

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores
de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**

Stephânia Fleury Taveira

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores
de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Stephânia Fleury Taveira.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez.

Ribeirão Preto

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Taveira, Stephânia Fleury

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele, 2009.

142p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez.

1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas 2. Iontoforese 3. Cultura de células.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Stephânia Fleury Taveira

Título do trabalho: Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele, 2009.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À Deus, pela presença constante em minha vida.

Ao meu marido, Eduardo, pela paciência e compreensão durante estes anos em que ficamos longe. Também por sempre comparecer nos momentos importantes, fazendo esta distância parecer menor.

Aos meus pais, que me deram condições de ficar em Ribeirão Preto, sempre me apoiando, incentivando e participando de muitos desafios nestes anos.

A toda minha família, aos meus irmãos e meus avós, que também participaram e ajudaram durante este tempo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, pelo carinho, atenção e muita dedicação durante todos estes anos.

Agradecimentos

A Danielle e Luciana, pela amizade e carinho. Obrigada pela companhia, pelas opiniões no trabalho e pelos dias divertidos em Ribeirão Preto.

Aos colegas de laboratório: Franciane, Joel, Patrícia, Taís, Guilherme, Deise, Paola, Henrique e José Orestes pela divertida convivência no laboratório.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pelas valiosas contribuições no trabalho, juntamente com todos do laboratório de Imunologia.

A coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, e as funcionárias, pela colaboração e trabalho prestado.

A Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado e auxílio financeiro concedido a este projeto.

RESUMO

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele.** 2009. 142 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A Doxorrubicina (DOX) é um dos antineoplásicos mais utilizados no tratamento de tumores sólidos, como os de pele. Sua baixa penetração cutânea e instabilidade frente aos tecidos biológicos impedem, no entanto, sua aplicação tópica e localizada. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é direcionar e aumentar a penetração cutânea da DOX, além de protegê-la contra eventuais degradações na pele, através do desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo DOX e da aplicação da iontoforese. Assim, foram desenvolvidas e validadas duas metodologias para quantificação do fármaco, uma por espectrofotometria no UV/Vis e outra utilizando o CLAE. Ambas as metodologias apresentaram linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. As NLS foram obtidas pelo método da Microemulsão (ME), vertendo-as em excesso de água gelada e agitando o sistema vigorosamente. Foram obtidas NLS com cargas superficiais negativas (NLS-N) e NLS com cargas superficiais positivas (NLS-P). Sendo que as NLS-N continham ácido esteárico, lecitina de soja, taurodeoxicolato de sódio, água e diferentes quantidades de DOX. E as NLS-P continham compritol e/ou ácido esteárico, poloxamer, cloreto de cetilpiridínio, água, 8% de DOX e foram obtidas através de um planejamento fatorial completo (3^2). Foram selecionadas as NLS-N com 8% de DOX e duas NLS-P: uma contendo como fase oleosa somente o ácido esteárico (NLS-P 1) e outra contendo uma mistura de ácido esteárico/ compritol 1:2 (NLS-P 1:2). O tamanho médio das NLS-N foi de 175 nm (Pdl 0,278) e das NLS-P 278 nm (Pdl 0,357). A eficiência de encapsulação foi de 90, 97 e 61% das NLS-N, NLS-P 1 e NLS-P 1:2, respectivamente. Estudos de localização celular foram realizados e observou-se que as NLS-N permitiram a penetração da DOX tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, assim como as NLS-P 1:2 que também permitiram a penetração da DOX em um maior número de células tumorais. Estudos de estabilidade foram feitos com as NLS e soluções de DOX em diferentes temperaturas. A DOX encapsulada nas NLS foi estável a 4°C por até 48h, sendo que as NLS liofilizadas são estáveis por 30 dias. Nos estudos de liberação da DOX das NLS observou-se que estas sustentam a liberação da DOX. Porém, as NLS-P 1:2 liberam a DOX mais rapidamente do que nas NLS-N, 40 e 25% em 72 horas, respectivamente. Nos estudos de permeação cutânea, observa-se que as NLS aumentam significativamente a quantidade de DOX na solução receptora e na epiderme. A aplicação da corrente elétrica aumentou duas vezes a quantidade de DOX no receptor das células de difusão e de 3 a 6 vezes a quantidade do fármaco na epiderme. Nos estudos de fluxo eletrosmótico observa-se que as NLS-P diminuem o fluxo do paracetamol, principalmente devido ao seu alto potencial de cargas positivas que interagem com as cargas negativas da pele, neutralizando-as, e diminuindo o fluxo de íons em direção ao cátodo, mesmo por um período de 1 hora. Foram realizados estudos de citotoxicidade da DOX em diferentes formulações, em células B16F10 e em A431, e foi observado que a DOX encapsulada nas NLS-N é significativamente mais citotóxica do que as outras formulações, atingindo uma citotoxicidade de 100% quando em contato com as células de melanoma após 6 horas de incubação em concentrações superiores a 20 ng/mL. A aplicação de corrente elétrica em cultura de células aumentou também a penetração do fármaco nas células tumorais e, conseqüentemente, sua citotoxicidade. A indução dos tumores *in vivo* não se mostrou viável para o modelo de camundongos sem pêlo, porém o tratamento iontoforético demonstrou-se viável.

Palavras-chave: Doxorrubicina, Iontoforese, Nanopartículas Lipídicas Sólidas e cultura de células.

ABSTRACT

TAVEIRA, S., F. Solid **Lipid Nanoparticles as drug carrier for topical skin cancer treatment**. 2009. 142 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Doxorubicin (DOX) is one of the most used antineoplastic drug to treat solid tumors, such as skin cancer. Its low penetration into the skin and its instability in biological tissues, however, difficult topical and localized application. Within this context, the aim of this work was to increase DOX penetration into the skin, and to protect the drug against possible skin degradation, through the development of solid lipid nanoparticles (SLN) and the application of iontophoresis. The standardization and validation of two methodologies for the DOX quantification was performed: one of them using an UV/Vis spectrophotometer and the other using the HPLC. Both methods showed suitable linearity, sensibility, selectivity, precision and accuracy, according to the in vigor specifications. SLN was obtained by microemulsion (ME) method spilling them into an excess of water with vigorously shaking. SLN were obtained with negative surface charge (SLN-N) and SLN with positive surface charge (SLN-P). SLN-N contained stearic acid, soy lecithin, sodium taurodeoxicolate, water and different amounts of DOX. And the SLN-P containing compritol and / or stearic acid, poloxamer, sodium chloride, water, 8% of DOX and were obtained through a complete factorial design (3^2). Were selected SLN-N with 8% of DOX and two SLN-P containing only stearic acid (SLN-P 1) and one containing a mixture of stearic acid / compritol 1:2 (SLN-1 P : 2). The average size of the SLN-N was 175 nm (Pdl 0.278) and the SLN-P 278 nm (Pdl 0.357). The encapsulation efficiency was 90, 97 and 61% for SLN-N, P SLN -1 and SLN -P 1:2, respectively. Studies of cellular location were made and showed that the SLN -N allowed the penetration of DOX in the cytoplasm and the nucleus of cells, as well as SLN -P 1:2 that also allowed the penetration of DOX in a larger number of tumor cells. Stability studies were performed with the SLN and DOX solutions at different temperatures. Encapsulated DOX in the SLN was stable at 4 °C for 48 hours, and freeze-dried SLN are stable for 30 days. In release studies with DOX-SLN was observed that they control DOX release. However, SLN-P 1:2 DOX release more quickly than SLN-N, 40 and 25% in 72 hours, respectively. In skin permeation studies, it is observed that SLN significantly increase the amount of DOX in the receiver compartment and in the epidermis. The application of an electrical current increased two times the amount of DOX in the receptor cells and 3 to 6 times the amount of drug in the epidermis. Electrosmotic flow studies showed that the SLN-P decrease acetaminophen flow, mainly due to its high positive charges that interact with negative charges of the skin, neutralizing them and reducing the flow of ions to the cathode, even for a period of 1 hour. Cytotoxicity studies were performed with DOX in different formulations in B16F10 and A431 cells, and it was observed that DOX encapsulated in the SLN-N is significantly more cytotoxic than the other formulations, achieving 100% of cytotoxicity when in contact with the melanoma cells after 6 hours of incubation at concentrations above 20 ng/mL. The application of an electrical current in cell culture also increased the penetration of the drug in tumor cells and, consequently, its cytotoxicity. The induction of tumors *in vivo* was not feasible for hairless mice, but the iontophoretic treatment demonstrated to be feasible.

Key-words: Doxorubicin, Iontophoresis, Solid lipid nanoparticles and cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A epiderme e seus cinco estratos: córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e germinativo (também denominado de basal) (www.forp.usp.br/mef/embriologia).....	3
Figura 2: Melanócito – situado na camada basal da epiderme, onde distribui grânulos de melanina para os demais estratos da pele (www.scf-online.com).....	3
Figura 3: Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e (B) através dos apêndices cutâneos (Campos, 2006).....	4
Figura 4: Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos: (A) Microemulsão e (B) NLS (Muller et al., 2000a).....	5
Figura 5: Micrografias de NLS de (A) triestearina e monoestearato (66:33) de diâmetro de 184 µm (Cortesi et al., 2002) e de (B) Compritol e Poloxamer 188 de diâmetro de 400nm (Muller et al., 2000e).....	6
Figura 6: Esquema representativo do processo de obtenção de NLS a quente e a frio através do homogeneizador de alta pressão (adaptado de (Mehnert, Mader, 2001)..	7
Figura 7: Representação esquemática do equipamento utilizado para obtenção de NLS a partir de microemulsões de maneira reprodutível e em larga escala (Marengo et al., 2000).	8
Figura 8: Representação esquemática da transição do lipídeo para um estado altamente organizado e expulsão do fármaco nele encapsulado (Muller et al., 2002).	12
Figura 9: Representação esquemática de uma NLS contendo lipídeos sólidos e líquidos com cadeias carbônicas de tamanhos variados (cristais pouco organizados) (Muller et al., 2002).	12
Figura 10: Representação esquemática da localização de um fármaco encapsulado nas NLS e sua influência na velocidade de liberação (Muller et al., 2000b).	13
Figura 11: Estrutura química das antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarrubicina).	14
Figura 12: Estrutura química da DOX e seus principais metabólitos (doxorubicinol, doxorubicinona e doxorubicinolona) (Arnold et al., 2004).	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DOX	Cloridrato de Doxorrubicina
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
EC	Etrato Córneo
EE%	Eficiência de Encapsulação (em porcentagem)
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
ME	Microemulsão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NLS-N	Nanopartículas Lipídicas Sólidas Negativas
NLS-P	Nanopartículas Lipídicas Sólidas Positivas
PdI	Índice de Polidispersividade
TG	Termogravimetria
UV/Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Câncer de pele e seu tratamento.....	3
2.2 Nanopartículas lipídica sólidas (NLS).....	5
2.2.1 Técnicas de preparo das NLS.....	6
2.2.2 Métodos para caracterização de NLS.....	9
2.3 Doxorrubicina (DOX) – Penetração cutânea e estabilidade química da molécula	13
3 OBJETIVO.....	20
3.1 Objetivos específicos.....	20
4 Conclusão.....	22

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele é um dos neoplasmas mais diagnosticados dentre todos os existentes, e seu risco de vida é potencialmente igual aos outros tipos de câncer (Assefa et al., 2005).

A doxorubicina (DOX) é um antineoplásico amplamente utilizado na clínica para o tratamento de vários tumores, inclusive o câncer de pele (Moore et al., 1985). Porém, a sua administração é feita por via endovenosa levando a um baixo índice terapêutico para os tumores cutâneos e causando vários efeitos colaterais (Zagonel et al., 1996).

Sendo assim, novos tratamentos mais eficientes e que minimizem os efeitos colaterais são necessários. Uma alternativa é a aplicação tópica da DOX para o tratamento do câncer de pele. Contudo a sua baixa penetração cutânea e instabilidade frente aos tecidos biológicos dificultam a sua aplicação tópica e localizada. Diferentes sistemas e métodos de liberação de fármacos devem ser, portanto, estudados para melhorar a efetividade terapêutica e a segurança clínica destes quimioterápicos (Wong et al., 2007).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos que reúnem as principais vantagens encontradas nos sistemas lipossomais e nas micro e nanopartículas poliméricas (Olbrich et al., 2001). Da mesma forma que as emulsões e os lipossomas, as NLS são sistemas compostos por substâncias fisiologicamente bem toleradas e que já possuem aprovação para a aplicação farmacológica em seres humanos. De maneira similar as nanopartículas poliméricas, a sua matriz sólida protege as substâncias ativas contra degradações químicas e permite modular a velocidade de liberação do fármaco. No entanto, é importante ressaltar que os componentes das NLS possuem baixa citotoxicidade e possibilitam a obtenção de nanopartículas sem o uso de solventes. Além disso, sua produção também pode ser feita em larga escala, o que é propício para a produção industrial (Olbrich et al., 2001). Vale ressaltar que a encapsulação da DOX em NLS tem potencial para melhorar a estabilidade da DOX e, principalmente, facilitar sua penetração para as camadas mais profundas da pele, onde esses tumores se localizam.

Dentre os métodos físicos existentes, destaca-se a iontoforese que é um método capaz de aumentar e controlar a penetração de moléculas e macromoléculas carregadas ou não na pele e através dela (Lopez et al., 2003b). Além de promover a liberação do fármaco em maior quantidade, também é mais rápido do que os sistemas passivos de liberação tópica e transdérmica (Gratieri et al., 2008). Não obstante a estes aspectos singulares, estudos relatam que a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade contribui não só para a permeabilização do estrato córneo na pele, como também para a entrada do fármaco nas células tumorais (Taveira, 2007).

Pretende-se, portanto, obter NLS contendo DOX na tentativa de proteger o fármaco, evitando seu contato direto com o EC, e fazendo com que o mesmo entre nas camadas mais profundas da pele. A se destacar que diversos estudos demonstram que partículas com diâmetro menor que 10 μm parecem penetrar através dos anexos cutâneos, como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. Uma vez dentro da pele, na epiderme viável, é possível que as partículas formem um reservatório, promovendo a liberação local do fármaco encapsulado por um longo período de tempo (Nicoli et al., 2001). Para aumentar a penetração cutânea da DOX, a iontoforese, que utiliza os anexos cutâneos como principal via de penetração (Ferry et al., 1995), também será aplicada (Nicoli et al., 2001).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Câncer de pele e seu tratamento

A pele é composta de três camadas: a epiderme, a derme e a mais profunda hipoderme (subcutis). A epiderme é subdividida em cinco camadas ou estratos, que são denominados, de dentro para fora da pele, de estrato germinativo ou basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (EC). A maior parte da epiderme é formada por um epitélio escamoso, que consiste principalmente de queratinócitos. Estas células se diferenciam em cada estrato, até que chegam ao estrato córneo, que é a camada mais externa da pele (Wells et al., 2004) (Figura 1).

A camada celular basal também possui melanócitos (Figura 2), que produzem e distribuem os grânulos de melanina para os queratinócitos. As células de Langerhans são proeminentes na epiderme, e tem um papel importante na defesa imune desta camada (Wells et al., 2004).

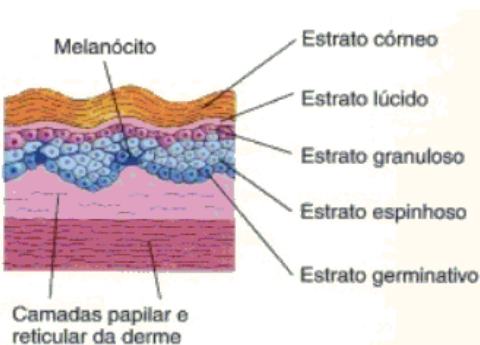


Figura 1: A epiderme e seus cinco estratos: córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e germinativo (também denominado de basal) (www.forp.usp.br/mef/embriologia).



Figura 2: Melanócito – situado na camada basal da epiderme, onde distribui grânulos de melanina para os demais estratos da pele (www.scf-online.com).

Como a pele é um órgão heterogêneo, o câncer pode desenvolver-se em diferentes camadas e apresentar características específicas. Os tumores cutâneos mais freqüentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, carcinoma epidermóide (de células espinhosas) com 25% dos casos e melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Felizmente o carcinoma basocelular, mais freqüente, é também o menos agressivo. Este tipo e o carcinoma epidermóide são também chamados de câncer de pele não melanogênicos, enquanto o melanoma e outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados de câncer de pele melanômicos (INCA,2006).

Desta forma, para o tratamento tópico do câncer de pele, o fármaco deve atravessar o EC para atingir as camadas mais profundas da pele onde estes tumores se desenvolvem. No entanto, o EC é a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele. Isso porque, ele é composto por queratinócitos, localizados em uma matriz lipídica organizada em bicamadas lamelares. A dificuldade em se permeiar o EC provém destas bicamadas lipídicas e dos queratinócitos (Bergh et al., 1997).

Uma substância consegue atravessar o EC por três vias: entre os corneócitos, permanecendo na matriz lipídica (via intercelular); através dos corneócitos e da matriz lipídica (via transcelular) ou através dos anexos da pele, como os pêlos, as glândulas e as imperfeições da pele (via apêndices) (Moser et al., 2001)(Figura 3).

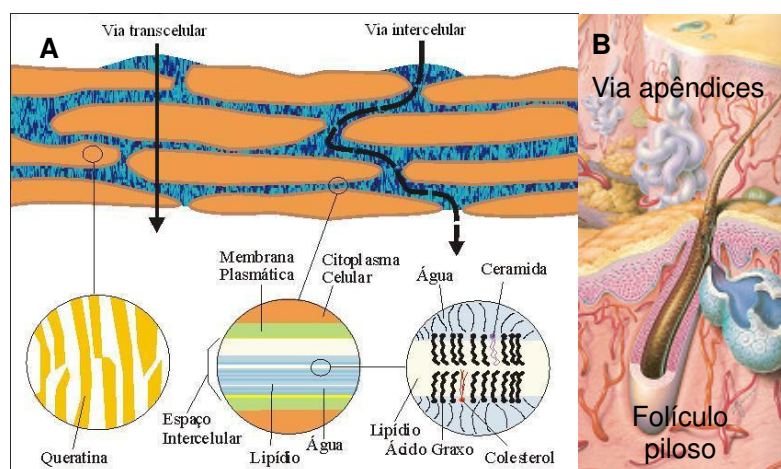


Figura 3: Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e (B) através dos apêndices cutâneos (Campos, 2006).

Desta forma, a pele é uma barreira natural para penetração de substâncias. Portanto, dificilmente um fármaco administrado topicamente, sem uma formulação adequada, atingirá as camadas mais profundas da pele, em concentrações suficientes para o tratamento de tumores cutâneos.

Dentre os métodos utilizados para melhorar a penetração cutânea de fármacos, pode-se citar os sistemas de liberação; como os lipossomas, microemulsões, nano e micropartículas; além de promotores químicos e físicos de permeação, como a iontoforese (Moser et al., 2001).

2.2 Nanopartículas lipídica sólidas (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos compostos, como o próprio nome diz, por partículas de tamanho nanométrico, cuja matriz é formada por lipídeos sólidos. Dentre as várias vantagens que as NLS oferecem, ressalta-se a possibilidade de uma liberação controlada e alvo específica de fármacos nelas encapsuladas, o aumento da estabilidade destes fármacos, a atoxicidade de seus componentes, a não utilização de solventes orgânicos em sua produção, além da facilidade de produção em larga escala e de esterilização (Lippacher et al., 2001; Maia et al., 2000; Mehnert, Mader, 2001; Wissing et al., 2004).

A estrutura das NLS é bastante similar a das nanoemulsões (Figura 4), mas o seu núcleo é formado por lipídeos sólidos a temperatura ambiente e não óleos líquidos, como nas nanoemulsões (Muller et al., 2000a). Esta solidez característica dos lipídeos que formam as NLS confere menor mobilidade aos ativos neles incorporados podendo sustentar, ou até controlar, a velocidade de liberação destas substâncias (Mehnert, Mader, 2001).

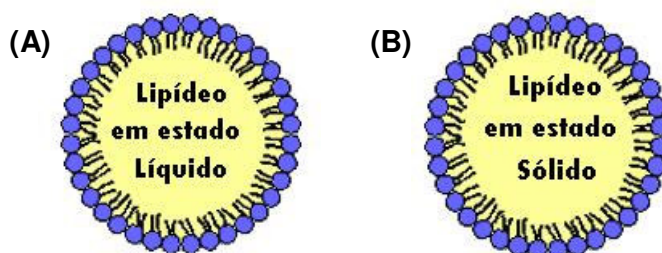


Figura 4: Representação esquemática de diferentes sistemas carreadores de fármacos: (A) Microemulsão e (B) NLS (Muller et al., 2000a).

É importante assinalar, que os lipídeos mais utilizados na obtenção das NLS são triglicerídeos (triestearina), glicídeos parciais (monoestearato de gliceril), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (cetilpalmitato). Também são utilizados diversos emulsificantes e polímeros, como os sais biliares (taurodeoxicolato), lecitinas e copolímeros do polióxidoetileno e polióxido propileno (Poloxamer) (Mehnert, Mader, 2001) para evitar a agregação das partículas e estabilizá-las (Figura 5).

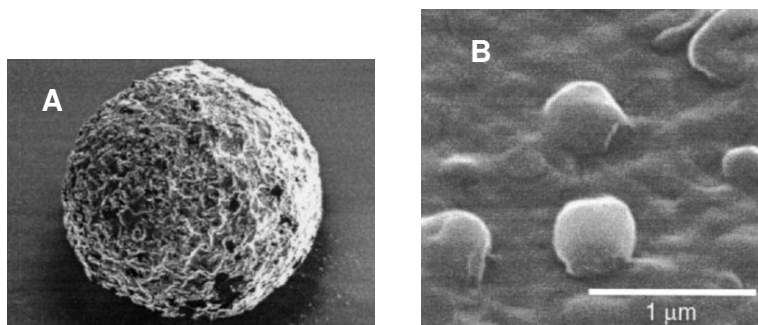


Figura 5: Micrografias de NLS de (A) triestearina e monoestearato (66:33) de diâmetro de 184 µm (Cortesi et al., 2002) e de (B) Compritol e Poloxamer 188 de diâmetro de 400nm (Muller et al., 2000e).

2.2.1 Técnicas de preparo das NLS

As NLS podem ser preparadas por diversas técnicas, e estas, por sua vez, interferem em diversas características das partículas, como por exemplo, na sua morfologia. Os métodos mais descritos na literatura são aqueles que utilizam homogeneizadores de alta pressão e aqueles que levam a obtenção dos sistemas sólidos, a partir de microemulsões.

A técnica de homogeneização em alta pressão foi desenvolvida por Muller e Luck em 1993 (Patente Européia número 0605497) para a preparação de nanoemulsões para nutrição parenteral em grande escala (Mehnert, Mader, 2001). Existem inúmeros equipamentos, de vários tamanhos, preços e capacidades diferentes para tanto (Mehnert, Mader, 2001). Eles funcionam puxando o líquido em alta pressão (100-2000 bar), por um pistão estreito (de escala nanométrica), o qual é acelerado em uma pequena distância a uma alta velocidade (acima de 1000 Km/h). Este fluido é, portanto, submetido a um grande estresse, onde forças de cavitação rompem as gotículas, gerando as nanogotículas (Mehnert, Mader, 2001).

Na obtenção das NLS, o homogeneizador de alta pressão pode ser alimentado com a dispersão de lipídeos e fármaco a quente ou a frio (Figura 6). No

processo a quente, uma pré-emulsão é obtida e passada no homogeneizador ainda quente para a obtenção de nanoemulsões. A nanoemulsão homogeneizada é posteriormente resfriada a temperatura ambiente dando origem as NLS. No processo a frio a dispersão do fármaco no lipídeo é inicialmente solidificada em nitrogênio líquido, moída, o pó disperso diluído com o auxílio de um tensoativo e só então submetido à homogeneização.

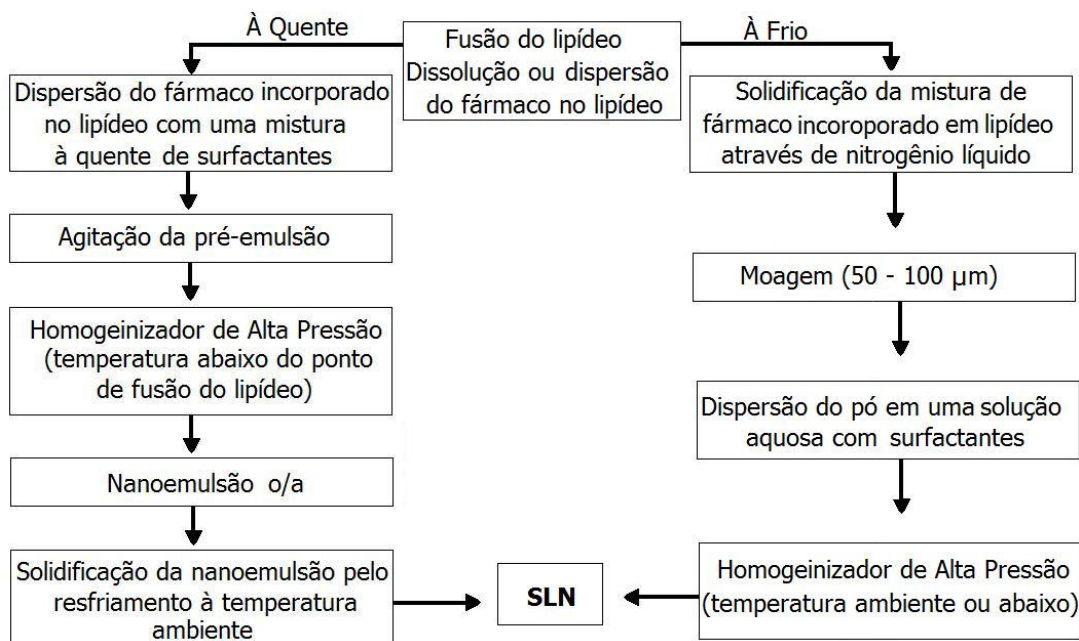


Figura 6: Esquema representativo do processo de obtenção de NLS a quente e a frio através do homogeneizador de alta pressão (adaptado de (Mehnert, Mader, 2001)).

A influência do tipo de homogeneizador, da pressão aplicada, do número de ciclos empregados e da temperatura no tamanho das partículas obtidas tem sido exaustivamente estudada. Independente da técnica utilizada é possível trabalhar com concentrações de lipídeo acima de 40% e, geralmente, a distribuição de tamanho das partículas obtidas fica numa faixa estreita (índice de polidispersividade menor que 0,2) (Wissing et al., 2004).

A técnica de obtenção de NLS a partir de microemulsões foi desenvolvida por Gasco e colaboradores e vem sendo modificada por inúmeros pesquisadores (Wissing et al., 2004; Wissing, Muller, 2003). De maneira geral, as NLS preparadas com a referida técnica são produzidas vertendo-se uma microemulsão óleo-em-água

(O/A) ainda quente em água gelada, seguido de forte agitação e retirada do excesso de água por liofilização ou ultracentrifugação (Wissing et al., 2004). A fase interna da microemulsão deve ser composta por lipídeos de baixo ponto de fusão. Sendo assim, quando a mesma entra em contato com a água gelada, as nanogotas lipídicas sofrem cristalização, formando as NLS (Marengo et al., 2000).

Destaca-se que são muitas as variáveis desta técnica que podem afetar as características das NLS obtidas. Os lipídeos utilizados para a obtenção da microemulsão, sua técnica de preparo (agitação, temperatura), a velocidade de adição da microemulsão na água gelada, assim como o volume de água, a velocidade de agitação e a técnica utilizada para a retirada do excesso de água são exemplos destas variáveis (Wissing et al., 2004). Sendo assim, algumas estratégias são utilizadas para se obter NLS de forma reprodutível e em larga escala utilizando-se esta técnica. Marengo et al. (2000), por exemplo, desenvolveram um equipamento (Figura 7) com capacidade para processar 100 mL de microemulsão e que produz, dependendo de algumas condições, NLS com tamanho inferior a 100 nm (Marengo et al., 2000).

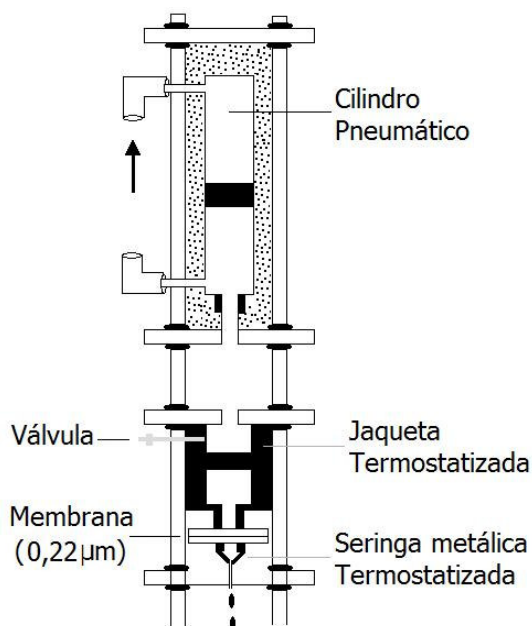


Figura 7: Representação esquemática do equipamento utilizado para obtenção de NLS a partir de microemulsões de maneira reprodutível e em larga escala (Marengo et al., 2000).

Como a técnica de obtenção de NLS a partir de microemulsões permite o estudo de um grande número de variáveis e de sua influência nas características do

sistema obtido, ela será utilizada, para o preparo das NLS de DOX que serão obtidas neste trabalho.

2.2.2 Métodos para caracterização de NLS

A caracterização das NLS engloba a determinação do tamanho e do potencial zeta da partícula, a avaliação morfológica, a determinação da quantidade de fármaco associado às partículas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo e da temperatura de armazenamento. O conjunto de informações obtidas por estes estudos são pré-requisitos importantes para o sucesso no desenvolvimento deste tipo de sistema de liberação.

➤ *Eficiência de Encapsulação*

A determinação da quantidade de fármaco associada as nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma boa técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação (Santos-Magalhaes et al., 2000), na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. A concentração total de fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas na suspensão com um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (Tiyaboonchai et al., 2001). Outra técnica muito empregada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana (100 kDa) é utilizada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre (Schaffazick et al., 2003).

➤ *Tamanho da partícula e potencial zeta*

A medida do tamanho de partícula e do potencial zeta é um ótimo indicador da estabilidade. Sendo assim, estas são medidas muito utilizadas para caracterizar nanopartículas em geral e predizer algumas características macroscópicas da formulação. No caso do tamanho das NLS, formulações adequadas devem possuir

baixa polidispersividade e tamanho médio menores que 1 μm . O tamanho das NLS é afetado por inúmeros parâmetros, como a composição da formulação (mistura de tensoativos, propriedades estruturais dos lipídeos e fármaco incorporado), métodos de produção e as condições estabelecidas para produção, como tempo de preparo, temperatura, liofilização, etc. Estes parâmetros são definidos no intuito de melhorar o tamanho das partículas e sua polidispersividade (Uner, 2006). Por exemplo, altas proporções de tensoativo / lipídeo favorecem a formação de partículas menores. A diminuição desta proporção significa aumento do tamanho das partículas principalmente durante o período de estocagem (Lippacher et al., 2002). Outro fator relevante que interfere diretamente no tamanho das partículas, é a temperatura escolhida durante o processo de obtenção de NLS por homogenizadores de alta pressão. Baixas temperaturas tendem a formação de partículas maiores, já que uma melhor homogeneização é obtida com temperaturas perto do ponto de fusão dos lipídeos. Uner (2006) observou que a utilização do homogenizador de alta pressão à quente permitiu a produção de partículas com tamanhos menores que 500 nm, enquanto que ao produzi-las à frio, foram obtidas partículas maiores e com alta polidispersividade.

Outro estudo de importância para a caracterização das partículas é o potencial zeta. Esta análise que permite a determinação da estabilidade e das interações que esta partícula possa ter com o fármaco. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Schaffazick et al., 2003). A medida do potencial zeta permite esclarecimentos sobre a estabilidade da formulação, principalmente durante o seu período de estocagem. Geralmente, a agregação entre as partículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas. Para garantir a estabilidade das NLS, acredita-se que o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30 mV (Freitas, Muller, 1998). Porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso não são estáveis (Muller et al., 1996).

A combinação da medida do potencial zeta com outras técnicas de caracterização resultam também em diferentes elucidções. Variando a proporção entre componentes de uma formulação é possível determinar qual destes

componentes está na superfície da partícula e qual é responsável pela carga superficial desta partícula (Mosqueira et al., 2000). Associados a estas medidas, os estudos de calorimetria diferencial exploratória, podem contribuir para determinar qual componente está sendo encapsulado de acordo com o desaparecimento do pico no termograma (Muller et al., 2001).

➤ *Morfologia da partícula*

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET permite também a distinção entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas (Hall et al., 2007). Outra técnica empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica, a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico (Schaffazick et al., 2003).

➤ *Estabilidade das formulações e perfil de liberação*

Um dos maiores problemas encontrados no desenvolvimento das NLS é a sua instabilidade por longos períodos de tempo. Muitos autores têm relatado a expulsão do fármaco durante o período de estocagem destas formulações, principalmente devido à composição das partículas e de seus processos de produção (Souto, Muller, 2008).

Desta forma, durante a produção das NLS a etapa de solidificação e cristalização dos lipídeos pode levar a imperfeições na matriz permitindo a acomodação das moléculas de fármaco entre as bicamadas lipídicas e as cadeias de ácidos graxos (Wissing, Muller, 2003; Muller et al., 2007). Esta cristalização ocorre principalmente com polímeros de maior energia (α, β'), e, conseqüentemente, mais instáveis. Sendo assim, durante a estocagem, estes lipídeos podem se reorganizar em formas de menor energia, mais estáveis e altamente organizadas (formas β), expulsando o fármaco que estava localizado nas imperfeições dos cristais (Figura 8) (Muller et al., 2002).

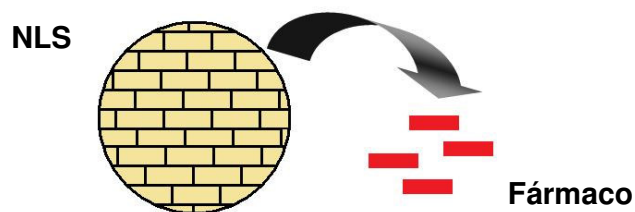


Figura 8: Representação esquemática da transição do lipídeo para um estado altamente organizado e expulsão do fármaco nele encapsulado (Muller et al., 2002).

A preservação do arranjo de lipídeos durante a estocagem até a administração das NLS leva a uma liberação controlada do fármaco encapsulado. No entanto, se a forma polimórfica β surgir no processo de armazenamento, e o fármaco for expulso da matriz lipídica, este não poderá ser protegido contra degradação, nem terá uma liberação controlada. Estes problemas podem inviabilizar o sistema de liberação já que controlar a velocidade de liberação é um fator primordial para atingir concentrações adequadas de fármaco no local desejado (Wissing et al., 2004).

Para contornar este fenômeno e aumentar a eficiência de encapsulação destas partículas, é necessária a utilização de lipídeos que não formem cristais altamente organizados (Attama et al., 2007). Para tanto, lipídeos formados por ácidos graxos de tamanho de cadeias variados, líquidos e sólidos, são misturados, formando pequenos reservatórios líquidos dentro da partícula, evitando a formação de cristais altamente organizados (Figura 9) (Muller et al., 2002; Wissing et al., 2004). As partículas produzidas por esta mistura de lipídeos sólidos e líquidos são denominadas de Carreadores Lipídicos Não-estruturados (Attama et al., 2007). Com estes sistemas é possível conseguir uma liberação controlada do fármaco, principalmente devido à dispersão heterogênea formada na matriz lipídica.

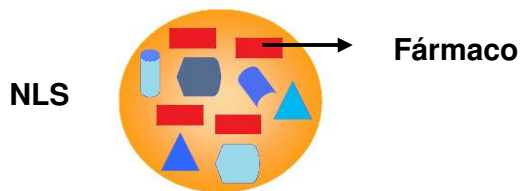


Figura 9: Representação esquemática de uma NLS contendo lipídeos sólidos e líquidos com cadeias carbônicas de tamanhos variados (cristais pouco organizados) (Muller et al., 2002).

Obviamente, fármacos com características lipofílicas são mais facilmente encapsulados nas nanopartículas lipídicas. Para aumentar a quantidade de fármaco hidrofílico dentro das NLS são produzidos outros tipos de carreadores lipídicos. A obtenção de conjugados insolúveis entre o lipídeo e o fármaco é uma estratégia que vem sendo utilizada com este fim. Estes conjugados, geralmente obtidos por uma ligação covalente, são solubilizados em solvente e depois evaporados sob baixa pressão (Cavalli et al., 1999), aumentando a eficiência de encapsulação do ativo hidrofílico (Hong et al., 2006). Estes carreadores são denominados Conjugados lipídicos de fármacos.

Fármacos hidrofílicos também são, na maioria das vezes, liberados mais rapidamente das NLS. Isso porque eles tendem a se particionar para a fase externa aquosa do sistema em formação. Quando a dispersão é resfriada, a fase lipídica precipita primeiro e o fármaco hidrofílico acaba precipitando na superfície da partícula, o que facilita sua liberação mais rápida do sistema (Figura 10) (Muller et al., 2000d). Entretanto, para as NLS obtidas pelo método da microemulsão (ME), se a velocidade e a forma de resfriamento da ME for controlada, a precipitação do fármaco pode ocorrer antes da recristalização do lipídeo. Isso significa que a concentração na região mais interna da NLS e, conseqüentemente, a diminuição da sua velocidade de liberação (Muller et al., 2000c).

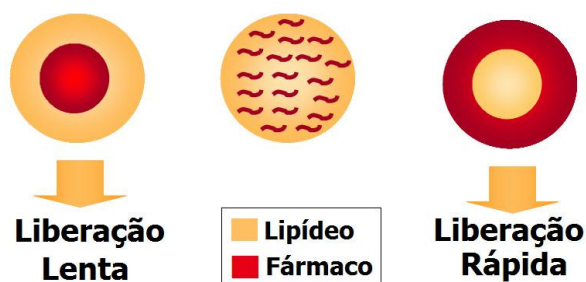


Figura 10: Representação esquemática da localização de um fármaco encapsulado nas NLS e sua influência na velocidade de liberação (Muller et al., 2000b).

2.3 Doxorubicina (DOX) – Penetração cutânea e estabilidade química da molécula

As antraciclina são muito utilizadas na oncologia sozinhas ou em conjunto com outros fármacos em regimes quimioterápicos. Dentre elas pode-se destacar a daunorrubicina, a doxorubicina (DOX) e mais recentemente a epirrubicina e idarrubicina (Taveira, 2007). Acredita-se que o efeito antitumoral das antraciclina se

deve principalmente a sua ação inibidora da topoisomerase II α , que impede a ligação das cadeias do DNA das células e, conseqüentemente, provoca a quebra do DNA e a morte celular (Tewey et al., 1984). Algumas variações podem ocorrer neste mecanismo, dependendo do derivado antracíclico. Como, por exemplo, a inibição das helicases, que são enzimas responsáveis por separar as fitas de DNA. As helicases estão diretamente relacionadas com a inibição das topoisomerases (Tewey et al., 1984). Algumas variações podem ocorrer neste mecanismo, dependendo do derivado antracíclico. Como, por exemplo, a inibição das helicases, que são enzimas responsáveis por separar as fitas de DNA. As helicases estão diretamente relacionadas com a inibição das topoisomerases (Tewey et al., 1984).

As antraciclina possuem um anel quinona, um anel aromático rígido e planar ligado por uma ligação glicosídica ao anel de um amino açúcar (Figura 11). Por causa dessa estrutura aromática complexa elas absorvem luz visível e ultravioleta, o que lhes confere cor vermelha - alaranjada. O grupo quinona é responsável tanto pelo efeito colateral cardiotoxíco quanto pela ação antitumoral desta molécula (Arcamone et al., 1997).

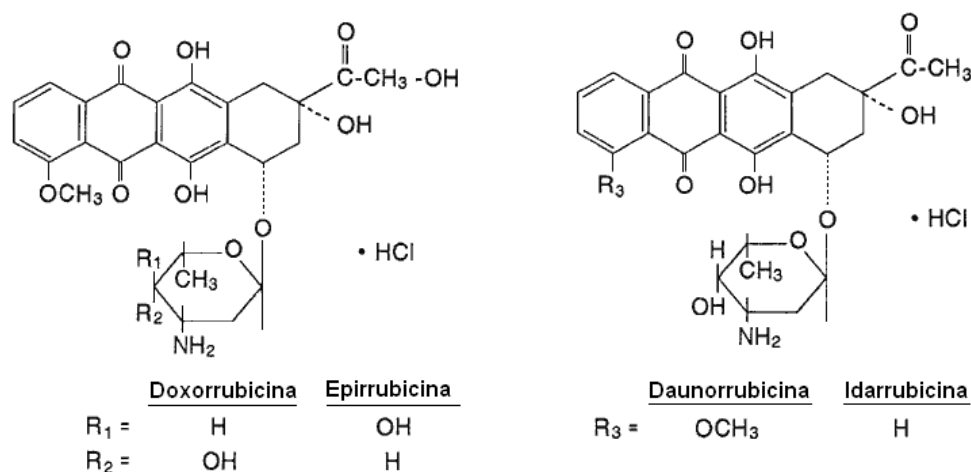


Figura 11: Estrutura química das antraciclina (doxorubicina, epirubicina, daunorubicina e idarubicina).

A DOX, descoberta em 1970, é um derivado hidroxilado da daunorubicina, e apresenta uma ação terapêutica maior (Doroshov et al., 2001). A DOX é comumente usada no tratamento de vários tipos de tumores, incluindo linfomas de Hodgkins e não- Hodgkins, mielomas múltiplos, sarcoma de ovário, pulmão, estômago e seio, além de cânceres no ovário e cervical (Israel et al., 2000), malignidades hematológicas (Dorr et al., 1980) e outros.

Uma característica relevante deste fármaco é a sua instabilidade à luz e a algumas soluções ou fluidos biológicos. Os principais fatores relacionados à sua degradação é a exposição à luz ultravioleta, e o alto pH da solução em que este fármaco está dissolvido, principalmente acima de 6,5 (Ramu et al., 2000; Maniez-Devos et al., 1986; Stiles, Allen, Jr., 1991). Existem inúmeros estudos investigando a fotodegradação da DOX quando esta é exposta a luz intensa ou a luz ambiente. Acredita-se que este mecanismo de fotodegradação ocorra pela formação de radicais livres (Carmichael, Riesz, 1985).

A DOX, quando administrada *in vivo*, sofre metabolização hepática de aproximadamente 22% da dose inicial administrada, levando a formação de diversos metabólitos hidroxilados, decorrente de reações redutoras enzimáticas e de deglicolização (Bandak et al., 1999). O primeiro metabólito produzido é o doxorubicinol. Este é produzido pela carbonil redutase, presente no citosol, através de um mecanismo de redução do carbono 13, dependente de NADPH. A redução do açúcar da daunosamina (carbono 7) produz a doxorubicinona e a doxorubicinolona (Figura 12) (Arnold et al., 2004).

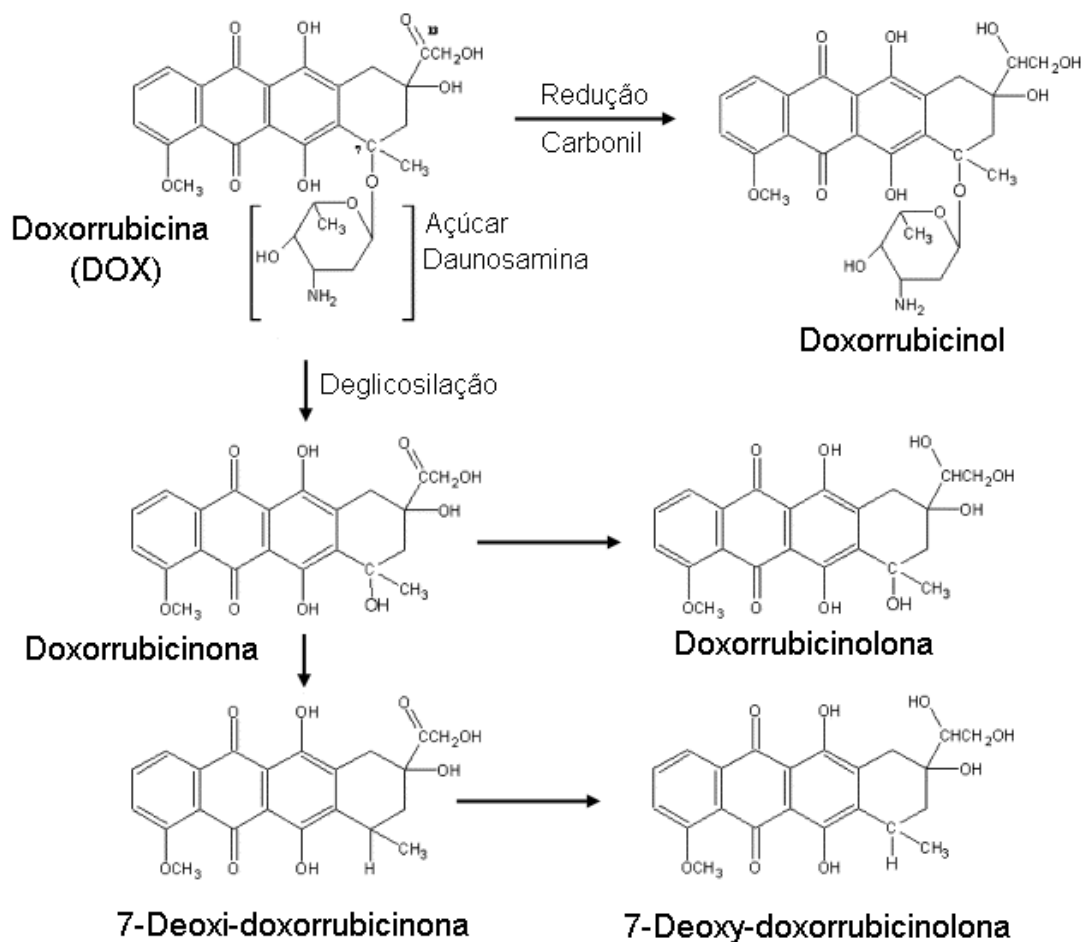


Figura 12: Estrutura química da DOX e seus principais metabólitos (doxorubicinol, doxorubicinona e doxorubicinolona) (Arnold et al., 2004).

Vale ressaltar que a ação biológica da DOX e de seus metabólitos ainda não foi completamente elucidada. O metabólito doxorubicinol é clinicamente importante, porém acredita-se que este seja menos eficiente que a DOX. Doxorubicinol e seus metabólitos similares podem promover a formação de radicais livres reativos que contribuem para cardiotoxicidade relacionada a administração da DOX. A sua degradação física e química leva aos mesmos metabólitos da degradação hepática (Arnold et al., 2004).

Desta forma, para minimizar os efeitos colaterais e evitar os diversos incômodos que a administração endovenosa deste fármaco provoca, uma alternativa para o tratamento do câncer de pele com a DOX é sua administração tópica através de sistemas de liberação adequados.

No entanto, o sucesso da aplicação tópica, direcionada, da DOX é limitado devido principalmente às características físico-químicas desta molécula. Sua grande massa molecular e seu coeficiente de partilha óleo/água ($K_{o/a}=1,27$) além da presença de carga elétrica na molécula em pH fisiológico ou ácido, dificultam a sua penetração na pele (Taveira et al., 2008b; Herai et al., 2007; Taveira, 2007). Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação carreadores de fármacos, como os sistemas micro e nanoparticulados, possibilitariam sua ação em local específico na pele. Além disso, os sistemas de liberação permitiriam o controle da velocidade de liberação do fármaco, assim como a proteção desta contra eventuais degradações, aumentando sua estabilidade e garantindo a eficácia das formulações dermatológicas (Paolino et al., 2004).

➤ *Aplicação da iontoforese para aumentar a permeabilidade de fármacos através da pele*

Além da utilização de sistemas de liberação de fármacos, métodos físicos também podem ser empregados concomitantemente para controlar e aumentar a penetração de fármacos na pele ou através dela. Um dos métodos físicos mais estudados e utilizados é a iontoforese.

O termo iontoforese refere-se à introdução de espécies iônicas dentro do corpo, pela aplicação de um potencial elétrico, para fins terapêuticos (Wascotte et al., 2007; Dixit et al., 2007; Lopez et al., 2001). O princípio iontoforético é baseado no princípio geral da eletricidade, de que cargas iguais se repelem e cargas opostas se atraem. Assim, para a penetração através da pele de uma substância carregada negativamente, esta é colocada em contato com o eletrodo negativo, onde, na presença de corrente elétrica ocorrerá eletrorrepulsão, e conseqüentemente, a sua penetração na pele (Gelfuso et al., 2008; Guy et al., 2001). O mesmo ocorre com íons carregados positivamente, colocados em contato com eletrodos positivos.

Outro mecanismo envolvendo o fenômeno iontoforético e o transporte das moléculas de fármaco é a eletromose. Esse fenômeno é causado pelo fluxo convectivo de solvente do ânodo para o cátodo. Isto porque, a pele possui ponto isoelétrico de aproximadamente 4 - 4,5 e, acima desta faixa de pH, os grupos carboxilatos associados a resíduos de aminoácidos presentes na membrana encontra-se ionizados negativamente (Merino et al., 1999; Pikal, 1992; Gratieri et al., 2008). Portanto, a pele se encontra carregada negativamente quando em contato

com uma solução com pH fisiológico, favorecendo o transporte de cátions e dificultando o de ânions. Desta forma, a aplicação de um campo elétrico através da pele, carregada negativamente em pH fisiológico, favorece o movimento de íons no sentido do ânodo para o cátodo, na tentativa de neutralizar as cargas desta membrana (Gratieri et al., 2008). Assim: (i) moléculas neutras podem ser liberadas por iontoforese através do ânodo (Lopez et al., 2001; Lopez et al., 2003a; Lopez et al., 2003b) e (ii) os cátions se beneficiam desta segunda força, adicional à eletrorrepulsão, quando administrados no ânodo (Cullander, Guy, 1991). Vários autores demonstraram que o número de transporte do Na^+ através da pele humana *in vitro*, em pH 7,4, é quase o dobro do número de transporte do Cl^- (Gratieri et al., 2008).

As vantagens da iontoforese incluem (a) aumento significativo na permeação transdérmica, especialmente para substâncias polares; (b) controle preciso da quantidade de fármaco permeada, tanto que diferentes perfis de liberação podem ser monitorados, atendendo assim a necessidades específicas de cada paciente; (c) processo não invasivo e considerado seguro (Mudry et al., 2006b; Mudry et al., 2006a), sem riscos de infecções ou danos, além de ser uma importante alternativa para a administração endovenosa (Singh, Bhatia, 1996).

Na verdade, tumores sólidos previamente injetados com agentes antineoplásicos já vem sendo tratados com aplicação de corrente elétrica. A intensidade desta corrente, no entanto, é muitíssimo mais alta do que aquela utilizada na iontoforese. Esta técnica é denominada eletroquimioterapia (Hyacinthe et al., 1999). Enquanto na iontoforese a corrente elétrica aplicada gera uma voltagem de aproximadamente 2 V/cm, na eletroquimioterapia o campo elétrico pulsátil aplicado diretamente no tumor é de 800 a 1300 V/cm (Gothelf et al., 2003). Este alto campo elétrico aumenta temporariamente a permeabilidade das células tumorais e, conseqüentemente, a entrada do antineoplásico nas células. Moléculas maiores que 30.000 Da, que normalmente não atravessariam a membrana celular, conseguem entrar nas células permeabilizadas facilmente por difusão.

Apesar da eletroquimioterapia permitir a permeabilização da membrana facilitando a entrada de fármacos, este método possui algumas desvantagens. A principal delas está relacionada aos danos celulares irreversíveis que ela causa nas células saudáveis. Como os pulsos são de grande intensidade e comprimento, alguns poros formados na membrana plasmática podem ser muito grandes e serem

incapazes de se fechar após a aplicação da corrente, causando a ruptura e morte da célula (Weaver, 1995).

Sendo assim, uma solução para aumentar a permeabilização das células tumorais poderia ser a aplicação de uma corrente elétrica fraca, como a iontoforese. Sabe-se que a iontoforese aumenta a penetração de fármacos através de membranas intactas, como a pele, sem alterá-las irreversivelmente (Lopez et al., 2004, Gelfuso et al., 2008).

De fato, estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (Taveira, 2007) demonstraram que a iontoforese aumenta significativamente a penetração cutânea da DOX. Além disso, verificou-se que a aplicação desta corrente elétrica permeabiliza não só o estrato córneo (EC) como também a membrana das células tumorais, facilitando a penetração da DOX nestas células. Apesar deste aumento na penetração, observou-se em experimentos anteriores uma alta degradação da DOX na pele (Herai et al., 2007). Sendo assim, no presente trabalho pretende-se encapsular a DOX em NLS, na tentativa de protegê-la contra eventuais degradações, além da aplicação da iontoforese, a fim de direcionar altas concentrações de DOX para a epiderme viável, onde está presente a maioria dos tumores cutâneos.

3 OBJETIVO

O objetivo deste projeto é preparar e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo o antineoplásico doxorrubicina (DOX). A absorção cutânea passiva e iontoforética, *in vitro* e *in vivo*, deste antineoplásico a partir das NLS desenvolvidas também será estudada.

3.1 Objetivos específicos

- Padronizar e validar uma metodologia analítica para quantificação da DOX nas NLS por espectrofotometria no UV/Vis e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Obter nanopartículas lipídicas sólidas negativas e positivas contendo DOX;
- Caracterizar as NLS obtidas quanto ao tamanho, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e rendimento;
- Avaliar a interação do fármaco com as NLS negativas desenvolvidas através dos estudos de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC);
- Avaliar a estabilidade da DOX em diferentes soluções e nas NLS desenvolvidas em diferentes temperaturas;
- Avaliar *in vitro* a liberação da DOX a partir das NLS;
- Avaliar *in vitro* a permeação cutânea passiva da DOX a partir das NLS;
- Avaliar *in vitro* a permeação iontoforética da DOX a partir das NLS;
- Estudar a influência da eletrorrepulsão e eletrosmose na permeação iontoforética da DOX a partir das NLS;

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das NLS em nas células tumorais B16F10 (melanoma) e A431 (carcinoma de células espinhosas);

- Avaliar, *in vitro* a localização da DOX encapsulada nas NLS nas células tumorais de melanoma e de carcinoma de células espinhosas;

- Avaliar a influência da iontoforese na citotoxicidade *in vitro* das NLS contendo DOX em cultura de células tumorais (B16F10);

- Avaliar a indução de células tumorais B16F10 (melanoma) e A431 (carcinoma de células espinhosas) *in vivo* em camundongos sem pêlo;

- Avaliar a viabilidade do tratamento iontoforético *in vivo* em camundongos sem pêlo.

4 Conclusão

- Ambos os métodos propostos para a quantificação da DOX mostraram-se adequados, apresentando valores satisfatórios de linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão.
- As NLS obtidas apresentaram tamanho de partícula satisfatório. E o método de liofilização permitiu a sua reconstituição em suspensões com baixo Pdl.
- Os estudos de morfologia das NLS mostraram que estas possuem formas anisométricas.
- Estudos de estabilidade demonstraram que a DOX é estável nas suspensões de NLS por até 48h a 4º C e por pelo menos 30 dias quando liofilizadas.
- Estudos *in vitro* de liberação evidenciaram uma liberação sustentada da DOX das NLS, sendo que observou-se que a DOX liberou das partículas liofilizadas mais rapidamente do que das partículas em suspensão.
- Estudos *in vitro* de permeação cutânea demonstraram que as NLS desenvolvidas aumentam significativamente a permeação e a retenção da DOX na pele. A aplicação da iontoforese aumenta cinco vezes a quantidade de DOX encontrada no receptor. Estudos do fluxo eletrosmótico demonstram que a DOX penetra na pele principalmente devido a este mecanismo.
- Nos estudos de citotoxicidade da DOX em diferentes formulações, constatou-se que a DOX possui citotoxicidade maior quando em NLS-N liofilizadas, corroborando com os estudos de localização celular.
- A aplicação de corrente elétrica aumentou a permeabilização da membrana celular, e conseqüentemente, sua citotoxicidade.

- Não foi possível a indução tumoral em camundongos sem pêlo, provavelmente devido à resposta imune destes animais.

- A aplicação de corrente elétrica *in vivo* mostrou-se viável, permitindo a montagem adequada do circuito elétrico para o tratamento de tumores cutâneos em camundongos.

7 Referências Bibliográficas

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S., FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.58, n.15, p.1688-1713, 2006.

ARCAMONE, F. Clinically useful doxorubicin analogues. **Cancer Treat. Rev.**, v.14, n.3-4, p.159-161, 1987.

ARCAMONE, F., ANIMATI, F., BERETTONI, M., BIGIONI, M., CAPRANICO, G., CASAZZA, A. M., CASERINI, C., CIPOLLONE, A., DE CESARE, M., FRANCIOTTI, M., LOMBARDI, P., MADAMI, A., MANZINI, S., MONTEAGUDO, E., POLIZZI, D., PRATESI, G., RIGHETTI, S. C., SALVATORE, C., SUPINO, R., ZUNINO, F. Doxorubicin disaccharide analogue: apoptosis-related improvement of efficacy in vivo. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.16, p.1217-1223, 1997.

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

ARNOLD, R. D., SLACK, J. E., STRAUBINGER, R. M. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.808, n.2, p.141-152, 2004.

ASSEFA, Z., VAN LAETHEM, A., GARMYN, M., AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1755, n.2, p.90-106, 25-7-2005.

ATTAMA, A. A., SCHICKE, B. C., PAEPENMULLER, T., MULLER-GOYMANN, C. C. Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.67, n.1, p.48-57, 2007.

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

BATISTA, U., MIKLAVCIC, D., SERSA, G. Low-Level Direct-Current - Cell-Culture Fibroblast Model. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.35, n.1-2, p.99-101, 1994.

BERGH, M., MAGNUSSON, K., NILSSON, J. L., KARLBERG, A. T. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. **Contact Dermatitis**, v.37, n.1, p.9-18, 1997.

BURKE, T. G., TRITTON, T. R. Location and dynamics of anthracyclines bound to unilamellar phosphatidylcholine vesicles. **Biochemistry**, v.24, n.21, p.5972-5980, 1985a.

BURKE, T. G., TRITTON, T. R. Structural basis of anthracycline selectivity for unilamellar phosphatidylcholine vesicles: an equilibrium binding study. **Biochemistry**, v.24, n.7, p.1768-1776, 1985b.

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

CASADEI, M. A., CERRETO, F., CESA, S., GIANNUZZO, M., FEENEY, M., MARIANECCI, C., PAOLICELLI, P. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: a new drug delivery system for oral formulations. **Int. J. Pharm.**, v.325, n.1-2, p.140-146, 2006.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.**, v.689, n.1, p.175-180, 7-2-1997.

CAVALLI, R., PEIRA, E., CAPUTO, O., GASCO, M. R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with beta-cyclodextrins. **Int. J. Pharm.**, v.182, n.1, p.59-69, 1999.

CHOI, M. J., BIANCON, S., ANDRIEU, J., MIN, S. G., FESSI, H. Effect of freeze-drying process conditions on the stability of nanoparticles. **Drying Technology**, v.22, n.1-2, p.335-346, 2004.

CONSTANTINIDES, P. P., CHAUBAL, M. V., SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.60, n.6, p.757-767, 2008.

CORTESI, R., ESPOSITO, E., LUCA, G., NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomaterials**, v.23, n.11, p.2283-2294, 2002.

CULLANDER, C., GUY, R. H. Sites of iontophoretic current flow into the skin: identification and characterization with the vibrating probe electrode. **J. Invest Dermatol.**, v.97, n.1, p.55-64, 1991.

DINGLER, A., BLUM, R. P., NIEHUS, H., MULLER, R. H., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **J. Microencapsul.**, v.16, n.6, p.751-767, 1999.

DIXIT, N., BALI, V., BABOOTA, S., AHUJA, A., ALI, J. Iontophoresis - an approach for controlled drug delivery: a review. **Curr. Drug Deliv.**, v.4, n.1, p.1-10, 2007.

DOROSHOW, J. H., SYNOLD, T. W., SOMLO, G., AKMAN, S. A., GAJEWSKI, E. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. **Blood**, v.97, n.9, p.2839-2845, 2001.

DORR, R. T., ALBERTS, D. S., CHEN, H. S. Experimental model of doxorubicin extravasation in the mouse. **J. Pharmacol. Methods**, v.4, n.3, p.237-250, 1980.

FERRY, L. L., ARGENTIERI, G., LOCHNER, D. H. The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. **Pharm. Acta Helv.**, v.70, n.1, p.43-56, 1995.

FREITAS, C., MULLER, R. H. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN TM). **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.46, n.2, p.145-151, 1998.

GABER, M. H., GHANNAM, M. M., ALI, S. A., KHALIL, W. A. Interaction of Doxorubicin with phospholipid monolayer and liposomes. **Biophys. Chem.**, v.70, n.3, p.223-229, 1998.

GELFUSO, G. M., FIGUEIREDO, F. V., GRATIERI, T., LOPEZ, R. F. The effects of pH and ionic strength on topical delivery of a negatively charged porphyrin (TPPS4). **J. Pharm. Sci.**, v.97, n.10, p.4249-4257, 2008.

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

GOTHELF, A., MIR, L. M., GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treat. Rev.**, v.29, n.5, p.371-387, 2003.

GRATIERI, T., GELFUSO, G. M., LOPEZ, R. F. V. Basic principles and applications of iontophoresis for cutaneous penetration of drugs. **Quimica Nova**, v.31, n.6, p.1490-1498, 2008.

GUY, R. H., DELGADO-CHARRO, M. B., KALIA, Y. N. Iontophoretic transport across the skin. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol**, v.14, n.1, p.35-40, 2001.

HALL, S. S., MITRAGOTRI, S., DAUGHERTY, P. S. Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes. **Biotechnol. Prog.**, v.23, n.3, p.749-754, 2007.

HEIATI, H., TAWASHI, R., PHILLIPS, N. C. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. **J. Microencapsul.**, v.15, n.2, p.173-184, 1998.

HERAI, H., GRATIERI, T., THOMAZINE, J. A., BENTLEY, M. V., LOPEZ, R. F. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int. J. Pharm.**, v.329, n.1-2, p.88-93, 2007.

HONG, Y., HU, F. Q., YUAN, H. Effect of PEG2000 on drug delivery characterization from solid lipid nanoparticles. **Pharmazie**, v.61, n.4, p.312-315, 2006.

HYACINTHE, M., JAROSZESKI, M. J., DANG, V. V., COPPOLA, D., KARL, R. C., GILBERT, R. A., HELLER, R. Electrically enhanced drug delivery for the treatment of soft tissue sarcoma. **Cancer**, v.85, n.2, p.409-417, 1999.

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

KOGA, M., KAI, H., EGAMI, K., MUROHARA, T., IKEDA, A., YASUOKA, S., EGASHIRA, K., MATSUIISHI, T., KAI, M., KATAOKA, Y., KUWANO, M., IMAIZUMI, T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.365, n.2, p.279-284, 2008.

KONAN-KOUAKOU, Y. N., BOCH, R., GURNY, R., ALLEMANN, E. In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles. **J. Control Release**, v.103, n.1, p.83-91, 2005.

LIPPACHER, A., MULLER, R. H., MADER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles

5. **Int. J. Pharm.**, v.214, n.1-2, p.9-12, 19-2-2001.

LIPPACHER, A., MULLER, R. H., MADER, K. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.53, n.2, p.155-160, 2002.

LOPEZ, R. F., BENTLEY, M. V., BEGONA DELGADO-CHARRO, M., GUY, R. H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **J. Control Release**, v.88, n.1, p.65-70, 2003a.

LOPEZ, R. F., BENTLEY, M. V., DELGADO-CHARRO, M. B., GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharm. Res.**, v.18, n.3, p.311-315, 2001.

LOPEZ, R. F., BENTLEY, M. V., DELGADO-CHARRO, M. B., SALOMON, D., VAN DEN, B. H., LANGE, N., GUY, R. H. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis in vitro. **Photochem. Photobiol.**, v.77, n.3, p.304-308, 2003b.

MAIA, C. S., MEHNERT, W., SCHAFFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **Int. J. Pharm.**, v.196, n.2, p.165-167, 2000.

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

MANIEZ-DEVOS, D. M., BAURAIN, R., LESNE, M., TROUET, A. Degradation of doxorubicin and daunorubicin in human and rabbit biological fluids. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.4, n.3, p.353-365, 1986.

MARENGO, E., CAVALLI, R., CAPUTO, O., RODRIGUEZ, L., GASCO, M. R. Scale-up of the preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. **Int. J. Pharm.**, v.205, n.1-2, p.3-13, 2000.

MEHNERT, W., MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.47, n.2-3, p.165-196, 2001.

MERINO, V., LOPEZ, A., KALIA, Y. N., GUY, R. H. Electrorepulsion versus electroosmosis: effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. **Pharm. Res.**, v.16, n.5, p.758-761, 1999.

MINOTTI, G., RONCHI, R., SALVATORELLI, E., MENNA, P., CAIRO, G. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. **Cancer Res.**, v.61, n.23, p.8422-8428, 2001.

MOLAVI, O., MA, Z., MAHMUD, A., ALSHAMSAN, A., SAMUEL, J., LAI, R., KWON, G. S., LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of STAT3 inhibitor cucurbitacins in solid tumors. **Int. J. Pharm.**, v.347, n.1-2, p.118-127, 2008.

MOORE, D. J., POWIS, G., RICHARDSON, R. L., PITTELKOW, M. R. Topical chemotherapy of intradermal Walker 256 carcinosarcoma with diaziquone and doxorubicin in the rat. **Cancer Res.**, v.45, n.11 Pt 1, p.5466-5472, 1985.

MOSER, K., KRIWET, K., FROELICH, C., NAIK, A., KALIA, Y. N., GUY, R. H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. **J. Pharm. Sci.**, v.90, n.5, p.607-616, 2001.

MOSQUEIRA, V. C., LEGRAND, P., PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F., BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.**, v.89, n.5, p.614-626, 2000.

MUCHOW, M., MAINCENT, P., MULLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, n.12, p.1394-1405, 2008.

MUDRY, B., GUY, R. H., DELGADO-CHARRO, M. B. Electromigration of ions across the skin: determination and prediction of transport numbers. **J. Pharm. Sci.**, v.95, n.3, p.561-569, 2006a.

MUDRY, B., GUY, R. H., DELGADO-CHARRO, M. B. Transport numbers in transdermal iontophoresis. **Biophys. J.**, v.90, n.8, p.2822-2830, 2006b.

MULLER, C. R., SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DE LUCCA, F. L., PESCE, d. S., DALLA, C. T., GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v.56, n.11, p.864-867, 2001.

MULLER, R. H., MAASSEN, S., WEYHERS, H., MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. **J. Drug Target**, v.4, n.3, p.161-170, 1996.

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000a.

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art
1. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000b.

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art
1. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000c.

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art

1. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000d.

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art

1. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000e.

MULLER, R. H., RADTKE, M., WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.

Adv. Drug Deliv. Rev., v.54 Suppl 1, p.S131-S155, 2002.

MULLER, R. H., RUNGE, S. A., RAVELLI, V., THUNEMANN, A. F., MEHNERT, W., SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN((R))) : Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2007.

NICOLI, S., SANTI, P., COUVREUR, P., COUARRAZE, G., COLOMBO, P., FATTAL, E. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. **Int. J. Pharm.**, v.214, n.1-2, p.31-35, 2001.

OLBRICH, C., BAKOWSKY, U., LEHR, C. M., MULLER, R. H., KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **J. Control Release**, v.77, n.3, p.345-355, 13-12-2001.

PAOLINO, D., IANNONE, M., CARDILE, V., RENIS, M., PUGLISI, G., ROTIROTI, D., FRESTA, M. Tolerability and improved protective action of idebenone-loaded pegylated liposomes on ethanol-induced injury in primary cortical astrocytes. **J. Pharm. Sci.**, v.93, n.7, p.1815-1827, 2004.

PIKAL, M. J. The Role of Electroosmotic Flow in Transdermal Iontophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.9, n.2-3, p.201-237, 1992.

POPLE, P. V., SINGH, K. K. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. **AAPS. PharmSciTech.**, v.7, n.4, p.91-2006.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.3, n.9, p.785-796, 2004.

RAMU, A., MEHTA, M. M., LIU, J., TURYSAN, I., ALEKSIC, A. The riboflavin-mediated photooxidation of doxorubicin. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.46, n.6, p.449-458, 2000.

SANTOS-MAGALHAES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V. M., CAETANO, M. N. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v.208, n.1-2, p.71-80, 2000.

SAUPE, A., WISSING, S. A., LENK, A., SCHMIDT, C., MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -- structural investigations on two different carrier systems. **Biomed. Mater. Eng**, v.15, n.5, p.393-402, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.56, n.3, p.501-505, 2003.

SCHUETZ, Y. B., NAIK, A., GUY, R. H., VUARIDEL, E., KALIA, Y. N. Transdermal iontophoretic delivery of triptorelin in vitro. **J. Pharm. Sci.**, v.94, n.10, p.2175-2182, 2005.

SINGH, J., BHATIA, K. S. Topical iontophoretic drug delivery: pathways, principles, factors, and skin irritation. **Med. Res. Rev.**, v.16, n.3, p.285-296, 1996.

SOUTO, E. B., MULLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.30, n.3, p.157-165, 2008.

STILES, M. L., ALLEN, L. V., Jr. Stability of doxorubicin hydrochloride in portable pump reservoirs. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v.48, n.9, p.1976-1977, 1991.

STRAM, D. O., MATTHAY, K. K., O'LEARY, M., REYNOLDS, C. P., HAASE, G. M., ATKINSON, J. B., BRODEUR, G. M., SEEGER, R. C. Consolidation chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation versus continued chemotherapy for metastatic neuroblastoma: a report of two concurrent Children's Cancer Group studies. **J. Clin. Oncol.**, v.14, n.9, p.2417-2426, 1996.

TAVEIRA, S. F. Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais. 2007.

TAVEIRA, S. F., NOMIZO, A., LOPEZ, R. F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J. Control Release**, 12-11-2008b.

TAVEIRA, S. F., NOMIZO, A., LOPEZ, R. F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J. Control Release**, 12-11-2008a.

TAVEIRA, S. F., NOMIZO, A., LOPEZ, R. F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J. Control Release**, v.134, n.1, p.35-40, 2009.

TEERANACHAIDEEKUL, V., JUNYAPRASERT, V. B., SOUTO, E. B., MULLER, R. H. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. **Int. J. Pharm.**, v.354, n.1-2, p.227-234, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V., MULLER, R. H., JUNYAPRASERT, V. B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)--effects of formulation parameters on physicochemical stability. **Int. J. Pharm.**, v.340, n.1-2, p.198-206, 2007.

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

TIYABOONCHAI, W., WOISZWILLO, J., MIDDAUGH, C. R. Formulation and characterization of amphotericin B-polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles. **J. Pharm. Sci.**, v.90, n.7, p.902-914, 2001.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v.61, n.5, p.375-386, 2006.

WASCOTTE, V., DELGADO-CHARRO, M. B., ROZET, E., WALLEMACQ, P., HUBERT, P., GUY, R. H., PREAT, V. Monitoring of urea and potassium by reverse iontophoresis in vitro. **Pharm. Res.**, v.24, n.6, p.1131-1137, 2007.

WEAVER, J. C. Electroporation theory. Concepts and mechanisms. **Methods Mol. Biol.**, v.47, p.1-26, 1995.

WELSS, T., BASKETTER, D. A., SCHRODER, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol. In Vitro**, v.18, n.3, p.231-243, 2004.

WESTESEN, K., WEHLER, T. Investigation of the particle size distribution of a model intravenous emulsion. **J. Pharm. Sci.**, v.82, n.12, p.1237-1244, 1993.

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

WISSING, S. A., MULLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **Int. J. Pharm.**, v.254, n.1, p.65-68, 2003.

WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., LI, Y., WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.6, p.491-504, 2007.

WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., WU, X. Y. Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. **J. Pharm. Sci.**, v.93, n.8, p.1993-2008, 2004.

ZAGONEL, V., FRATINO, L., SACCO, C., BABARE, R., SPAZZAPAN, S., GATTEI, V., IMPROTA, S., PINTO, A. Reducing chemotherapy-associated toxicity in elderly cancer patients. **Cancer Treat. Rev.**, v.22, n.3, p.223-244, 1996.

ZHOU, Q., CHOWBAY, B. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.30, n.4, p.1063-1074, 2002.