



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

**DANIEL AUGUSTO GOMES MIRANDA**

**Otimização da co-localização cutânea de agentes citotóxicos utilizando nanocarreadores visando ao desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas de tratamento do câncer de pele**

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

**São Paulo**

**2022**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

**DANIEL AUGUSTO GOMES MIRANDA**

**Otimização da co-localização cutânea de agentes citotóxicos utilizando nanocarreadores visando ao desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas de tratamento do câncer de pele**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

Versão corrigida.

São Paulo

2022

## RESUMO

MIRANDA, D A G. Otimização da co-localização cutânea de agentes citotóxicos utilizando nanocarreadores visando ao desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas de tratamento do câncer de pele. 2022. 122 f. Tese (Doutorado em farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Embora a primeira linha de tratamento para tumores não-melanoma seja a remoção cirúrgica, há pacientes que podem ser beneficiar do tratamento farmacológico tópico. Considerando as imitações das opções disponíveis, foi avaliada, neste trabalho a incorporação de piplartina (PIP) e álcool perílico (AP) em nanocarreadores como uma potencial estratégia para tratamento tópico de câncer de pele. Foram comparados dois nanocarreadores: nanoemulsão (NE) e carreador lipídico nanoestruturado (CLN). Os sistemas apresentaram fase interna inferior a 300 nm ( $128,35 \pm 15,47$  nm para NE e  $263,9 \pm 11,10$  nm para CLN) e potencial zeta até -50 mV. A NE apresentou comportamento reológico Newtoniano e o CLN, pseudoplástico. Ambas apresentaram eficiência de encapsulação >98%. A análise por DSC não demonstrou influência de AP sobre o ponto de fusão ou eventos de cristalização da manteiga de karité no CLN; o ponto de fusão do nanocarreador foi  $\cong 30^{\circ}\text{C}$ . Comparado a soluções controle, as formulações aumentaram a penetração do AP no estrato córneo (3,2 a 1,7 vezes) e camadas viáveis da pele (2,7 vezes), mas apenas o CLN aumentou a penetração da PIP nas camadas viáveis da pele (2,6 vezes em 6 horas). Considerando a possibilidade de uso de hipertermia para melhorar o efeito citotóxico, bem como o ponto de fusão do CLN, avaliou-se o efeito da temperatura na penetração mediada pelo CLN. O aumento da temperatura da fase receptora ( $43^{\circ}\text{C}$ , superfície da pele =  $37,5^{\circ}\text{C}$ ) aumentou a penetração de PIP em 11,1 vezes. As formulações não aumentaram a perda de água transepidérmica e demonstraram ser não irritantes pelo ensaio de HET-CAM. PIP demonstrou maior citotoxicidade nas células A431 e SK-MEL28 do que o AP e a associação dos fármacos reduziu o  $\text{IC}_{50}$ . Em conclusão, o CLN demonstrou maior estabilidade e superioridade na promoção da penetração cutânea da PIP, apesar do maior diâmetro, representando uma melhor opção para veiculação cutânea de PIP e AP.

**Palavras-chave:** Câncer de pele. Melanoma. Piplartina. Álcool perílico. CLN. Nanoemulsão.

## ABSTRACT

MIRANDA, D A G. Optimization of cutaneous colocalization of cytotoxic agents using nanocarriers aiming at the development of new pharmacological strategies for the treatment of skin cancer. 2022. 122 p. Thesis (Ph. D. in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Although the first line of treatment of skin cancer is surgical removal, many patients benefit from topical pharmacological treatment. However, the available options have limited indications and variable efficacy. In this study, nanocarriers were evaluated for the incorporation of piplartine (PIP) and perillyl alcohol (PA) as a potential new strategy for topical treatment for skin cancer. Two nanocarriers were evaluated: nanoemulsion (NE) and nanostructured lipid carrier (NLC). They presented particles below 300 nm ( $128.35 \pm 15.47$  nm for NE and  $263.9 \pm 11.10$  nm for NLC) and zeta potential up to -50 mV. The NE and NLC displayed Newtonian and pseudoplastic behavior, respectively, and high encapsulation efficiency (~98%). DSC analysis did not show crystallization events of shea butter in NLC, with melting point  $\cong 30^\circ\text{C}$ . The formulations promoted increased penetration of PA in the stratum corneum (3.23 to 1.75 fold) and viable layers of the skin (2.7 fold), but only NLC was able to promote increased penetration of PIP in the viable layers of the skin (2.6 fold in 6 hours). Considering the advantages of hyperthermia for cytotoxicity enhancement and the melting of the NLC, the effect of temperature on skin penetration for an on-demand NLC-mediated penetration was assessed. Increasing the temperature of the receptor phase (to  $43^\circ\text{C}$ , skin surface =  $37,5^\circ\text{C}$ ) increased NLC-mediated penetration (11.1 fold), indicating that temperature can modulate penetration. The formulations did not increase transepidermal water loss and were shown to be non-irritating by the HET-CAM assay. PIP showed greater cytotoxicity in A431 and SK-MEL28 cells than PA, the association of drugs reduced the  $\text{IC}_{50}$ . In conclusion, the CLN showed greater stability and was superior in increasing PIP penetration, in addition to allowing penetration improvement with temperature increases.

**Keywords:** Skin cancer. Melanoma. Piplartine. Perillyl alcohol. NLC. Nanoemulsion.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o tipo de neoplasia mais prevalente no mundo. De maneira geral, os tipos de câncer de pele podem ser divididos em melanoma, menos frequentes, e não-melanoma, que são os mais comuns, sendo a sua prevalência maior do que todos os outros tumores malignos [1]. A incidência de tumores do tipo melanoma varia grandemente dependendo da região, no sudeste asiático a taxa é de 0,2/100 mil pessoas, enquanto que nas américas essa taxa é de 7,7/100 mil, chegando a ~35/100 mil em países como Nova Zelândia e Austrália [2]. De maneira similar ao melanoma, a incidência de tumores de pele do tipo não-melanoma varia grandemente conforme a região, a Austrália é o país de maior incidência (~2450/100 mil), seguido pelos Estados Unidos (~450/100 mil), enquanto em países africanos a incidência é menor do que 1/100 mil [3, 4].

Os tumores do tipo não-melanoma podem ser subdivididos em basocelular, que corresponde a cerca de 80% dos casos de câncer de pele do tipo não-melanoma, e espinocelular (células escamosas), que corresponde a 20% dos casos [1]. O melanoma é o tipo mais raro, representando cerca de 1,7% (232.100) dos novos casos de câncer (excluindo o câncer do tipo não-melanoma) que surgem anualmente [2]. Apesar de mais raro, é o mais letal, sendo responsável por cerca de 55.500 mortes anualmente, o que equivale a 0,7% de todas as mortes causadas por câncer no mundo [2]. Um estudo realizado com dados epidemiológicos dos Estados Unidos demonstrou que a taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma invasivo ao longo do tempo varia grandemente conforme a espessura da lesão e o estágio de diagnóstico (localizado ou metastático). Quando a lesão apresenta entre 0,1 e 1 mm de espessura, cerca de 97,4% dos pacientes sobrevivem por 5 anos e 95,2% por até 10 anos. Entretanto, à medida que a espessura da lesão aumenta, a taxa de sobrevivência dos pacientes diminui: de 1,01 mm a 2 mm a taxa de sobrevivência é de 88,4% (5 anos) e 81,2% (10 anos); de 2,01 a 4 mm, a taxa é de 72,7% (5 anos) e 62,1% (10 anos), enquanto lesões com espessura maior que 4 mm apresentam taxas de sobrevivência muito menores, de 56,6% (5 anos) e 46,6% (10 anos) [5]. Os pacientes diagnosticados com lesão localizada tem taxa de sobrevivência de 95,6% em 5 anos e de 92,1% em 10 anos. Quando a lesão passa

a ser regional, essa taxa é de 63,7% (5 anos) e 54,3% (10 anos), enquanto nos casos de lesão metastática, a taxa de sobrevivência tem uma expressiva redução para 15,7% (5 anos) e 12,8% (10 anos) [5].

Há ainda outros tipos de câncer que acometem a pele. O carcinoma de células de Merkel é um tumor neuroendócrino raro que se desenvolve nas células de Merkel que estão presentes na camada basal da epiderme, principalmente próximo aos folículos pilosos [6]. A incidência do carcinoma de Merkel é baixa nos Estados Unidos (~0,6/100 mil), Austrália (~1,6/100 mil) e na Suécia (~0,3/100 mil). Alguns fatores de risco para o desenvolvimento da doença são idade, imunocomprometimento, câncer hematológico e histórico de outros tumores cutâneos [6].

Assim como o carcinoma de células de Merkel, o linfoma cutâneo de células T não é um câncer de células da pele uma vez que ele se origina de células do sistema imunológico, mas apresenta manifestações cutâneas. Normalmente acomete adultos, entretanto, pode ocorrer em crianças e adolescentes e sua incidência anual é baixa, mundialmente (~0,5/100mil, sendo, nos Estados Unidos ~0,64/100 mil e na Europa ~0,29 a 0,39/100 mil) [7-9].

No Brasil, estima-se a cada ano ~685.960 novos casos de câncer de pele, sendo 176.940 do tipo não-melanoma e 8.450 do tipo melanoma [10]. Assim como ocorre mundialmente, o tipo de câncer mais comum no Brasil (~25,8%) é o câncer de pele do tipo não-melanoma, enquanto o tipo melanoma representa ~1,23% considerando todos os casos de câncer e ~1,88% dos casos excluindo os casos de câncer de pele do tipo não-melanoma [10]. A incidência de melanoma varia no Brasil conforme o sexo e região do país. A taxa de incidência de homens com melanoma é de 4,03/100 mil pessoas, enquanto a das mulheres é de 3,94/100 mil [10] e quando analisamos a incidência por região, as maiores taxas estão na região sul e sudeste, e as menores na região norte. Pode-se destacar o estado de Santa Catarina, que tem a maior incidência do país tanto em homens (12,13/100 mil homens) quanto em mulheres (11,54/100 mil mulheres) [11].

A alta prevalência do câncer de pele tem um grande impacto financeiro nos serviços de saúde, e esse custo é cada vez maior. O tratamento de câncer de pele corresponde ao quinto mais custoso dentre todos os tratamentos de câncer nos

Estados Unidos; os dados mais recentes encontrados reportam que entre 2007 e 2011 foram gastos anualmente cerca de 4,8 bilhões de dólares no tratamento de câncer de pele não-melanoma, o que representa um aumento de 74% quando comparado ao custo estimado de 2002 a 2006 [12]. O gasto anual com o tratamento do melanoma é elevado, é estimado em 3,1 bilhões de dólares; entretanto esse valor não inclui os novos tratamentos padrão para melanoma em estágio III e IV como o T-VEC, que é a primeira imunoterapia viral oncolítica a ser aprovada para o tratamento local de melanoma metastático irresssecável, é um sistema de administração intralesional que desencadeia respostas imunológicas locais e sistêmicas levando à lise das células tumorais, é utilizada no tratamento de melanoma avançado e pode custar até 40 mil dólares por dose [13, 14].

As opções de tratamento do câncer de pele existentes atualmente podem ser divididas em alternativas cirúrgicas e não-cirúrgicas, que incluem os tratamentos farmacológicos, sendo que a escolha depende de alguns fatores (**tabela 1**) como o tipo de câncer e o estágio das lesões [15]. A remoção cirúrgica é a forma convencional de tratamento, com taxas de cura muito elevadas [15]. No entanto, tratamentos farmacológicos são recomendados para tumores do tipo não-melanoma em diversas situações, como em lesões superficiais e difusas, de difícil acesso e/ou para pacientes que não são considerados bons candidato à cirurgia, o que inclui pacientes de idade avançada e aqueles que apresentam tendência à formação de queloides [15]. Além desses casos, estudos mais recentes demonstraram o potencial do tratamento farmacológico tópico também para algumas lesões de melanoma, como na doença *in situ* em pacientes inoperáveis (em decorrência, por exemplo da idade) e como uma forma de tratamento adjuvante para o controle de bordas após remoção cirúrgica, nas quais ainda há células tumorais residuais [16-18]. Nesses casos, formulações tópicas, auto-administráveis e capazes de localizar o agente farmacológico nas lesões cutâneas com baixa exposição sistêmica são essenciais, principalmente se considerarmos o número muito restrito de opções atualmente disponíveis comercialmente e os efeitos adversos que a exposição sistêmica a fármacos citotóxicos pode trazer. O tratamento farmacológico tópico é amplamente utilizado em lesões pré-tumorais como a queratose actínica e pode ser uma opção para algumas lesões tumorais de pele. Estudos demonstram que os

tratamentos farmacológicos tópicos para queratose actínica não demonstram toxicidade sistêmica, os efeitos adversos são locais [19, 20].

**Tabela 1.** Estadiamento do melanoma conforme espessura, presença ou ausência de metástase e tratamentos recomendados [21, 22]

<b>Estadiamento</b>	<b>Característica</b>	<b>Tratamento</b>
0	<i>In situ</i> sem metástase	Excisão cirúrgica
IA	< 8 mm sem ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
	< 8 mm com ulceração ou 0,8 a 2 mm sem ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
IB	< 8 mm com ulceração ou 0,8 a 2 mm sem ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
IIA	1,1 a 2 mm com ulceração ou 2,1 a 4 mm sem ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
IIB	2,1 a 4 mm com ulceração ou > 4mm sem ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
IIC	> 4 mm com ulceração e sem metástase	Excisão cirúrgica
III	Qualquer tamanho com linfonodo regional	Excisão cirúrgica, nivolumab ou pembrolizumab ou dabrafenib e trametinib para pacientes com mutação em BRAF V600
IV	Qualquer tamanho com metástase distante	Excisão cirúrgica, nivolumab ou pembrolizumab, para pacientes com mutação em BRAF V600, dabrafenib e trametinib ou vemurafenib e cobimetinib ou ecorafenib e binimetinib

## 1.1 Organização cutânea e câncer de pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso corporal. A sua função primária é de proteção, funcionando como uma barreira entre o meio externo e o meio interno do organismo [23-25]. Estruturalmente é composta por duas camadas principais, a epiderme e a derme [23-25], embora alguns autores considerem ainda que a pele é composta por uma terceira camada, a hipoderme [23, 26].

A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída basicamente por tecido epitelial estratificado queratinizado. É avascular e composta pelas subcamadas basal, espinhosa, granulosa e estrato córneo, sendo formada principalmente por quatro tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel [23, 27]. As subcamadas representam os diferentes estágios de maturação e divisão dos queratinócitos [27]. Uma outra subcamada que pode ser observada principalmente nas regiões palmoplantares é o estrato lúcido, uma camada de transição entre a camada granulosa e o estrato córneo, de aspecto homogêneo e composta por células achatadas e anucleares [23].

A derme é formada por tecido conjuntivo, composto por estruturas fibrosas, filamentosas e amorfas, contendo vasos, nervos, folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas [23, 24, 27]. A matriz dérmica é formada por várias proteínas, entre elas o colágeno que representa cerca de 75% do peso seco da derme e confere resistência e elasticidade ao tecido, além de elastina, fibrilina, fibulinas e laminina [23, 28].

A camada basal é a camada celular mais profunda da epiderme, sendo fundamental na formação e manutenção da junção dermoepidérmica. É composta por uma fileira única de queratinócitos justapostos. Muitas dessas células apresentam capacidade de divisão sendo chamadas de células germinativas, que apresentam morfologia colunar, citoplasma basófilo, núcleo grande e oval [23]. A camada espinhosa ou de Malpighi é formada por numerosas células dispostas em várias fileiras, é composta por queratinócitos que deixaram a camada basal rumo

superfície. Nesse processo eles sofrem modificações morfológicas, moleculares e histoquímicas, passando a ser poligonais, com citoplasma acidófilo e ricos em desmossomo, sendo denominadas células espinhosas ou células de Malpighi [23]. A camada granulosa é composta por células que deixaram a camada espinhosa em direção a superfície; elas formam algumas fileiras e apresentam grânulos basófilos de cerato-hialina no citoplasma [23]. O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme; as células são acidófilas e extremamente planas, constituindo as células mais largas do organismo. As células desta camada são oriundas da camada granulosa após passarem pelo processo de apoptose com destruição de núcleo e organelas [23]. Esta camada tem função protetora e é considerada a principal barreira à penetração de compostos exógenos aplicados deliberadamente ou não à pele.

Além dos queratinócitos, uma das principais células epidérmicas são os melanócitos, células dendríticas localizadas predominantemente na camada basal e produtoras de melanina, um pigmento responsável pela absorção e difusão da radiação ultra violeta (RUV) [23, 27]. Em condições basais, os melanócitos não proliferam nem migram; quando o melanócito recebe um estímulo como RUV, ele se multiplica e transfere a melanina para os queratinócitos através dos seus dendritos constituindo a unidade epidermomelânica [23]. O número de melanócitos varia de acordo com a região anatômica do corpo, mas é aproximadamente o mesmo entre as raças. O que varia por determinação genética é o número, tamanho, morfologia e disposição dos melanossomos, que são elípticos quando produzem eumelanina de pigmentação marrom ou negra, ou esferóides quando produzem feomelanina de pigmentação amarelo-vermelha [23]. Outras células epidérmicas de destaque são as células de Langerhans, principais componentes imunológicos da pele. Ficam localizadas nas camadas basal, espinhosa e granulosa [23, 27]. As células de Merkel se localizam na camada basal e estão relacionadas a sensação tátil [23, 27].

Existem múltiplos fatores que podem desencadear o desenvolvimento do câncer de pele, alguns endógenos, como o fototipo cutâneo, cor da pele e dos olhos, histórico familiar de câncer de pele, e outros exógenos, como tipo e grau de exposição cumulativa ao sol, histórico de queimadura solar e o comportamento de proteção solar [27]. A cor da pele pode ser constitutiva ou facultativa. A cor constitutiva depende dos tipos e distribuição geneticamente determinados da

melanina epidérmica, que não são influenciados por fatores exógenos ou endógenos. Já a cor facultativa da pele é influenciada por fatores ambientais (exógenos) ou hormonais (endógenos), podendo levar a um aumento da melanina epidérmica [29, 30]. A cor constitutiva geralmente é determinada pela quantidade, tipo e distribuição da melanina, que é considerada o principal fator de proteção contra os efeitos deletérios da RUV [30]. Existem algumas classificações de fototipo de pele, uma das mais utilizadas é a proposta por Fitzpatrick, que divide a pele em 6 tipos (I a VI), considerando a reatividade da pele à exposição solar com relação à queimadura solar e bronzeamento (**Tabela 2**) [29-31].

**Tabela 2.** Sistema de classificação de Fitzpatrick [31].

<b>Cor da pele (sem exposição solar)</b>	<b>Tipo de pele</b>	<b>Queimadura</b>	<b>Bronzeamento</b>
	I	Sim	Não
	II	Sim	Mínimo
<b>Branca</b>	III	Sim	Sim
	IV	Não	Sim
<b>Marrom</b>	V	Não	Sim
<b>Preta</b>	VI	Não	Sim

O principal agente etiológico para o desenvolvimento do câncer de pele (aproximadamente 65 a 90% dos casos de melanoma) é a exposição aos raios ultravioleta, que podem ser do tipo A (UVA), B (UVB) e C (UVC) [23, 27, 32, 33]. Cerca de 90 a 99% da RUV que chega a superfície da terra é do tipo UVA, o tipo B (UVB) representa cerca de 1 a 10% da RUV, enquanto que a radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio [32]. Os raios UVA possui maior comprimento de onda (315 – 400 nm) e baixa energia, causam envelhecimento da pele e induzem bronzeamento imediato e persistente, são capazes de penetrar mais profundamente e podem induzir danos mais profundos à pele, os danos ao DNA causados pelo UVA são indiretos, mediados pela formação de espécies reativas a oxigênio que podem causar quebras no DNA e por danos na membrana celular, além de ter um importante papel na carcinogênese das célula tronco da pele. Os

raios UVB possuem menor comprimento de onda (280 – 315 nm) e alta energia, causam dano diretamente no DNA gerando resposta inflamatória e tumorigênese, atuam mais superficialmente e são os principais responsáveis pela vermelhidão e queimaduras da pele [27, 32]. Estudos sugerem que a exposição solar durante a infância é o principal fator ambiental para o desenvolvimento do melanoma, e estima-se que 65% dos casos de melanoma estão relacionados à exposição solar [34, 35]. Pesquisas sugerem que a diminuição da exposição solar com uso de protetor solar principalmente na infância e adolescência podem reduzir em até 78% o risco de desenvolver câncer de pele do tipo não-melanoma [27].

A melanina presente na epiderme pode influenciar na proteção dos efeitos deletérios da RUV; entretanto, esse papel é diferente dependendo do tipo de melanina presente na epiderme. A eumelanina é característica da pele de pigmentação marrom e preta e atua fortemente como filtro solar, além de ajudar a eliminar radicais livres induzidos pela RUV. A feomelanina, presente nos indivíduos de pele clara e cabelos ruivos ou claros, é menos efetiva como filtro de RUV além de atuar como um fotossensibilizador endógeno [30].

A RUV está relacionada com a geração de dímeros de timina e imunossupressão ao depletar células de Langherans da epiderme e estimular o aparecimento de clones de linfócitos supressores, além de gerar mutação em genes, estresse oxidativo e resposta inflamatória; todos esses eventos estão relacionados ao fotoenvelhecimento e a gênese do câncer de pele [23, 27, 32]. Além disso, a RUV pode criar mutações no p53 que é um gene envolvido no reparo de DNA ou na apoptose de células com danos no DNA, podendo ocasionar uma desregulação da apoptose e o aumento de células com mutação, iniciando o câncer de pele [32]. A radiação UVB, apesar de ser emitida em menor quantidade e penetrar em camadas menos profundas da pele do que a UVA, é a principal causa de danos diretos ao DNA, induzindo uma ligação covalente entre pirimidinas adjacentes, enquanto os danos causados pela UVA são indiretos, sendo mediados pela formação de radicais livres e danos a membrana celular [27, 32, 33].

Outra mutação muito comum e que está presente em cerca de 30 a 60% dos casos de melanoma é a mutação em BRAF [36-38], entretanto, essa mutação não parece estar relacionada aos efeitos da RUV, além de não estar associada a

formação de dímeros de timina que é comumente encontrada na mutação do p53 nos cânceres de pele do tipo não-melanoma [36]. A alta frequência da mutação em BRAF pode estar relacionada a fatores biológicos dos melanócitos, a principal via de sinalização que controla a proliferação e diferenciação dos melanócitos ativa BRAF, como a proliferação dos melanócitos está descontrolada, a ativação da via BRAF é intensa e essa via de proliferação é específica para o melanócito e não se encontra ativada na proliferação dos queratinócitos, o que pode explicar a alta frequência de mutação desse gene em melanomas quando comparado a outros tipos de câncer de pele [36]. A mutação mais comum em BRAF, correspondendo a cerca de 95% das mutações, é a substituição da valina na posição 600 pelo ácido glutâmico, que leva a uma super ativação da BRAF e pode ser um dos alvos farmacológicos no tratamento de melanoma [37, 38].

## **1.2 Tratamento do câncer de pele**

A abordagem convencional para tratamento do câncer de pele é a ressecção da lesão primária, seja ela do tipo melanoma ou não-melanoma, e dependendo do tumor e da sua espessura, a margem lateral de segurança pode ser de até 3 a 5 cm [39, 40]. Mas há particularidades no tratamento recomendado, dependendo do tipo de tumor.

O câncer de pele do tipo basocelular, assim como os outros tipos de câncer de pele, tem como tratamento de escolha a ressecção cirúrgica e nos casos onde a cirúrgica não é possível, o tratamento pode ser feito com terapia fotodinâmica e crioterapia [41]. Até o momento o câncer basocelular é o único câncer de pele que tem tratamento farmacológico tópico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), realizado com imiquimode ou 5-fluorouracil (5-FU). Entretanto eles são administrados apenas em pacientes classificados como de baixo risco, que apresentam lesão menor que 1 ou 2 cm dependendo da localização, a lesão deve ser primária, com bordas bem definidas e ser do subtipo nodular ou superficial [41].

A queratose actínica, um lesão pré-tumoral, consiste proliferação atípica de queratinócitos em áreas que sofreram danos por exposição crônica a RUV com risco

de progressão para câncer de célula escamosa [19, 20] e pode ser tratada por meio de técnica cirúrgica, laser com ou sem ablação, criocirurgia e terapia fotodinâmica. Diferentemente dos carcinomas, possui diversos tratamentos farmacológicos tópicos aprovados, como diclofenaco, ingenol, imiquimode e 5-FU [19, 20]. Já o tratamento do câncer de células escamosas pode ser realizado com radioterapia caso seja inoperável ou a ressecção cirúrgica seja incompleta, entretanto se o tumor não for controlado localmente com essas estratégias, o tratamento farmacológico disponível é sistêmico, podendo ser administrado cetuximab, panitumumab, avelumab, cemiplimab associados ou não a quimioterápicos como o paclitaxel [19]. Recentemente a FDA aprovou o uso de pembrolizumab, um anticorpo monoclonal seletivo para proteína de morte celular programada 1 (PD-1). A inibição desse receptor mantém os linfócitos T citotóxicos ativos, permitindo que os linfócitos reconheçam e possam exercer uma resposta antitumoral. O fármaco, que já era utilizado para tratamento de melanoma, foi aprovado para tratamento de câncer de células escamosas [42].

Melanomas com espessuras superiores a 4 mm estão associados a um alto risco de metástases, e ressecções de áreas maiores do que o preconizado não parecem ter resultados melhores [40]. O tratamento do melanoma é ressecção cirúrgica, mas nos casos de lesão em uma região inoperável, de difícil acesso ou de alto risco para recorrência regional como em tumores maiores de 3 ou 4 cm dependendo da localização, pode ser usada radioterapia como tratamento ou como tratamento adjuvante. Outra possibilidade são os tratamentos farmacológicos, porém, os aprovados para o melanoma até o momento são todos sistêmicos. Pode-se administrar imunoterapia com anticorpos monoclonais que ativam ou mantêm ativo o sistema imunológico do paciente para estimular uma resposta antitumoral como ipilimumab, vemirafunib, trametinib, pembrolizumab e nivolumab ou quimioterapia com agentes citotóxicos como dacarbazina, temozolamida e paclitaxel, que normalmente são tratamentos muito tóxicos para o paciente [21]. Estudos recentes demonstraram ainda o potencial do tratamento farmacológico tópico com imiquimode para lesões de melanoma *in situ* em pacientes inoperáveis (em decorrência, por exemplo da idade) e como uma forma de tratamento adjuvante para o controle de bordas após remoção cirúrgica, nas quais ainda há células tumorais residuais [16, 18].

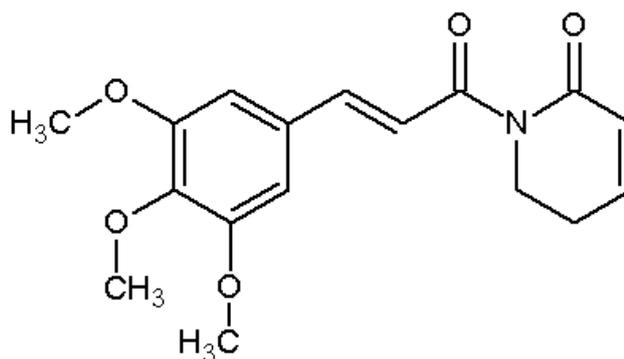
Existe um outro tipo de câncer que acomete a pele, o linfoma cutâneo de células T, caracterizado por inflamação crônica e acúmulo de linfócitos T malignos na pele [43]. O tratamento primário da lesão, independente da extensão da lesão, pode ser feito com esteróides tópicos e nos casos de lesão extensiva, também pode ser usado mostarda nitrogenada tópica, fototerapia, metotrexato e retinóides sistêmicos [44]. Apesar desse tumor acometer a pele, ele não é considerado um câncer de pele porque as células tumorais não compõem a estrutura da pele. No entanto, ressalta-se que a aplicação tópica de fármacos que tenham efeito contra esse tipo de tumor também pode representar uma nova alternativa para tratamento.

Diversos fatores limitam a eficácia e/ou aceitação dos tratamentos disponíveis. Alguns tumores, como os melanomas, apresentam mecanismos de resistência [45], o que faz com que a quimioterapia sistêmica seja ineficaz. Outro fator que dificulta o tratamento é a quantidade limitada de fármaco que chega ao tumor e afeta o microambiente tumoral [46]. A irritação causada pelos tratamentos tópicos disponíveis atualmente também limita o seu uso. É comum eles causarem reações como inflamação local intensa, eritema, ulceração, edema e descamação [47]. A taxa de cura dos tratamentos tópicos disponíveis é bastante variável, e depende da concentração, regime posológico e tempo de tratamento. No tratamento de câncer basocelular, o 5-FU tem taxa de cura de 56 a 75%. A taxa de cura do imiquimode varia de 43 a 94% e se o tumor for do tipo nodular, esta é de 50 a 65% [48].

Essas limitações reforçam a necessidade de novas opções de tratamento para o câncer de pele, não só com novos fármacos, mas também com estratégias que melhorem a entrega do fármaco e possibilitem que maiores concentrações cheguem no tumor e afetem o microambiente tumoral. Com base no número reduzido de fármacos disponíveis para tratamento tópico do câncer de pele, foi proposto neste trabalho a associação da piplartina e álcool perílico como uma nova estratégia farmacológica a ser avaliada para uso tópico. Mais especificamente, foi proposta a coencapsulação destes compostos em nanocarreadores para administração tópica e localização cutânea dos agentes citotóxicos.

### 1.3 Compostos selecionados

A piplartina (**Figura 1**) é um composto de origem natural com diversos efeitos farmacológicos, que incluem atividade citotóxica, genotóxica, antiangiogênica, antimetastática, ansiolítica, antidepressiva, leishmanicida e tripanocida. Atualmente vem sendo muito estudada devido principalmente às propriedades citotóxicas [49, 50]. Também conhecida como piperlongumina é um alcaloide presente em plantas da espécie *Piper*, como a *Piper tuberculatum* Jacq, um tipo de pimenta pertencente à família *Piperaceae* [50, 51]. No Brasil é mais conhecida como jaborandi falso ou pimenta darta [50]. A molécula foi identificada pela primeira vez em 1961, sendo a sua estrutura molecular determinada apenas em 1984 [52].



**Figura 1.** Representação da estrutura molecular da piplartina. Fonte, próprio autor.

Estudos demonstram que a piplartina exerce efeito citotóxico em diversas linhagens de células tumorais, como melanócito, cólon, pulmão e mama [49, 52]. A piplartina parece apresentar seletividade para células tumorais, sendo que concentrações tóxicas para células tumorais tem baixa atividade em células saudáveis, o que indica um bom perfil de segurança [49, 52].

A piplartina exerce seus efeitos mediante a modulação de diversas vias. Um estudo realizado com células de melanoma da linhagem A375 e A875 induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M, inibindo o crescimento celular das células de melanoma [53]. A piplartina parece ser um gatilho para apoptose das células A375,

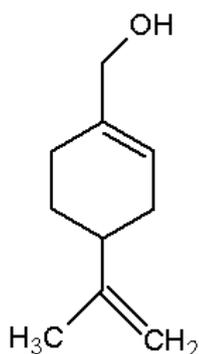
ela aumenta as espécies reativas a oxigênio (ROS), via que quando ativada causa dano mitocondrial levando a apoptose, além disso, há diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 e aumento de expressão da via pró-apoptótica Bax [53]. Em um estudo com células de leucemia humana, HL-60 (leucemia promielocítica) e K-562 (leucemia mielocítica crônica), a piplartina provocou morte celular por apoptose dependente de caspase e/ou necrose, reduzindo a viabilidade celular enquanto apresentando menor citotoxicidade em linfócitos normais [49, 54]. Um estudo subsequente realizado com células V79 de fibroblastos de pulmão de hamster chinês demonstrou que a piplartina induziu parada no ciclo celular G2/M seguida de apoptose mitocondrial dependente, com condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e perda do potencial da membrana mitocondrial [49, 55].

Outro estudo, realizado com dois tipos de linhagem celular de câncer de próstata, PC-3 e LNCaP, mostrou que o tratamento com piplartina promoveu inibição da proliferação celular com parada do ciclo celular na fase G2/M, sendo constatada uma redução da expressão da quinase 2 dependente de ciclina (cdc2) que está relacionada a parada do ciclo celular G2/M. Entretanto a ciclina B1, que também seja essencial para a transição do ciclo celular e poderia ser outro alvo da piplartina, não foi alterada, sugerindo que o efeito da piplartina sobre o ciclo celular está relacionada à redução da cdc2 [49, 56]. A piplartina também diminuiu a expressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, sugerindo o envolvimento dessa via [49, 56]. Além disso, a piplartina aumentou a ativação da caspase-3 e da poli (ADPribose) polimerase, enzimas efetoras ativadas no estágio final de apoptose durante a clivagem proteolítica, o que sugere indução de apoptose [49, 56].

Os efeitos citotóxicos da piplartina podem ser potencializados quando da sua associação a outros quimioterápicos e estudos prévios demonstraram aumento da atividade de quimioterápicos como 5-fluorouracil, cisplatina, doxorubicina e paclitaxel, com redução do IC<sub>50</sub>, quando combinados com a piplartina [52, 57-60]. A fim potencializar seu efeito citotóxico, foi proposto neste projeto a co-encapsulação do fármaco com o álcool perílico.

O álcool perílico (**Figura 2**) é um monoterpene, compostos naturais encontrados em diversas frutas e vegetais, sendo que diversos deles possuem

atividade antitumoral [61, 62]. Ele é isolado de óleo essencial de algumas plantas, como lavanda, hortelã e menta, apresenta atividade quimioterápica em linhagens tumorais de pâncreas, mama e próstata, além de apresentar atividade quimiopreventiva em roedores, reduzindo a incidência do câncer de mama, pele, fígado e pulmão [61].



**Figura 2.** Representação esquemática da molécula de álcool perílico. Fonte, próprio autor.

Estudos demonstraram que o álcool perílico é capaz de inibir o efeito de carcinógenos, suprimir a proliferação celular e induzir a diferenciação celular, sugerindo sua atividade quimiopreventiva [62, 63]. Em estudos *in vitro*, o álcool perílico induziu apoptose em diversos tipos celulares, o principal mecanismo parece ser a ativação da via de sinalização TGF- $\beta$ , levando a parada na fase G1 do ciclo celular e à apoptose [62]. Também há evidências de que ele seja capaz de potencializar o efeito de outros compostos. Por exemplo, um estudo *in vitro* realizado com uma molécula híbrida formada pela ligação da temozolomida ao álcool perílico e ácido linoléico mostrou aumento da atividade citotóxica quando comparado a temozolomida usada isoladamente em quatro diferentes linhagens celulares de melanoma humano [64]. Esse mesmo estudo demonstrou que camundongos com tumor subcutâneo induzido por células M24 e A2058 e tratados com essa molécula topicamente apresentaram redução do crescimento do tumor [64]. Essa propriedade de potencialização dos efeitos de outros agentes anti-tumorais incentivou sua co-encapsulação com a piplartina neste trabalho. Outra característica relevante do álcool perílico é que seu efeito citotóxico parece ser aumentado com a elevação da

temperatura: células tratadas com 1 mmol de álcool perílico a 37° C por 60 minutos apresentaram sobrevivência reduzida para 40%, enquanto exposição à hipertermia (43° C) reduziu a sobrevivência para 0,2% [62]. Essa propriedade pode ser interessante quando do uso de nanocarreadores termosensíveis que permitam aumento da liberação com a temperatura, permitindo então associar as vantagens do aumento da temperatura para uma liberação *on demand* e para a potencialização do efeito farmacológico. As características físico-químicas dos fármacos estão representadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Características físico-químicas dos compostos.

<b>Composto</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>LogP</b>	<b>Solubilidade em água (mg/L)</b>
Piplartina	317	2,34	0,32 [65]
Álcool perílico	152	3,17	Pouco solúvel

#### **1.4 Nanocarreadores e aplicação tópica**

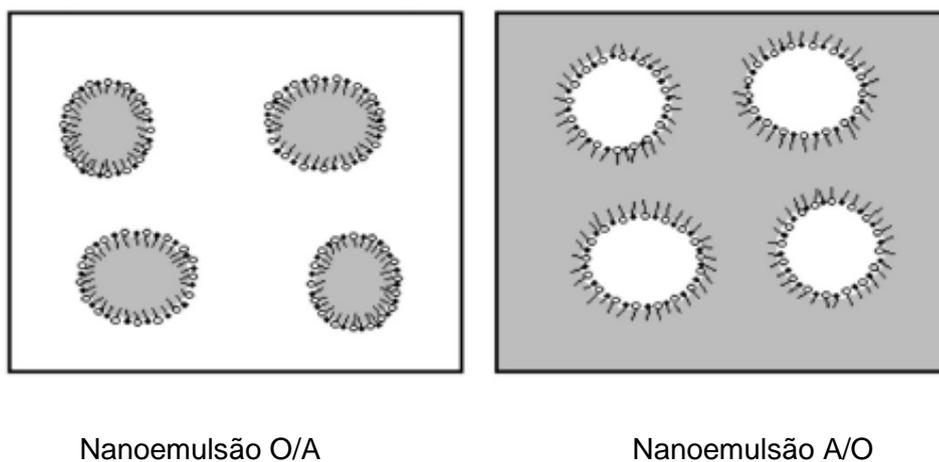
Considerando a função barreira da pele, proporcionada principalmente pela estrutura altamente organizada do estrato córneo, é necessário considerar alternativas para transpor essa barreira e promover a localização de fármacos citotóxicos em camadas viáveis da epiderme onde a lesão se desenvolve, enquanto promovendo sua localização nessas camadas com baixa absorção sistêmica.

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e considerado a principal barreira à penetração de fármacos na pele, o que decorre da sua estrutura altamente organizada e composição [24, 66], conferindo alto grau de dificuldade para o transporte de substâncias na/atraves da pele. A penetração através do estrato córneo depende grandemente das características físico-químicas do

composto. A piplartina não é uma molécula muito volumosa, apresentando massa molecular de 317 g/mol e boa lipofilicidade, com um logP estimado de  $2,34 \pm 0,37$  (ChemSketch, ACDLabs), o que faz dela um bom candidato à administração tópica. O álcool perílico é uma molécula pouco volumosa (152 g/mol), mas tem lipofilicidade mais alta, com um LogP estimado de  $3,30 \pm 0,42$  (ChemSketch, ACDLabs). Para promover a entrega nas camadas viáveis da pele, foi proposto neste trabalho a coencapsulação da piplartina e álcool perílico em sistemas nanoestruturados.

Diversos sistemas têm sido utilizados para promoção da penetração cutânea e neste estudo foram comparados 2 sistemas: nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados. Essa comparação permitiu avaliar como cada sistema influencia a penetração e permeação transdérmica dos ativos de modo a selecionar aquele capaz de maximizar a retenção cutânea.

As nanoemulsões (**Figura 3**) são obtidas pela mistura de óleo, água e tensoativo. De maneira simplificada, pode ser definida como uma dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis estabilizada por tensoativo, caracterizada por ser termodinamicamente instável e por possuir a fase interna composta por gotículas geralmente de até 300 nm, embora sistemas com fase interna de até 500 nm tenham sido descritos [67-70]. A nanoemulsão tem algumas vantagens: a fase oleosa solubiliza fármacos lipofílicos como a piplartina, além disso o sistema permite que elevadas proporções de fase aquosa sejam utilizadas para sua produção, o que tem sido descrito como um fator que pode aumentar a penetração cutânea de compostos lipofílicos, a quantidade de tensoativo necessária para a obtenção da nanoemulsão é menor quando comparada a outros sistemas como microemulsão, o que contribui para um menor potencial irritativo, e permite que sejam selecionados componentes da fase oleosa que promovam o aumento da penetração e retenção cutânea, conhecidos como promotores de penetração [70-72]. Um estudo realizado com paclitaxel e ceramida C6, ambos composto ainda mais lipofílicos do que a piplartina, co-encapsulados em uma nanoemulsão, demonstrou a capacidade desse tipo de nanocarreador em aumentar a penetração e retenção dos fármacos na camada viável da pele, enquanto limitou a entrega transdérmica [73].



**Figura 3.** Tipos de nanoemulsão, demonstrando a fase oleosa (cinza), fase aquosa (branca) e o filme interfacial de tensoativo/co-tensoativo. Adaptado de Damasceno *et al.*, 2011 [74].

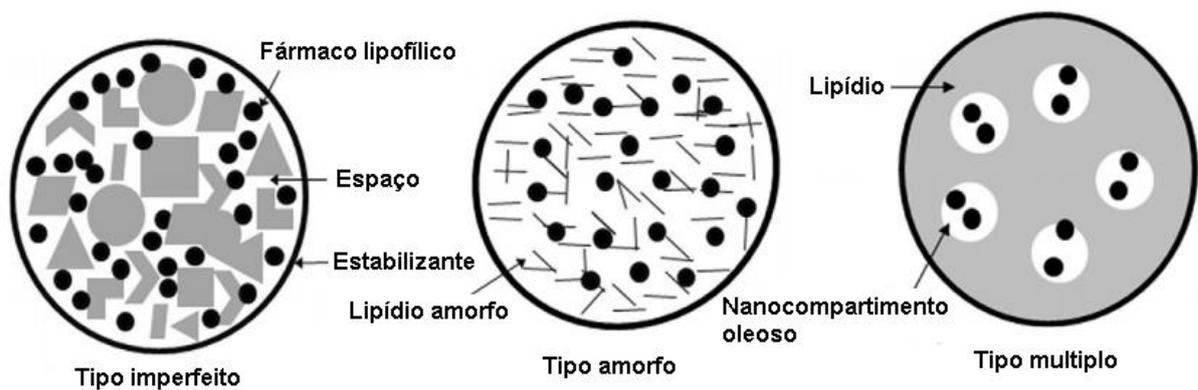
O segundo sistema selecionado foram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). O CLN pode ser desenvolvido a partir da mistura de diferentes componentes lipídicos, sendo um lipídio sólido e um lipídio líquido [75]. Isso resulta em uma matriz de partículas lipídicas que apresentam um ponto de fusão menor do que o lipídio sólido original, mas a matriz permanece sólida à temperatura corporal [75]. Considerando que o sistema foi proposto para uso tópico, a manutenção da estrutura sólida à temperatura ambiente, na qual a pele se enquadra, permite ainda sua classificação como CLN. Os carreadores sólidos foram desenvolvidos no início dos anos 1990; o primeiro tipo foram as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e posteriormente o CLN, que uniu vantagens de nanocarreadores líquidos (como lipossomas e microemulsões) a outras adicionais. Vantagens dos nanocarreadores líquidos incluem componentes bem tolerados quando aplicados topicamente e fácil produção em larga escala [75, 76]. Vantagens adicionais incluem a proteção de compostos ativos contra degradação física e química, maior flexibilidade na modulação da liberação do composto, manutenção da hidratação cutânea e alta capacidade de encapsulação de compostos lipofílicos devido à presença de lipídio líquido na matriz [75-78]. As nanopartículas sólidas podem apresentar um maior potencial bioadesivo na superfície da pele, formando um filme protetor com potencial hidrofóbico, causando um efeito oclusivo na pele o que reduz a perda de humidade pela evaporação e conseqüentemente aumenta a hidratação da pele, entretanto esse efeito oclusivo pode variar dependendo da

quantidade de lipídio e do tamanho da partícula [79]. O tamanho nanométrico das nanopartículas também permite o contato mais próximo do carreador com o estrato córneo o que pode aumentar a quantidade de fármaco que penetra na pele [77].

O NLS, que apresentam partículas lipídicas de estrutura cristalina altamente organizada, apresenta algumas limitações, como baixa capacidade de encapsulação de fármacos e a liberação rápida do fármaco encapsulado após transição polimórfica; em alguns casos essa liberação já ocorria durante o armazenamento [75, 76]. As limitações da NLS foram superadas com o desenvolvimento do CLN por Müller e colaboradores no final da década de 1990. As partículas lipídicas tem uma estrutura amorfa ou cristalina menos ordenada. Esse tipo de carreador apresenta estrutura interna na qual o lipídio líquido é incorporado no “core” da estrutura formada por um lipídeo sólido, o que aumenta a capacidade de incorporar fármacos e possibilita a liberação modulada do fármaco, pois ele se pode se solubilizar no lipídio líquido [76].

Devido à escala nanométrica das partículas dispersas, composição bem tolerada (podendo conter promotores de absorção) e possibilidade de oclusão, os CLNs vêm sendo descritos como sistemas capazes de potencializar a penetração dos fármacos nas camadas viáveis da pele, além de também permitirem a liberação prolongada do fármaco. Por isso, esses carreadores vem sendo bastante estudados e aplicados em formulações tópicas farmacêuticas e cosméticas [77, 78, 80, 81].

Os CLNs podem formar 3 tipos diferentes de matrizes como representado na **Figura 4**: (i) imperfeita, na qual a mistura de diferentes lipídios resulta em matriz sólida imperfeita, originando espaços na matriz lipídica e permitindo a incorporação de fármacos; (ii) amorfa, na qual a matriz lipídica é sólida, mas não cristalina, permanecendo no estado amorfo; e (iii) múltipla, o qual pode ser comparado a uma emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A), exceto que, neste caso, seria uma dispersão óleo-em-lipídio sólido-em-água, sendo que a matriz lipídica sólida possui pequena quantidade de óleo líquido, o que permite a incorporação de fármacos que tenham maior solubilidade em lipídio líquido do que na matriz sólida [75, 76].



**Figura 4.** Estrutura dos diferentes tipos de CLN. Adaptado de Tamjidi *et al.*, 2013 [76].

Neste estudo, o CLN foi obtido utilizando manteiga de karité como lipídio sólido. Com um ponto de fusão em torno de 36°C (o qual pode ser afetado pela adição de lipídio líquido), hipotetizamos que o aumento da temperatura cutânea facilitaria a liberação/difusão do fármaco e, conseqüentemente sua penetração cutânea. Por isso, foi avaliado o efeito da temperatura sobre a liberação e penetração cutânea dos fármacos de modo a obter um sistema de penetração “*on demand*” em resposta à temperatura. Esse objetivo deriva das conhecidas vantagens da terapia térmica que, além de poder ser utilizada para potencializar o efeito citotóxico direto, pode também contribuir para promover a transição de fases, fusão e liberação/penetração dos fármacos [82]. A maioria dos nanocarreadores termosensíveis são lipossomas, com temperatura de transição entre 39 e 42° C, o que está associado a um aumento da permeabilidade da bicamada lipídica [82]. Um exemplo da aplicação de um lipossoma termosensível é o ThermoDox®, um medicamento que está sendo desenvolvido pelo laboratório Celsion Corporation e atualmente se encontra em estudo clínico de fase 3 para o tratamento de tumor de fígado primário e em fase pré-clínica para o câncer de bexiga. O ThermoDox® tem como princípio ativo a doxorrubicina que é encapsulada em lipossoma termosensível, que sofre mudanças na sua estrutura rapidamente quando exposto a temperaturas entre 40 e 45° C, criando aberturas que liberam a doxorrubicina dentro e ao redor do tumor. Estudos preliminares realizados em animais demonstrou que o ThermoDox® aumentou em 25 vezes e 5 vezes o delivery de doxorrubicina dentro do tumor quando comparado a infusão de doxorrubicina livre e a encapsulada em lipossoma tradicional respectivamente. Menos explorados até o momento são os CLN, e este estudo busca preencher essa lacuna.

## 2 CONCLUSÕES

As formulações foram desenvolvidas com sucesso, são capazes de incorporar piplartina e álcool perílico até 1%, com alta eficiência de encapsulação e mantêm a estabilidade por até 60 dias, muito embora a NE apresentou aumento do tamanho das gotículas. Também foi possível demonstrar que o CLN é termicamente estável, sem sofrer efeitos de cristalização e apresenta ponto de fusão  $\cong 30^{\circ}\text{C}$ , o que permite explorar o aumento da temperatura local a fim de promover a fusão e aumentar a penetração. Por meio da visualização da penetração de um composto fluorescente foi possível demonstrar que a penetração mediada pelos nanocarreadores não se restringe a apêndices cutâneos, ocorrendo de maneira disseminada através do estrato córneo. Comparando os dois fármacos, a piplartina apresentou menor penetração nas camadas viáveis da pele, e o CLN demonstrou maior capacidade em promover a penetração do composto comparado à nanoemulsão na epiderme. Este estudo também fornece prova de conceito de que o aumento da temperatura local permite aumentar a penetração da piplartina mediada por CLN. Nenhum dos nanocarreadores aumentou a perda de água transepidermica no intervalo de tempo estudado, sugerindo que não desestruturam a função barreira da pele. Esse resultado é compatível com a ausência de alterações vasculares na membrana córneo-alantóide e, portanto, sugerem a segurança dos carreadores. Devido à maior estabilidade e capacidade de aumentar a penetração da piplartina, o CLN se mostrou um sistema mais atrativo para os objetivos deste projeto.

A piplartina demonstrou maior potencial citotóxico do que a álcool perílico quando incorporados separadamente nas linhagens estudadas, porém a associação dos fármacos aumentou a citotoxicidade, indicando potencialização do efeito, o que nos permite inferir que a associação de piplartina e álcool perílico pode ser vantajosa em novas estratégias visando o tratamento farmacológico do câncer de pele.

### 3 REFERÊNCIAS

1. Cameron, M.C., et al., *Basal cell carcinoma: epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2019. **80**(2): p. 303-317.
2. Schadendorf, D., et al., *Melanoma*. The Lancet, 2018. **392**(10151): p. 971-984.
3. Apalla, Z., et al., *Epidemiological trends in skin cancer*. Dermatology practical & conceptual, 2017. **7**(2): p. 1.
4. Lomas, A., J. Leonardi-Bee, and F. Bath-Hextall, *A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer*. British Journal of Dermatology, 2012. **166**(5): p. 1069-1080.
5. Pollack, L.A., et al., *Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2011. **65**(5): p. S78. e1-S78. e10.
6. Becker, J.C., et al., *Merkel cell carcinoma*. Nature reviews Disease primers, 2017. **3**(1): p. 1-17.
7. Willemze, R., *Cutaneous T-cell lymphoma: epidemiology, etiology, and classification*. Leukemia & lymphoma, 2003. **44**(sup3): p. S49-S54.
8. Criscione, V.D. and M.A. Weinstock, *Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002*. Archives of dermatology, 2007. **143**(7): p. 854-859.
9. Dobos, G., et al., *Epidemiology of cutaneous T-Cell lymphomas: a systematic review and meta-analysis of 16,953 patients*. Cancers, 2020. **12**(10): p. 2921.
10. Câncer, I.N.d. *BRASIL - ESTIMATIVA DOS CASOS NOVOS*. 2020 [cited 2020 19/11/2020]; Available from: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>.
11. Câncer, I.N.d. *Representação espacial das taxas brutas de incidência segundo Unidade da Federação (melanoma maligno da pele)*. 2020 [cited 2020 19/11/2020]; Available from: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-brutas/melanoma-maligno-da-pele>.
12. Rogers, H.W., et al., *Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population, 2012*. JAMA dermatology, 2015. **151**(10): p. 1081-1086.
13. Trager, M.H., et al., *Advances in prevention and surveillance of cutaneous malignancies*. The American journal of medicine, 2020. **133**(4): p. 417-423.
14. Ferrucci, P.F., et al., *Talimogene laherparepvec (T-VEC): an intralesional cancer immunotherapy for advanced melanoma*. Cancers, 2021. **13**(6): p. 1383.
15. Tull, S., K. Nunley, and R. Sengelmann, *Nonsurgical treatment modalities for primary cutaneous malignancies*. Dermatologic Surgery, 2008. **34**(7): p. 859-872.
16. Kibbi, N., et al., *Treatment of in-transit melanoma with intralesional bacillus Calmette-Guérin (BCG) and topical imiquimod 5% cream: a report of 3 cases*. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997), 2015. **38**(9): p. 371.
17. Shi, K., et al., *A pH-responsive cell-penetrating peptide-modified liposomes with active recognizing of integrin  $\alpha\beta 3$  for the treatment of melanoma*. Journal of Controlled Release, 2015. **217**: p. 138-150.
18. Pandit, A.S., et al., *Using topical imiquimod for the management of positive in situ margins after melanoma resection*. Cancer medicine, 2015. **4**(4): p. 507-512.
19. Gutzmer, R., et al., *Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Treatment Options*. Deutsches Ärzteblatt International, 2019. **116**(37): p. 616.
20. Hashim, P.W., et al., *Actinic Keratosis: Current Therapies and Insights Into New Treatments*. Journal of drugs in dermatology: JDD, 2019. **18**(5): p. s161-166.
21. NCCN. *NCCN Guidelines Version 1.2021 Melanoma: Cutaneous*. 2021 08/01/2021]; Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cutaneous\\_melanoma.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf).

22. Gershenwald, J.E., et al., *Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. CA: a cancer journal for clinicians, 2017. **67**(6): p. 472-492.
23. Azulay, R.D., D. Azulay, and L. Azulay-Abulafia, *Dermatologia*. Rio de Janeiro: Ed. 2017, Guanabara Koogan.
24. Moser, K., et al., *Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro*. European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics, 2001. **52**(2): p. 103-112.
25. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
26. Shai, A., R. Baran, and H.I. Maibach, *Handbook of cosmetic skin care*. 2009: Informa.
27. Gordon, R. *Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors*. in *Seminars in oncology nursing*. 2013. Elsevier.
28. Krieg, T. and M. Aumailley, *The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions*. Experimental dermatology, 2011. **20**(8): p. 689-695.
29. Gupta, V. and V.K. Sharma, *Skin typing: Fitzpatrick grading and others*. Clinics in Dermatology, 2019. **37**(5): p. 430-436.
30. Maresca, V., E. Flori, and M. Picardo, *Skin phototype: a new perspective*. Pigment cell & melanoma research, 2015. **28**(4): p. 378-389.
31. Fitzpatrick, T.B., *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*. Archives of dermatology, 1988. **124**(6): p. 869-871.
32. Narayanan, D.L., R.N. Saladi, and J.L. Fox, *Ultraviolet radiation and skin cancer*. International journal of dermatology, 2010. **49**(9): p. 978-986.
33. Madan, V., J.T. Lear, and R.-M. Szeimies, *Non-melanoma skin cancer*. The lancet, 2010. **375**(9715): p. 673-685.
34. Carvalho, C.A., et al., *Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil*. Anais brasileiros de dermatologia, 2004. **79**(1): p. 53-60.
35. Whiteman, D.C., C.A. Whiteman, and A.C. Green, *Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies*. Cancer causes & control, 2001. **12**(1): p. 69-82.
36. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-954.
37. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, *The RAF proteins take centre stage*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(11): p. 875-885.
38. Wellbrock, C. and A. Hurlstone, *BRAF as therapeutic target in melanoma*. Biochemical pharmacology, 2010. **80**(5): p. 561-567.
39. Wainstein, A.J. and F.A. Belfort, *Conduta para o melanoma cutâneo*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 2004. **31**(3): p. 204-214.
40. Tsao, H., M.B. Atkins, and A.J. Sober, *Management of cutaneous melanoma*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(10): p. 998-1012.
41. NCCN. *NCCN Guidelines Version 1.2020 Basal Cell Skin Cancer*. 2019 08/01/2021]; Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nmsc.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf).
42. FDA. *FDA Approves pembrolizumab for cutaneous squamous cell carcinoma*. [cited 2021 08/01/2021].
43. Gaydosik, A.M., et al., *Single-cell lymphocyte heterogeneity in advanced cutaneous T-cell lymphoma skin tumors*. Clinical Cancer Research, 2019. **25**(14): p. 4443-4454.
44. NCCN. *NCCN Guidelines Version 1.2021 Primary Cutaneous CD30+ T Cell Lymphoproliferative disorders*. 2020 08/01/2021]; Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/primary\\_cutaneous.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/primary_cutaneous.pdf).
45. Tentori, L., P.M. Lacal, and G. Graziani, *Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma*. Trends in pharmacological sciences, 2013. **34**(12): p. 656-666.
46. Kalal, B.S., D. Upadhyaya, and V.R. Pai, *Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer*. Oncology reviews, 2017. **11**(1).

47. Barrera, M. and E. Herrera, *Topical chemotherapy for actinic keratosis and nonmelanoma skin cancer: current options and future perspectives*. Actas dermo-sifiliográficas (english edition), 2007. **98**(8): p. 556-562.
48. Bahner, J.D. and J.S. Bordeaux, *Non-melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies*. Clinics in dermatology, 2013. **31**(6): p. 792-798.
49. Bezerra, D.P., et al., *Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine)*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **48**(3): p. 453-463.
50. Bezerra, D.P., et al., *Antitumour efficacy of Piper tuberculatum and piplartine based on the hollow fiber assay*. 2015.
51. Parmar, V.S., et al., *Phytochemistry of the genus Piper*. Phytochemistry, 1997. **46**(4): p. 597-673.
52. Piska, K., et al., *Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents—Synthesis and properties of analogues: A mini-review*. European journal of medicinal chemistry, 2018. **156**: p. 13-20.
53. Song, X., et al., *Piperlongumine induces apoptosis in human melanoma cells via reactive oxygen species mediated mitochondria disruption*. Nutrition and cancer, 2018. **70**(3): p. 502-511.
54. Bezerra, D.P., et al., *Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways*. Toxicology in vitro, 2007. **21**(1): p. 1-8.
55. Bezerra, D.P., et al., *Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of Piper tuberculatum, in yeast and mammalian V79 cells*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008. **652**(2): p. 164-174.
56. Kong, E.-H., et al., *Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells*. Oncology reports, 2008. **20**(4): p. 785-792.
57. Bezerra, D.P., et al., *In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine*. Journal of Applied Toxicology: An International Journal, 2008. **28**(2): p. 156-163.
58. Roh, J.-L., et al., *Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer*. Oncotarget, 2014. **5**(19): p. 9227.
59. Kang, Q. and S. Yan, *Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells*. Experimental and therapeutic medicine, 2015. **9**(4): p. 1345-1350.
60. Liu, Q., et al., *Coloaded nanoparticles of paclitaxel and piperlongumine for enhancing synergistic antitumor activities and reducing toxicity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. **106**(10): p. 3066-3075.
61. Rajesh, D., R.A. Stenzel, and S.P. Howard, *Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(38): p. 35968-35978.
62. Ahn, K.-J., et al., *Cytotoxicity of perillyl alcohol against cancer cells is potentiated by hyperthermia*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 2003. **57**(3): p. 813-819.
63. Gould, M.N., *Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes*. Environmental Health Perspectives, 1997. **105**(suppl 4): p. 977-979.
64. Swenson, S., et al., *NEO412: A temozolomide analog with transdermal activity in melanoma in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2018. **9**(97): p. 37026.
65. Fofaria, N.M., et al., *Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine—Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies*. International journal of pharmaceutics, 2016. **498**(1-2): p. 12-22.
66. Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. Journal of Investigative Dermatology, 1983. **80**.
67. McClements, D.J., *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities*. Soft matter, 2012. **8**(6): p. 1719-1729.

68. Kong, M. and H.J. Park, *Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier*. Carbohydrate polymers, 2011. **83**(3): p. 1303-1310.
69. Porras, M., et al., *Studies of formation of W/O nano-emulsions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. **249**(1-3): p. 115-118.
70. Giacone, D.V., et al., *Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **165**: p. 1055-1065.
71. Pepe, D., et al., *Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent*. Journal of pharmaceutical sciences, 2013. **102**(5): p. 1476-1487.
72. Lopes, L.B., M.T. J Garcia, and M.V. LB Bentley, *Chemical penetration enhancers*. Therapeutic delivery, 2015. **6**(9): p. 1053-1061.
73. Carvalho, V.F., et al., *Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. **109**: p. 131-143.
74. Damasceno, B., et al., *Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2011: p. 9-18.
75. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**: p. S131-S155.
76. Tamjidi, F., et al., *Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013. **19**: p. 29-43.
77. Souto, E., et al., *Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **278**(1): p. 71-77.
78. Passos, J.S., et al., *Development, skin targeting and antifungal efficacy of topical lipid nanoparticles containing itraconazole*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020. **149**: p. 105296.
79. Souto, E. and R. Müller, *Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®)*. International journal of cosmetic science, 2008. **30**(3): p. 157-165.
80. Das, S., W.K. Ng, and R.B. Tan, *Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?* European journal of pharmaceutical sciences, 2012. **47**(1): p. 139-151.
81. Costa-Fernandez, S., et al., *Nanostructured lipid carriers containing chitosan or sodium alginate for co-encapsulation of antioxidants and an antimicrobial agent for potential application in wound healing*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **183**: p. 668-680.
82. Dunne, M., K. Hynynen, and C. Allen, *Thermosensitive nanomedicines could revolutionize thermal therapy in oncology*. Nano Today, 2017. **16**: p. 9-13.
83. Simões, S., et al., *Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80*. European journal of pharmaceutical sciences, 2005. **26**(3-4): p. 307-317.
84. Lin, T.K., L. Zhong, and J.L. Santiago, *Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils*. Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
85. Carvalho, V.F., et al., *Development of a method for quantitative determination of the cytotoxic agent piplartine (piperlongumine) in multiple skin layers*. Biomedical Chromatography, 2019. **33**(2): p. e4386.
86. Carvalho, V.F., et al., *Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piplartine*

- (*piperlongumine*) and mammary tissue targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019: p. 118460.
87. Gupta, R., et al., *Effect of chemical permeation enhancers on skin permeability: in silico screening using molecular dynamics simulations*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1-11.
  88. Sallam, M.A. and M.T.M. Boscá, *Mechanistic analysis of human skin distribution and follicular targeting of adapalene-loaded biodegradable Nanospheres with an insight into hydrogel matrix influence, in vitro skin irritation, and in vivo tolerability*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2017. **106**(10): p. 3140-3149.
  89. Ikoku, C.U. and H.J. Ramey, *Transient flow of non-Newtonian power-law fluids in porous media*. 1978: Dept. of Energy.
  90. Gabbanelli, S., G. Drazer, and J. Koplik, *Lattice Boltzmann method for non-Newtonian (power-law) fluids*. *Physical review E*, 2005. **72**(4): p. 046312.
  91. Migotto, A., et al., *Multifunctional nanoemulsions for intraductal delivery as a new platform for local treatment of breast cancer*. *Drug delivery*, 2018. **25**(1): p. 654-667.
  92. Bernardi, D.S., et al., *Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments*. *Journal of nanobiotechnology*, 2011. **9**(1): p. 44.
  93. Gilleron, L., et al., *Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the Draize eye irritation test*. *Toxicology in vitro*, 1997. **11**(5): p. 641-644.
  94. Kalweit, S., et al., *A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test*. *Toxicology in vitro*, 1990. **4**(4-5): p. 702-706.
  95. McKenzie, B., et al., *The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ocular irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ*. *International journal of pharmaceutics*, 2015. **490**(1-2): p. 1-8.
  96. Gupta, H., et al., *Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system*. *Drug delivery*, 2007. **14**(8): p. 507-515.
  97. Gupta, H., et al., *Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery*. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 2010. **6**(2): p. 324-333.
  98. Gupta, A., S.P. Stratton, and P.B. Myrdal, *An HPLC method for quantitation of perillyl alcohol in a topical pharmaceutical cream formulation*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2005. **37**(3): p. 447-452.
  99. Kopečná, M., et al., *Esters of terpene alcohols as highly potent, reversible, and low toxic skin penetration enhancers*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1-12.
  100. Chen, T.C., et al., *The Monoterpenoid Perillyl Alcohol: Anticancer Agent and Medium to Overcome Biological Barriers*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(12): p. 2167.
  101. Thomas, S., et al., *Stability, cutaneous delivery, and antioxidant potential of a lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol codrug incorporated in microemulsions*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014. **103**(8): p. 2530-2538.
  102. Lopes, L.B., J.H. Collett, and M.V.L. Bentley, *Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer*. *European journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005. **60**(1): p. 25-30.
  103. Mendes, A., et al., *Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **111**: p. 755-763.
  104. Zoubari, G., et al., *Effect of drug solubility and lipid carrier on drug release from lipid nanoparticles for dermal delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017. **110**: p. 39-46.
  105. Chou, T.-C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. *Advances in enzyme regulation*, 1984. **22**: p. 27-55.

106. Chou, T.-C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacological reviews, 2006. **58**(3): p. 621-681.
107. Allam, A.N., et al., *Preparation, characterization and in vivo evaluation of curcumin self-nano phospholipid dispersion as an approach to enhance oral bioavailability*. Int J Pharm, 2015. **489**(1-2): p. 117-23.
108. Barnes, H.A., J.F. Hutton, and K. Walters, *An introduction to rheology*. 1989: Elsevier.
109. FLORENCE, A. and D. ATTWOOD, *Princípios físico-químicos em farmácia*. 2<sup>a</sup>. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2011.
110. Hosmer, J.M., A.A. Steiner, and L.B. Lopes, *Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: impact of the monoglyceride*. Pharmaceutical research, 2013. **30**(3): p. 694-706.
111. Hosmer, J.M., et al., *Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel*. Journal of pharmaceutical sciences, 2011. **100**(4): p. 1444-1455.
112. Formariz, T.P., et al., *Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos*. Revista brasileira de ciências farmacêuticas, 2005: p. 301-313.
113. Salata, G.C., et al., *Microemulsion for Prolonged Release of Fenretinide in the Mammary Tissue and Prevention of Breast Cancer Development*. Molecular Pharmaceutics, 2021. **18**(9): p. 3401-3417.
114. Mojeiko, G., et al., *Optimization of nanoemulsified systems containing lamellar phases for co-delivery of celecoxib and endoxifen to the skin aiming for breast cancer chemoprevention and treatment*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022. **646**: p. 128901.
115. Jores, K., et al., *Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy*. Journal of Controlled Release, 2004. **95**(2): p. 217-227.
116. Mo, Z., et al., *Nanostructured lipid carriers-based thermosensitive eye drops for enhanced, sustained delivery of dexamethasone*. Nanomedicine, 2018. **13**(11): p. 1239-1253.
117. Silva, E.C.d., M.V.R.V.d. Paola, and J.d.R. Matos, *Análise térmica aplicada à cosmetologia*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007. **43**(3): p. 347-356.
118. Costa, P.J.C.d., *Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2002. **38**(2): p. 141-153.
119. Chen, T.C., C.O. Da Fonseca, and A.H. Schönthal, *Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy*. American journal of cancer research, 2015. **5**(5): p. 1580.
120. Williams, A.C. and B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**: p. 128-137.
121. Ogiso, T., M. Iwaki, and T. Paku, *Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors*. Journal of pharmaceutical sciences, 1995. **84**(4): p. 482-488.
122. Pepe, D., et al., *Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid*. International journal of pharmaceutics, 2012. **434**(1-2): p. 420-428.
123. Lopes, L.B., N. Murphy, and A. Nornoo, *Enhancement of transdermal delivery of progesterone using medium-chain mono and diglycerides as skin penetration enhancers*. Pharmaceutical development and technology, 2009. **14**(5): p. 524-529.
124. Smyth, H.D., G. Becket, and S. Mehta, *Effect of permeation enhancer pretreatment on the iontophoresis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) through human epidermal membrane (HEM)*. Journal of pharmaceutical sciences, 2002. **91**(5): p. 1296-1307.

125. Shah, A., et al., *Effect of different polysorbates on development of self-microemulsifying drug delivery systems using medium chain lipids*. Drug development and industrial pharmacy, 2018. **44**(2): p. 215-223.
126. Benson, H.A., *Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques*. Current drug delivery, 2005. **2**(1): p. 23-33.
127. Schwarz, J.S., M.R. Weisspapier, and D.I. Friedman, *Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams*. Pharmaceutical research, 1995. **12**(5): p. 687-692.
128. Danaei, M., et al., *Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems*. Pharmaceutics, 2018. **10**(2): p. 57.
129. du Plessis, J., et al., *The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin*. International journal of pharmaceutics, 1994. **103**(3): p. 277-282.
130. Verma, D.D., et al., *Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin*. International journal of pharmaceutics, 2003. **258**(1-2): p. 141-151.
131. Liu, W., et al., *Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method*. Journal of colloid and interface science, 2006. **303**(2): p. 557-563.
132. de Mattos, C.B., et al., *Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 5529.
133. Joshi, A., et al., *Nano-in-micro alginate based hybrid particles*. Carbohydrate Polymers, 2010. **81**(4): p. 790-798.
134. Franzol, A. and M.C. Rezende, *Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico*. Polímeros, 2015. **25**(SPE): p. 1-9.
135. Zhang, H., et al., *Inhibiting Ostwald Ripening by Scaffolding Droplets*. Langmuir, 2020. **36**(45): p. 13682-13688.
136. Neto, H., C. Novák, and J. Matos, *Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form*. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2009. **97**(1): p. 367-374.
137. Hajj Ali, H., et al., *Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2016. **118**(8): p. 1168-1178.
138. Bunjes, H., M.H. Koch, and K. Westesen, *Effect of particle size on colloidal solid triglycerides*. Langmuir, 2000. **16**(12): p. 5234-5241.
139. Monteiro, L.M., et al., *Co-delivery of buparvaquone and polymyxin B in a nanostructured lipid carrier for leishmaniasis treatment*. Journal of global antimicrobial resistance, 2019. **18**: p. 279-283.
140. Carvalho, V.F., et al., *Potential of non-aqueous microemulsions to improve the delivery of lipophilic drugs to the skin*. AAPS PharmSciTech, 2017. **18**(5): p. 1739-1749.
141. Yu, Y.-Q., et al., *Enhancing permeation of drug molecules across the skin via delivery in nanocarriers: Novel strategies for effective transdermal applications*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2021. **9**: p. 200.
142. Pokharkar, V.B., et al., *Skin delivery aspects of benzoyl peroxide-loaded solid lipid nanoparticles for acne treatment*. Therapeutic delivery, 2014. **5**(6): p. 635-652.
143. Gupta, M., U. Agrawal, and S.P. Vyas, *Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases*. Expert opinion on drug delivery, 2012. **9**(7): p. 783-804.
144. Wiedersberg, S., C.S. Leopold, and R.H. Guy, *Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(3): p. 453-466.
145. Tripathi, S.K. and B.K. Biswal, *Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent*. Pharmacological Research, 2020. **156**: p. 104772.

146. Bezerra, D., et al., *In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper*. Brazilian journal of medical and biological research, 2006. **39**: p. 801-807.
147. Bezerra, D.P., et al., *In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species*. Journal of Applied toxicology, 2008. **28**(5): p. 599-607.
148. Paduch, R., et al., *Terpenes: substances useful in human healthcare*. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2007. **55**(5): p. 315-327.
149. Moghimi, H.R., A.C. Williams, and B.W. Barry, *A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids III. Effects of terpene penetration enhancers on the release of 5-fluorouracil and oestradiol from the matrix*. International journal of pharmaceuticals, 1996. **145**(1-2): p. 37-47.
150. Qadir, A., et al., *Nanostructured lipidic carriers for dual drug delivery in the management of psoriasis: systematic optimization, dermatokinetic and preclinical evaluation*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2020. **57**: p. 101775.
151. Cazedey, E.C.L., et al., *Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **45**(4): p. 759-766.
152. Pinnagoda, J., et al., *Prediction of susceptibility to an irritant response by transepidermal water loss*. Contact Dermatitis, 1989. **20**(5): p. 341-346.
153. Pinnagoda, J., et al., *Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: a report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis*. Contact dermatitis, 1990. **22**(3): p. 164-178.
154. Kapalczyńska, M., et al., *2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures*. Archives of medical science: AMS, 2018. **14**(4): p. 910.
155. Jensen, C. and Y. Teng, *Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?* Frontiers in Molecular Biosciences, 2020. **7**: p. 33.
156. Duval, K., et al., *Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture*. Physiology, 2017. **32**(4): p. 266-277.
157. Zhang, Y., et al., *Construction of a high-EGFR expression cell line and its biological properties comparing with A431 cell*. African Journal of Biotechnology, 2010. **9**(30): p. 4674-4680.
158. Newby, J.C., et al., *Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer*. Clinical Cancer Research, 1997. **3**(9): p. 1643-1651.
159. Daveri, E., et al., *Antiproliferative effect of Rottlerin on SK-MEL-28 melanoma cells*. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2015. **2015**.
160. Haluska, F.G., et al., *Genetic alterations in signaling pathways in melanoma*. Clinical cancer research, 2006. **12**(7): p. 2301s-2307s.