jun;62(6):555-9.

Cichewicz A, Pacleb C, Connors A, Hass MA, Lopes LB. Cutaneous delivery of  $\alpha$ -tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge. *J Pharm Pharmacol*. 2013 Jun;65(6):817-26. doi: 10.1111/jphp.12045. Epub 2013 Feb 26.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci*. 2011 Apr;100(4):1444-55.

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

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

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

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

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

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

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

Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Feb;65(2):152-68.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lopes LB, Murphy N, Nornoo A. Enhancement of transdermal delivery of progesterone using medium-chain mono and diglycerides as skin penetration enhancers. *Pharm Dev Technol.* 2009;14(5):524-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001 Sep;52(2):103-12.

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

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

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

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

Norling T, Lading P, Engström S, Larsson K, Krog N, Nissen SS. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1992 Oct;19(9 Pt2):687-92.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pianovski AR, Vilela AFG, Da Silva AAS, Lima CG, Silva KK, Carvalho VFM, Musis CR, Machado SRP, Ferrari M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2088 Apr./June;44(2).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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