# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da penetração cutânea iontoforética da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) e estudos de citotoxicidade em cultura de células tumorais

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

> Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientado: Joel Gonçalves de Souza

Orientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez

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

# FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Joel Gonçalves de.

Avaliação da penetração cutânea iontoforética da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) e estudos de citotoxicidade em cultura de células tumorais / Joel Gonçalves de Souza; orientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez.-- Ribeirão Preto, 2011.

95 f.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Ftalocianina. 2. Iontoforese. 3. Terapia fotodinâmica tópica.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Joel Gonçalves de Souza

Título do trabalho: Avaliação da penetração cutânea iontoforética da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) e estudos de citotoxicidade em cultura de células tumorais

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovado em:

#### Banca Examinadora

| Prof. Dr     |              |
|--------------|--------------|
| Instituição: | _Assinatura: |
|              |              |
| Prof. Dr.    |              |
| Instituição: | Assinatura:  |
| nionaujao    | _กรรมเลเนเล  |

| Prof. Dr     |             |  |
|--------------|-------------|--|
|              |             |  |
| Instituição: | Assinatura: |  |

# DEDICATÓRIA

A DEUS, pela constante presença em todas as jornadas de minha vida.

Aos meus pais José e Maria pelo constante estímulo, incentivo e apoio na realização de meus sonhos e por acreditarem em meu potencial.

Aos meus irmãos Andréia, Aline e Júnior, e aos meus cunhados Claudinei e Benedito, pelo constante apoio e incentivo ao longo de minha vida.

À minha namorada Andréia, por estar sempre presente e por todos os momentos passados juntos, incentivando-me a cada passo dado.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Fonseca Vianna Lopez pelo companheirismo e pelo empenho em sua profissão, fazendo com que seus alunos sejam capazes de descobrir a verdadeira vocação pela ciência.

### AGRADECIMENTOS

Aos colegas de laboratório Danielle, Luciana, Stephânia, Franciane, Deise, Paola, Patrícia, Guilherme e Taís pelas inúmeras experiências e ensinamentos compartilhados e pelo apoio ao longo de meu mestrado.

Às Prof<sup>as</sup> Yara Maria Lucisano Valim e Cristiane Masetto de Gaitani, e a todos os membros de seus respectivos laboratórios, por terem me orientado como aluno de iniciação científica, tendo fundamental importância no desenvolvimento de minha vida científica.

Aos colegas de república André, Alexandre Kanashiro, Daniel, Denis, Gerson, Luis e Matheus, pelo harmonioso convívio em nossa república. De uma forma especial ao meu grande amigo Alexandre Kanashiro, por sempre me incentivar e ensinar a fazer pesquisa, e acreditar em meus ideais.

A Patrícia, Henrique e José Orestes, técnicos dos Laboratórios de Tecnologia Farmacêutica, por todo apoio e dedicação durante esta etapa. Em especial à Patrícia, pelo empenho e dedicação durante a realização dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dra Maria José Vieira Fonseca e a todos os membros do laboratório de Controle de Qualidade, por emprestar a infra-estrutura de seu laboratório, permitindo a realização dos estudos em cultura de células.

À Prof<sup>a</sup> Dra Maria José Vieira Fonseca, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e às demais funcionárias Ana Lúcia, Eleni, Rosana e Rossana por todo suporte oferecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. 2008/01962-2) e ao CNPq (Proc. 565361/2008-3) pelo suporte financeiro concedido a este projeto.

#### RESUMO

SOUZA, J.G. Avaliação da penetração cutânea iontoforética da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) e estudos de citotoxicidade em cultura de células tumorais. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica inovadora para o tratamento de tumores cutâneos. As ftalocianinas têm sido utilizadas como fotossensibilizantes sistêmicos devido à sua alta afinidade ao tecido tumoral e seu efeito acentuado quando irradiadas com luz. No entanto, a lipossolubilidade e o baixo coeficiente de partilha óleo/água dessas substâncias dificultam sua aplicação tópica, levando ao desenvolvimento de derivados carregados, como a zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) na tentativa de aumentar sua solubilidade em água, bem como melhorar sua captação pelas células tumorais. Entretanto, moléculas carregadas têm dificuldades em atravessar o estrato córneo (EC), a principal barreira da pele. Como a iontoforese é uma técnica não-invasiva capaz de aumentar e controlar a penetração de moléculas carregadas na pele, ela parece ser uma alternativa para aumentar a penetração cutânea da ZnPcS<sub>4</sub> nas camadas da pele onde os tumores estão presentes. Dessa forma, foram realizados experimentos in vitro de iontoforese de um gel hidrofílico da ZnPcS<sub>4</sub> aplicado topicamente na presenca e ausência de NaCl. Estudos de iontoforese in vivo também foram realizados, empregando ratos Wistar como modelo animal, bem como experimentos em cultura de células tumorais para avaliar a citotoxicidade do fármaco em estudo. O método analítico para quantificação do fármaco na pele foi validado quanto à linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade. A iontoforese catódica promoveu um aumento significativo da retenção da ZnPcS<sub>4</sub> tanto no EC como na epiderme viável nos experimentos realizados na presença e ausência de NaCI em relação à aplicação passiva da formulação e de iontoforese anódica, sendo que ocorreu um aumento da guantidade do fármaco retido nas diferentes camadas da pele quando o sal foi retirado da formulação. Os estudos in vivo com a formulação também mostraram que a corrente elétrica aumentou a penetração do fármaco para as camadas mais profundas da pele em relação aos experimentos passivos de permeação, o que foi evidenciado pela intensidade de fluorescência do fármaco visualizada por microscopia confocal e pela quantidade de fármaco retido nas diferentes camadas da pele. Resultados em cultura de células tumorais A431 sugerem que a concentração de fármaco que chega à epiderme viável após experimentos de iontoforese catódica é capaz de matar mais de 90% dessas células tumorais guando a dose de irradiação de 5 J/cm<sup>2</sup> é aplicada. Além disso, guando a corrente elétrica é aplicada em cultura celular, não foi observado nenhum aumento significativo da citotoxicidade da ZnPcS<sub>4</sub>, demonstrando que a aplicação de corrente elétrica não fez com que a entrada do fármaco para o interior das células tumorais aumentasse. Não restam dúvidas, no entanto, que a corrente elétrica aumentou a penetração do fármaco nas camadas profundas da pele, além de levar a uma distribuição homogênea da ZnPcS<sub>4</sub> nessas camadas após 15 minutos de aplicação.

**Palavras-chave**: ftalocianina, iontoforese, terapia fotodinâmica tópica.

#### ABSTRACT

SOUZA, J.G. Evaluation of zinc phthalocyanine tetrasulfonated (ZnPcS<sub>4</sub>) iontophoretic skin penetration and citotoxicity studies in culture of tumor cells. 2011. 95f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Photodynamic therapy (PDT) is an innovative therapeutic modality for the treatment of cutaneous tumors. The phthalocyanines have been used as systemic photosensitizing agents due to its high affinity to tumor tissues and its accentuated effect when irradiated with light. However, the lipophilicity and the low partition coefficient oil/water of these substances difficult its topical application, leading to the development of charged derivatives, such as the zinc phthalocyanine tetrasulfonated  $(ZnPcS_4)$  in an attempt to increase the water solubility, as well as improve the drug uptake by tumor cells. However, charged molecules have difficulties to cross the stratum corneum (SC), the main barrier of the skin. As iontophoresis is a noninvasive technique able to improve and control the penetration of charged molecules through the skin, it seems to be an alternative for enhancing ZnPcS<sub>4</sub> penetration into the deep layers of the skin, where cutaneous tumors reside. This way, in vitro iontophoresis experiments of a hydrophilic gel containing ZnPcS<sub>4</sub> applied topically in the presence and absence of NaCl were performed. In vivo iontophoresis studies were also carried out employing Wistar rats as animal model, as well as experiments in culture of tumour cells to evaluate the cytotoxicity of the drug. The analytical method for the quantification of the drug in the skin was validated considering the parameters of linearity, precision, accuracy, sensitivity and selectivity. The cathodal iontophoresis promoted a significant increase in retention of ZnPcS<sub>4</sub> in both SC and viable epidermis in the experiments conducted in the presence and absence of NaCl in relation to the formulation applied passively or by anodal iontophoresis. Therefore, there was an increase in the amount of the drug retained in different layers of the skin when salt was removed from the formulation in the cathodal iontophoresis. In vivo studies also demonstrated that the electrical current increased penetration of the drug to the deeper layers of the skin in relation to passive experiments, evidenced by the fluorescence intensity of the drug showed by confocal microscopy and by the amount of drug retained in the different layers of the skin. Results with A431 tumor cells suggest that the concentration of the drug that reaches the viable epidermis after cathodal iontophoresis is able to kill more than 90% of these tumor cells when the radiation dose of 5 J/cm<sup>2</sup> was applied. In addition, when the electric current was applied to the cells, it was not observed any significant increase of cytotoxicity, demonstrating that the electric current application did not increased the uptake of the ZnPcS<sub>4</sub> by the tumor cells. There are no doubts, however, that the electric current increased the ZnPcS<sub>4</sub> penetration to the deep layers of the skin and lead to a homogeneous distribution of ZnPcS<sub>4</sub> in these layers after 15 minutes of application.

**Keywords**: phthalocyanine, iontophoresis, topical photodynamic therapy.

# **LISTA DE FIGURAS**

| Figura 1.  | Carcinoma basocelular sobre a testa (WONG; STRANGE; LEAR, 2003)   |
|------------|---|
| Figura 2.  | Câncer de pele tipo espinocelular (JERANT, 2000)6   |
| Figura 3.  | Estrutura química da ZnPcS₄11   |
| Figura 4.  | Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de http://www.bioaula.loja.ghi.com.br)12   |
| Figura 5.  | Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo: (A)<br>através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração<br>intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica<br>(penetração transcelula) e (B) através dos apêndices cutâneos<br>(Campos, 2006)                                 |
| Figura 6.  | lontoforese com eletrodos de Ag/AgCl demonstrando as reações<br>eletroquímicas que ocorrem na superfície dos eletrodos e fluxo de<br>íons durante a iontoforese. Ânodo contendo um fármaco ionizável<br>D <sup>+</sup> e seu contra íon A <sup>-</sup> e Na <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> . (KALIA et al., 2004) |
| Figura 7.  | Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese: (A) a eletrorrepulsão e (B) a eletrosmose (GRATIERI et al., 2009)   |
| Figura 8.  | Esquema representando a célula de difusão iontoforética proposta por (GLIKFELD et al., 1988)  |
| Figura 9.  | Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (1) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido (2). Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso                           |
| Figura 10. | Preparo do ânodo em solução salina (5,78 M NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h   |

Figura 11. Experimento in vivo de liberação iontoforética em modelo animal ......37 Figura 12. Ponte salina (A) Ponte salina sendo retirada do tubo de silicone, (B) Ponte salina ao lado do tubo de silicone, visão frontal, (C) Ponte salina ao lado do tubo de silicone, visão superior (TAVEIRA; Figura 13. Circuito elaborado na placa de cultura, (A) Eletrodos em contato com o meio de cultura através da ponte salina, (B) Eletrodo positivo, (C) Ponte salina submersa (Taveira et al., 2009) ......43 Figura 14. Phoresor<sup>®</sup> - Fonte de energia utilizada nos experimentos em cultura de células ......43 Varredura de soluções em DMSO da ZnPcS<sub>4</sub> na faixa de Figura 15. concentração de 0,2 e 10,0 µg/mL ......47 Curva analítica demonstrando a linearidade do método de análise Figura 16. da ZnPcS<sub>4</sub>, no intervalo de concentração entre 0,25 e 7,5  $\mu$ g/mL ( $\lambda$ MAx = 679 nm). Equação da reta: y = 0,1447x + 0,0025; coeficiente de correlação linear: r = 0,9999......48 Figura 17. Espectro de absorção em UV/Vis dos homogeneizados de pele em DMSO. (A) pele de orelha de porco sem EC, (B) EC de pele de orelha de porco, (C) pele de rato sem EC, (D) EC de pele de rato .....51 Figura 18. Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de permeação passiva de gel de HEC com NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>.A: Pele antes da retirada do EC (EC); B: Pele após a retirada do EC ......55 Figura 19. Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de iontoforese anódica de gel de HEC com NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>.A: Pele antes da retirada do EC (EC); B: Pele após a retirada do EC ......55

- Figura 22. ZnPcS₄ no EC após 6 h de iontoforese catódica e anódica e permeação passiva. Os dados apresentados representam a média ± DP de 5 determinações. (\* P < 0,05; <sup>#</sup> P < 0,05, teste de Tukey).....57</p>

- Figura 26. Fotomicrografias da pele de ratos Wistar (cortada transversalmente) tratada durante 1 hora com gel de HEC contendo 0,1% do ZnPcS₄. As amostras de pele foram analisadas empregando uma objetiva de 40 x e uma fonte de laser de 633 nm para excitação e uma banda de emissão de 640–800 nm. (A) pele não tratada com fármaco, (B) aplicação passiva. E+D: Epiderme + derme, EC: estrato córneo .......64

- Figura 29. Viabilidade celular (%) com ou sem aplicação de corrente elétrica após irradiação das células A 431 nas placas de 24 poços, na densidade de 5 x 10<sup>5</sup> células por poço, em 660 nm, com dose de irradiação de 5 J/cm<sup>2</sup>, verificada pelo teste do MTT. Os resultados representam média ± EPM de 3 determinações. \* P < 0,05 comparado com controle (sem fotoestímulo). Teste de Tukey.......71</p>

# LISTA DE TABELAS

| Tabela 1. | Quantidades de solução metanólica de ZnPcS <sub>4</sub> adicionada às fitas |     |
|-----------|---|-----|
|           | adesivas contendo o EC ou a epiderme viável para estudo de                  |     |
|           | recuperação da ZnPcS₄   | .30 |
| Tabela 2. | Parâmetros obtidos por espectrofotometria de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$ = 679 |     |
|           | nm) para a análise da sensibilidade do método analítico para a              |     |
|           | ZnPcS₄  | .49 |
| Tabela 3. | Análises de Precisão e Exatidão intra dia para a ZnPcS4 em                  |     |
|           | espectrofotômetro de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$ = 679 nm)                     | .50 |
| Tabela 4. | Análises de Precisão e Exatidão interdia para a ZnPcS4 em                   |     |
|           | espectrofotômetro de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$ = 679 nm)                     | 50  |
| Tabela 5. | Parâmetros do estudo de recuperação da ZnPcS <sub>4</sub> da epiderme sem   |     |
|           | o EC e EC   | .52 |

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| CV      | Coeficiente de Variação                                      |
|---------|--|
| DMSO    | Dimetilsulfóxido   |
| EC      | Estrato córneo   |
| E+D     | Epiderme sem estrato córneo mais derme                       |
| E       | Exatidão   |
| FDA     | USA Food and Drug Administration                             |
| INCA/MS | Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde          |
| LD      | Limite de detecção   |
| LQ      | Limite de quantificação                                      |
| МТТ     | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide |
| SDS     | Dodecil Sulfato de Sódio                                     |
| TFD     | Terapia Fotodinâmica   |
| UV/Vis  | Ultravioleta visível   |
| ZnPcS₄  | Ftalocianina aniônica tetrassulfonada                        |
|         |  |

# SUMÁRIO

| 1. INTRODUÇÃO   | 1                  |
|---|--------------------|
| 2. REVISÃO DA LITERATURA  | 4                  |
| 2.1 Câncer  | 4                  |
| 2.1.1 Carcinoma basocelular   | 5                  |
| 2.1.2 Carcinoma espinocelular ou de células escamosas   | 6                  |
| 2.2 Terapia Fotodinâmica  | 7                  |
| 2.3 Pele e lontoforese  | 12                 |
| 3. OBJETIVOS  | 20                 |
| 3.1 Objetivos gerais  | 20                 |
| 3.2 Objetivos específicos   | 20                 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS   | 21                 |
| 4.1 Material  | 21                 |
| 4.1.1 Fármaco   | 21                 |
| 4.1.2 Solventes e Reagentes   | 21                 |
| 4.1.3 Equipamentos e Acessórios   | 22                 |
| 4.1.4 Soluções  | 22                 |
| 4.2 Métodos   | 24                 |
| 4.2.1 Padronização de método analítico para quantificação da ftalocianina extraída da pele por espectrofotometria de UV/Vis | ا<br>24            |
| 4.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima (λ MÁX) para a ftalocianina em DMSO                          | )<br>25            |
| 4.2.1.2 Validação do método analítico   | 25                 |
| 4.2.1.3 Estudo de recuperação da ftalocianina   | 29                 |
| 4.3 Experimentos <i>in vitro</i> de penetração e retenção cutânea passiva e iontoforética do fármaco                        | <del>)</del><br>31 |
| 4.3.1 Preparo da formulação   | 31                 |
| 4.3.2 Célula de difusão iontoforética   | 32                 |
| 4.3.3 Eletrodos   | 32                 |
| 4.3.4 Corrente total e densidade de corrente  | 34                 |
| 4.3.5 Experimento in vitro de penetração e retenção do fármaco  | 34                 |
| 4.3.5.1 Avaliação da penetração do fármaco na pele em função da composição da formulação e da polaridade do eletrodo        | )<br>36            |

| 4.4 Estudos de iontoforese <i>in vivo</i> em tecido sadio com a formulação otimizada <i>in vitro</i>   |
|--|
| 4.4.1 Quantificação do fármaco retido na pele após os experimentos <i>in vivo</i>  |
| 4.4.2 Microscopia confocal de varredura a laser  |
| 4.5. Estudos <i>in vitro</i> em cultura de células tumorais  |
| 4.5.1 Linhagem e contagem de células tumorais  |
| 4.5.2 Citotoxicidade da ZnPcS <sub>4</sub> sob diferentes concentrações e doses de radiação40  |
| 4.5.3 Ensaio da atividade antitumoral da ZnPcS₄ em solução aquosa na presença de uma corrente elétrica fraca em células de carcinoma epidermal escamoso (A431)41                               |
| 4.6 Análise estatística dos resultados44   |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO45  |
| 5.1 Padronização de método analítico para quantificação da ftalocianina extraída da pele por espectrofotometria de UV/Vis45  |
| 5.1.1 Estudos de agregação da ZnPcS₄ em DMSO45   |
| 5.1.2 Validação do método analítico47  |
| 5.1.3 Recuperação da ftalocianina da pele52  |
| 5.2 Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea da ZnPcS <sub>4</sub> 53   |
| 5.3 Estudos de permeação iontoforética <i>in vivo</i> 60   |
| 5.4 Citotoxicidade sob diferentes concentrações de ZnPcS <sub>4</sub> e doses de radiação67  |
| 5.5 Estudo do efeito citotóxico da ZnPcS <sub>4</sub> em solução aquosa na presença e ausência de uma corrente elétrica de baixa intensidade em células de carcinoma epidermal escamoso A43169 |
| 6. CONCLUSÃO   |
| 7. REFERÊNCIAS73   |
| ANEXO  |

### 1. INTRODUÇÃO

Há cerca de 30 anos que a terapia fotodinâmica (TFD) passou a ser considerada uma modalidade terapêutica alternativa para o tratamento de vários tipos de câncer, mas apenas recentemente ela está sendo usada mais amplamente na clínica (BROWN et al., 2004). O estudo dos mecanismos que envolvem a TFD tem levado ao desenvolvimento de sistemas mais baratos, convenientes e eficientes para a aplicação da luz. Resultados de testes clínicos de fase III já estão disponíveis, especialmente para o tratamento de câncer de pele do tipo nãomelanoma e esôfago de Barrett. Além disso, novos fotossensibilizantes estão em desenvolvimento. A TFD tem várias vantagens sobre a cirurgia e radioterapia: é não invasiva, age sobre um alvo específico com precisão, e o tratamento fotodinâmico pode ser realizado várias vezes no mesmo tecido (HOPPER, 2000). A TFD geralmente é realizada em hospitais. Duas porfirinas, o porfirmer sódico (composto ativo do Photofrin<sup>®</sup>) e o temoporfin, foram aprovados como fotossensibilizantes para administração sistêmica, enquanto dois pró-fármacos da protoporfirina IX, o ácido aminolevulínico (ALA) e o metil-ALA, foram aprovados para uso tópico (BROWN et al., 2004).

As porfirinas têm sido utilizadas como fotossensibilizantes sistêmicos devido à sua alta afinidade ao tecido tumoral e seu efeito acentuado quando sobre irradiação com luz (TITA; PERUSSI, 2001; SEKIYA et al., 1988), mas são substâncias muito lipofílicas, o que dificultaria a penetração desses fármacos através do estrato córneo, que é a camada mais externa da pele e principal barreira para a penetração de substâncias neste tecido. Além disso, essas moléculas absorvem luz em

1

comprimentos de onda menores, o que dificulta a foto-ativação das porfirinas em tecidos profundos, onde se encontra a maior parte dos tumores cutâneos.

Para contornar estas desvantagens, pode-se empregar outra classe de moléculas, como as ftalocianinas. As ftalocianinas pertencem a uma nova geração de substâncias usadas na TFD. Elas podem ser queladas com uma variedade de metais, como alumínio e zinco, sendo que os metais aumentam sua fototoxicidade. Além disso, são compostos que absorvem a luz em comprimentos de onda maiores do que as porfirinas, o que facilita a penetração de luz através da pele, melhorando bastante os resultados da TFD. Estudos com a zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) vem mostrando que esta substância apresenta alta eficiência na produção de oxigênio singleto (VALDUGA et al., 1998), menor toxicidade que as porfirinas e forte absorção na região do vermelho (600 – 700 nm) (BRASSEUR et al., 1987; BUBEDDU et al., 2001).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos fotossensibilizantes hidrofílicos da classe das ftalocianinas, o desenvolvimento de um sistema de liberação eficiente para esses agentes ainda se encontra pouco descrito na literatura. A maior parte destes fármacos se ioniza quando dissolvidos e moléculas carregadas têm dificuldade em atravessar membranas biológicas, especialmente o estrato córneo, além de sofrerem com freqüência aglomeração em meio aquoso, diminuindo a emissão de fluorescência e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica do fotossensibilizador (VALDUGA et al., 1998; HOWE; ZANG, 1998; FERNÁNDEZ et al., 1997; DIXON; STEULLET, 1998).

Como a iontoforese é uma técnica largamente utilizada para aumentar a penetração na pele de substâncias carregadas, sua aplicação como sistema de liberação para essas ftalocianinas parece ser uma alternativa para a administração

2

tópica e direcionada dessas substâncias para o tratamento de tumores cutâneos por TFD. A iontoforese já vem sendo estudada associada à TFD para aumentar a penetração do ácido 5-aminolevulínico (ALA), precursor da protoporfirina IX, que é um potente fotossensibilizador (LOPEZ et al., 2001; LOPEZ et al., 2003-A; LOPEZ et al., 2003-B; RHODES et al., 1997; GERSCHER et al., 2001). Estudos conduzidos em nosso laboratório com a porfirina aniônica meso-tetra-(4-sulfonatofenil)-porfirina (TPPS<sub>4</sub>), precursora da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>), demonstraram que a iontoforese aumenta a permeação desta porfirina através do tecido cutâneo sadio (GELFUSO et al, 2008) sem alterar a estabilidade do fármaco, o que justifica o emprego da iontoforese como sistema de liberação de fármacos para administração de outros fotossensibilizantes aniônicos.

No presente trabalho, optou-se por estudar a iontoforese *in vitro* e *in vivo* da zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) aniônica, pois esta tem apresentado inúmeros resultados estimulantes como fotossensibilizador para a TFD (KAI et al., 2001; BALL et al., 1999; BREMNER et al., 1999; WOOD et al., 1999; FERNÁNDEZ et al., 1997; REDDI et al., 1990; VALDUGA et al., 1998; BRASSEUR et al., 1987; BUBEDDU et al., 2001; VILLANUEVA; JORI, 1993). O entendimento da via de penetração deste fármaco na pele, bem como a determinação de concentrações efetivas dele, citotóxicas às células tumorais, devem auxiliar no desenvolvimento de uma formulação e de uma estratégia de aplicação adequada da ZnPcS<sub>4</sub> na pele para um tratamento mais efetivo de tumores por TFD tópica. Sendo assim, a iontoforese da ftalocianina negativamente carregada (ZnPcS<sub>4</sub>) será estudada *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de aumentar a penetração e a distribuição deste fármaco em camadas profundas da pele onde os tumores cutâneos normalmente estão presentes.

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalharse para outras regiões do corpo (INCA/MS, 2010).

Dentre os tipos de câncer, o de pele é o mais comum em indivíduos jovens (SHELTON, 2001). Existem três formas de tumores malignos da pele que se destacam: o melanoma cutâneo maligno, o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas ou espinocelular. Os carcinomas basocelular e espinocelular pertencem ao grupo de câncer de pele não-melanoma (CPNM), que são os tipos de tumores cutâneos mais comuns de pele em todo o mundo (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

A incidência dos CPNMs tem aumentado continuamente, tornando-os um desafio importante em termos de gestão de saúde pública, podendo causar um enorme impacto sobre os custos de assistência médica (TRAKATELLI et al., 2007). No Brasil, a estimativa para 2010 foi de 113.850 casos de CPNMs, sendo 53.510 em homens e 60.440 em mulheres (INCA/MS, 2010). O presente projeto está direcionado ao estudo de formulações e estratégias para sua aplicação tópica para o tratamento desses tumores.

4

#### 2.1.1 Carcinoma basocelular

O carcinoma basocelular é a malignidade mais comum em indivíduos de raça branca (MILLER, 1995). Sua incidência está aumentando 10% ao ano em todo o mundo. Embora a mortalidade seja baixa, pois o carcinoma basocelular raramente metastisa, esta malignidade provoca considerável morbidade e coloca um enorme ônus sobre serviços de saúde em todo o mundo (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).

Os fatores de risco incluem pele do tipo 1, cabelo vermelho ou loiro, olhos azuis ou verdes, queimadura solar na infância, histórico familiar de câncer de pele, tratamento imunossupressor e ingestão de arsênio. O desenvolvimento do carcinoma basocelular é resultante de uma complexa interação entre genes e o ambiente, especialmente a irradiação ultravioleta; o papel exato da exposição à radiação ultravioleta ainda precisa ser determinado. Pacientes com carcinoma basocelular têm um risco acrescido de desenvolver outros tipos de câncer de pele, tais como melanoma maligno, carcinoma de células escamosas e possivelmente malignidades não cutâneas (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).



Figura 1. Carcinoma basocelular sobre a testa (WONG; STRANGE; LEAR, 2003).

#### 2.1.2 Carcinoma espinocelular ou de células escamosas

O carcinoma espinocelular é o segundo tipo mais comum de câncer de pele, representando 20% de todos os casos de câncer da pele não melanoma. Este é o tumor mais comum em pacientes idosos, e geralmente é resultado de uma dose cumulativa de radiação solar ao longo da vida do indivíduo. No entanto, outros fatores, como susceptibilidade genética, podem conduzir a este tipo de câncer (GLOSTER; BRODLAND, 1996; MARKS, 1995). Cerca de 50 a 60% dos carcinomas de célula escamosas ocorrem na cabeça e pescoço. Outras regiões comuns incluem as mãos e antebraços, tronco superior e pernas. Os carcinomas de células escamosas podem crescer rapidamente em poucos milímetros a centímetros de tamanho. Eles podem parecer nodulares ou papilares e apresentam cor marromavermelhada ou rosa. Os carcinomas de células escamosas podem crescer agressivamente e apresentam um risco de metástase de 2 a 6%. Os locais mais comuns de propagação metastática são os linfonodos, pulmões e fígado. Reincidência e metástase normalmente ocorrem dentro de três anos do tratamento inicial (JERANT, 2000).



Figura 2. Câncer de pele tipo espinocelular (JERANT, 2000).

As principais formas de tratamento de tumores cutâneos incluem a crioterapia empregando nitrogênio líquido, remoção cirúrgica do tumor, curetagem e eletrodissecação, cirurgia micrográfica de Mohs, radioterapia e terapia fotodinâmica (TFD), sendo esta última uma técnica recente empregada no tratamento de tumores cutâneos. Uma grande vantagem da TFD no tratamento de tumores cutâneos em relação às demais é o fato desta técnica não ser invasiva e proporcionar uma ação localizada, evitando efeitos colaterais sistêmicos.

#### 2.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica tópica (TFD) é uma modalidade terapêutica moderna, que consiste na aplicação de um agente fotossensibilizante através da pele, seguida pela irradiação com luz em comprimentos de onda de máxima absorção do agente fotossensibilizante (STEINBAUER et al., 2010). Assim, o fotossensibilizante absorve fótons e inicia uma reação fotoquímica produzindo espécies de oxigênio altamente reativas (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), as quais são responsáveis pela morte do tecido em tratamento através de uma complexa reação bioquímica em cascata (ROBERTS; CAIRNDUFF, 1995).

A terapia fotodinâmica vem sendo clinicamente investigada para o tratamento local de várias patologias cutâneas, como a queratose actínica, Doença de Bowen, carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular. Ela já é oficialmente reconhecida no Canadá, Japão, Estados Unidos e em alguns países da Europa (GIBSON et al., 1997; STEINBAUER et al., 2010).

Uma limitação da TFD é que ela não pode ser empregada no tratamento de uma doença disseminada (uma metástase, por exemplo) porque não é possível irradiar todo o corpo com doses adequadas de radiação (pelo menos com as tecnologias atuais). Quanto a doenças precoces ou localizadas, a TFD pode ser uma terapia seletiva e eficaz, com muitas vantagens sobre as demais alternativas disponíveis (BROWN et al., 2004).

O fármaco mais estudado para emprego em TFD tópica é o ácido 5aminolevulínico (ALA), que não é em si um agente fotossensibilizante, mas um precursor da protoporfirina IX (PpIX), esta sim fotossensível. Devido à sua massa molecular relativamente baixa (MM = 168), o ALA atravessa a pele lesada com alguma facilidade, levando ao acúmulo de PpIX principalmente nas células tumorais. No entanto, muitas são as variáveis que interferem na biodisponibilidade adequada desta porfirina no tecido tumoral. Entre elas, as mais importantes são (i) a penetração cutânea irregular do ALA, dependendo da espessura e tipo de tumor, a (ii) conversão do ALA em PpIX, a qual depende da quantidade de ALA que atravessa a membrana celular e o metabolismo no local, além da (iii) heterogeneidade na distribuição da PpIX devido à distribuição não uniforme do ALA no tumor. Sendo assim, a administração direta de outros agentes fotossensibilizantes capazes de atravessar a pele e acumularem no tumor teria uma variante a menos que no tratamento com o pró-fármaco ALA.

As porfirinas têm sido utilizadas como fotossensibilizantes sistêmicos devido à sua alta afinidade pelo tecido tumoral e ao seu efeito acentuado, quando sob irradiação com luz (TITA; PERUSSI, 2001; SEKIYA et al., 1988). Uma das explicações para a maior afinidade das porfirinas, principalmente as lipofílicas, pelas células tumorais, deve-se ao fato desses fármacos serem transportados por lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) e como as células tumorais apresentam uma maior expressão de receptores de LDL em relação às células normais o sítio tumoral torna-se mais seletivo à ação do fármaco (BRAULT, 1990; MENEZES,

8

2007). Além disso, são fotoestáveis, apresentam alto rendimento quântico e longo tempo de vida do seu estado tripleto. No entanto, as porfirinas são substâncias muito lipofílicas, que teriam dificuldades em entrar na pele em quantidades suficientes para se obter um efeito biológico. Além disto, essas moléculas absorvem luz em comprimentos de onda relativamente curtos, os quais não penetram em tecidos profundos. Para contornar estas desvantagens, gerações mais modernas de fotossensibilizantes, como as ftalocianinas, vêm sendo estudadas, as quais absorvem luz e são foto-ativadas em comprimentos de onda maiores devido ao deslocamento batocrômico no espectro de absorção. Vale destacar que a região de máxima absorção das ftalocianinas corresponde a uma faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético, entre 670 e 690 nm, em que a luz apresenta uma maior penetração na pele (KAESTNER et al., 2003).

As ftalocianinas são agentes fotossensibilizantes de segunda geração, derivados das porfirinas, que contêm um íon metálico diamagnético em sua estrutura (DE ROSA *et al.*, 2000) e vêm mostrando uma alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores em animais e, mais recentemente, em humanos, além de efeitos fototóxicos reduzidos (VAN LEENGOED et al., 1994; WOOD et al., 1999; BEEBY et al., 2001; MILLER, J. D., 2007). A presença de um íon metálico na molécula, como o zinco ou alumínio, aumenta sua meia-vida no estado tripleto, fazendo com que o tempo de reação entre esses fotossensibilizantes e o substrato seja aumentado. As ftalocianinas são estruturalmente semelhantes às porfirinas, mas apresentam uma absortividade molar mais alta ( $\epsilon$ >10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> quando totalmente monomerizada) em comprimentos de onda que permitem uma maior penetração de luz nos tecidos normais (tipicamente 670 a 690 nm), quando comparadas às porfirinas (derivado purificado da hematoporfirina - Photofrin II<sup>®</sup>)

 $\epsilon$ >10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em 630 nm) (ALLÉMANN et al., 1997; CUBEDDU et al., 2001). A fotossensibilidade cutânea resultante da administração de ftalocianinas tem mostrado também ser bem menos acentuada do que com o Photofrin II<sup>®</sup>.

Dentre as ftalocianinas não substituídas, a ftalocianina de zinco (ZnPc) tem sido muito estudada (CRISTÓBAL et al., 2006). Experimentos com a ZnPc mostram que esta substância apresenta alta seletividade às células tumorais (REDDI et al., 1990). Outros estudos realizados recentemente com a ZnPc, comparando três diferentes formulações de nanopartículas comprovaram que esse fármaco foi capaz de promover a regressão de tumores induzidos em ratos através da infusão intralesional de uma solução das nanopartículas contendo ZnPc, em solução salina, com subseqüente tratamento fotodinâmico (FADEL et al., 2010). No entanto, a ZnPc é uma molécula altamente insolúvel na maioria dos solventes utilizados, dificultando sua administração e comprometendo sua biodisponibilidade. Para contornar a baixa solubilidade em água da ZnPc, bem como alterar e/ou melhorar sua captação pelas células tumorais, uma variedade de diferentes grupos têm sido adicionados à molécula. As propriedades das ftalocianinas modificadas podem ser utilizadas para direcionar sua ação para determinadas organelas celulares que possam ser mais suscetíveis à TFD. Outro composto desta classe, a ftalocianina Pc 4, também têm sido bastante estudada, inclusive em testes de tumores induzidos em cérebros de ratos, proporcionando resultados satisfatórios (GEORGE et al., 2005). Estudos com outra ftalocianina, a alumínio-cloro-ftalocianina (AICIPc), relataram a sua aplicação tópica e comprovaram que a quantidade de fármaco que penetrou no tumor é maior que aquela presente em tecidos sadios vizinhos ao tumor, demonstrando ainda que a AICIPc apresenta uma maior afinidade por células tumorais (KYRIAZI et al., 2008). Além disso, ficou também demonstrado que a concentração de AICIPc em tecidos normais e principalmente no

tumor apresenta uma relação direta com o tempo de aplicação da AICIPc, sendo que o acúmulo do agente fotossensibilizante no tumor foi 40 vezes maior em relação à quantidade presente nos tecidos normais (KYRIAZI et al., 2008).

Neste trabalho optou-se por estudar a penetração cutânea da ZnPcS<sub>4</sub> *in vitro* e *in vivo*, pois este fármaco apresenta caráter hidrofílico, em que a contribuição hidrofílica é dada pela presença de quatro grupos aniônicos, o que mascara suas propriedades lipofílicas geradas pelo macrociclo tetraazoindol. Assim sendo, as propriedades deste fármaco permitem sua fácil incorporação em gel, possibilitando sua aplicação tópica. Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos fotossensibilizantes carregados da classe das ftalocianinas, o desenvolvimento de um sistema de liberação eficiente para esses agentes ainda encontra-se pouco descrito na literatura. Moléculas carregadas têm dificuldade em atravessar membranas biológicas e o estrato córneo (EC) (principal barreira para a penetração cutânea de fármacos), além de sofrerem, com freqüência, aglomeração em meio aquoso, diminuindo a emissão de fluorescência e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica do fotossensibilizador (VALDUGA et al., 1998; HOWE; ZANG, 1998; FERNÁNDEZ et al., 1997; DIXON; STEULLET, 1998).



Figura 3. Estrutura química da ZnPcS<sub>4</sub>.

11

#### 2.3 Pele e lontoforese

Para a ZnPcS₄ e outros agentes fotossensibilizantes apresentarem algum efeito terapêutico quando aplicados topicamente na TFD, eles precisam necessariamente penetrar o EC e atingir camadas profundas da pele onde os CPNMs estão localizados.

A pele é o maior órgão do corpo e o de mais fácil acesso. É dividida em epiderme, derme e tecido subcutâneo ou hipoderme (Figura 4). A epiderme, a camada mais superficial da pele, é um tecido estratificado e complexo, cuja camada mais externa é o EC. A pele é o maior responsável por manter o conteúdo de água no organismo mesmo em condições climáticas variáveis, além de limitar a absorção de substâncias tóxicas do ambiente devido à sua propriedade de barreira, conferida principalmente pelo EC (GRATIERI et al., 2008).



**Figura 4.** Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de http://www.bioaula.loja.ghi.com.br).

O EC é composto de células mortas e ricas em queratina, os corneócitos. Essas células são circundadas por uma mistura complexa de lipídeos intercelulares, compreendendo ceramidas, ácidos graxos livres, colesterol e colesterol sulfato. O caminho predominante para a difusão das moléculas de um determinado fármaco através do estrato córneo é a via intercelular. Assim, o fármaco segue uma rota tortuosa, atravessando, seqüencialmente e de maneira repetida, vários domínios hidrofílicos e lipofílicos (GUY; HADGRAFT, 2003). As vias intracelular, folicular e ductos de glândulas constituem vias alternativas para a difusão do fármaco através da pele (Figura 5).



**Figura 5.** 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).

A partição e difusão de um fármaco através do EC lipofílico são consideradas passos limitantes para o transporte das moléculas do fármaco para as camadas

mais profundas da pele, compostas por células viáveis. Moléculas muito hidrofílicas não sofrerão partição para o EC e moléculas muito lipofílicas não irão difundir para a camada aquosa subseqüente na epiderme. Portanto, para atingir as camadas profundas da pele, um fármaco deve apresentar um balanço entre suas propriedades lipofílicas e hidrofílicas. Como este balanço não é encontrado na maioria dos fármacos, vários métodos têm sido empregados objetivando aumentar a penetração cutânea de fármacos, como por exemplo: (i) modificações químicas na estrutura da molécula, (ii) modificações na forma farmacêutica, (iii) o uso de agentes solubilizantes, (iv) a utilização de alteradores da permeabilidade cutânea, conhecidos como promotores de absorção cutânea (HERAI et al., 2007), e (v) o uso de métodos físicos, como o ultra-som (LOPEZ et al., 2011), eletroporação (DENET et al., 2004), microagulhas (BADRAN et al., 2008) e a iontoforese (GELFUSO et al., 2011).

No presente trabalho a iontoforese foi a estratégia escolhida para aumentar a penetração cutânea da ZnPcS<sub>4</sub> porque é, dentre as técnicas mencionadas, a que apresenta maior sucesso no aumento da penetração de substâncias hidrofílicas na pele, como no caso da ZnPcS<sub>4</sub> (LOPEZ et al., 2004; GELFUSO et al., 2008; GRATIERI et al., 2008; TAVEIRA et al., 2009; GELFUSO et al., 2011).

A iontoforese é uma técnica capaz de aumentar e controlar a penetração de moléculas na pele e se dá através da aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade (KANIKKANNAN et al., 1999; JADOUL et al., 1999). É um método nãoinvasivo e seguro, que propicia a liberação de moléculas carregadas, peptídeos e de outras macromoléculas que seriam incapazes de penetrar a pele passivamente (LOPEZ et al., 2003a; LOPEZ et al., 2004). A quantidade de fármaco transportado para a pele por iontoforese é diretamente proporcional à quantidade de carga que passa através do dispositivo iontoforético, ou seja, está diretamente relacionada à intensidade da corrente aplicada, tempo de aplicação da corrente e a área da superfície em contato com o compartimento contendo o fármaco (KALIA et al., 2004). O transporte através da pele, sob moderadas condições (0,1 mA/cm<sup>2</sup>), ocorre principalmente via apêndices cutâneos, como folículos pilosos e ductos de glândulas. Esses anexos atuam como vias de baixa resistência ao transporte transcutâneo de substâncias, apesar de ocuparem uma pequena porcentagem da área total exposta (CULLANDER; GUY, 1991; LEE et al., 1996; SCOTT et al., 1993).

Em 1908, na França, Leduc realizou o primeiro experimento empregando a iontoforese e demonstrou a sua eficiência no transporte cutâneo de fármacos. Neste experimento, dois coelhos foram conectados em série a um gerador de corrente elétrica. Foi administrado aos animais estriquinina e cianeto, respectivamente, e nada acontecia antes da ligação do gerador. Após a passagem da corrente, no entanto, o primeiro coelho logo apresentou quadro de convulsões tetânicas e o segundo morreu com sintomas de envenenamento por cianeto (CHIEN; BANGA, 1989).

Um dispositivo iontoforético compreende uma fonte de energia e dois compartimentos: um contendo a formulação em contato com eletrodo positivo (no caso de fármacos positivamente carregados ou fármacos neutros) e o outro com o eletrodo negativo. Desta maneira, o fármaco com carga deve ser adicionado no compartimento próximo ao eletrodo de mesma polaridade (KALIA et al., 2004). A formulação deve ser hidrofílica, para permitir a passagem da corrente elétrica. Quando a corrente é aplicada, há transporte de íons: os cátions presentes no ânodo se movem em direção ao cátodo, enquanto os ânions presentes no cátodo se movem na direção oposta. Apesar de haver diferentes tipos de eletrodos, o mais

comumente usado na iontoforese é o eletrodo de Ag/AgCI, pois evita a redução de pH durante a iontoforese e suas reações eletroquímicas ocorrem em voltagens menores que as da eletrólise da água. Esta última vantagem é extremamente relevante, pois no caso de hidrólise da água os ânions gerados no ânodo podem competir com as moléculas do fármaco pela corrente elétrica, diminuindo a eficiência da liberação do fármaco e a redução do pH pode provocar irritação da pele em contato com o compartimento do ânodo, além de afetar a estabilidade do fármaco (KALIA et al., 2004). Uma vez que a corrente é aplicada, o campo elétrico promove a movimentação de cargas presentes no sistema de forma direcionada: as cargas positivas presentes no ânodo movem-se em direção ao cátodo enquanto os ânions movem-se em direção oposta. Quando os eletrodos de Ag/AgCl são empregados, as reações eletroquímicas no ânodo (eletrodo de Ag) necessitam da presença de íons Cl<sup>-</sup> (Figura 6), o que geralmente provoca a redução da eficiência na liberação da droga, já que o NaCl usado para fornecer íons Cl- também introduz íons Na+ no sistema que competem com o fármaco pelo transporte de corrente elétrica (KALIA et al., 2004). Os íons Cl<sup>-</sup> reagem com a prata e formam cloreto de prata, que, devido a sua baixa solubilidade, é simultaneamente depositado na superfície do eletrodo, liberando um elétron. Para manter a neutralidade elétrica, ou um cátion deve deixar este compartimento e mover-se através da pele, ou um ânion presente na pele deve migrar para o ânodo. Já no cátodo (eletrodo de AgCI), o cloreto de prata é reduzido com a chegada de elétrons da fonte de energia e há formação de Ag, que permanece depositada no eletrodo, e liberação de íons Cl<sup>-</sup> para a solução (Figura 6). Novamente, a neutralidade elétrica deve ser obtida, ou com a entrada de cátions da pele, ou com a perda de um ânion desta para o cátodo (KALIA et al., 2004).



**Figura 6.** Iontoforese com eletrodos de Ag/AgCI demonstrando as reações eletroquímicas que ocorrem na superfície dos eletrodos e fluxo de íons durante a iontoforese. Ânodo contendo um fármaco ionizável D<sup>+</sup> e seu contra íon A<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup>CI<sup>-</sup>. (KALIA et al., 2004).

Durante a iontoforese, a corrente iônica atravessa uma solução eletrolítica, a pele e o corpo, e é carregada pelos íons presentes no sistema. A passagem da corrente elétrica através da solução eletrolítica e da pele depende dos íons que compõem a solução, pois a corrente elétrica é por eles carregada. A fração de corrente carregada pelo fármaco ionizado e outros íons presentes no sistema (cátions e/ou ânions, univalentes e/ou bivalentes) é denominada número de transporte. A razão máxima de transporte para dado íon ocorre quando o número de transporte deste íon é igual a um, ou seja, quando ele é capaz de carregar sozinho 100% da corrente através da membrana (PHIPPS; GYORY, 1992). Sendo assim, para maximizar a fração de corrente carregada pelo fármaco, isto é, para aumentar a eficiência da corrente, é necessário selecionar dispositivos iontoforéticos e

formulações adequadas. Vários são os parâmetros de uma formulação que podem ser manipulados a fim de se aumentar a eficiência da corrente, entre eles a concentração do fármaco, o pH, a concentração de íons externos e a estabilidade do fármaco na solução. Pode-se, também, elevar o fluxo iontoforético de um fármaco através da manipulação de fatores elétricos, como o perfil e a densidade da corrente elétrica (GELFUSO et al., 2008).

Existem várias análises detalhadas sobre os mecanismos envolvendo o fenômeno iontoforético e o transporte das moléculas de fármaco, sendo os dois mais aceitos, a eletrorrepulsão e a eletrosmose (MARRO et al., 2001), conforme esquematizado na Figura 7.



**Figura 7.** Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese: (A) a eletrorrepulsão e (B) a eletrosmose (GRATIERI et al., 2009).

A eletrorrepulsão refere-se ao movimento ordenado de íons na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio e está diretamente relacionada com o fluxo da corrente elétrica (GRATIERI et al., 2008). Ou seja, colocando-se um fármaco ionizado em contato com o eletrodo de mesma polaridade ocorre repulsão de cargas e a entrada do fármaco na pele é facilitada. A eletroosmose pode ser definida como um fluxo de solvente gerado pela corrente elétrica, ou seja, pelo fluxo de cargas que ocorre na pele. Esse mecanismo resulta do fato de que a pele apresenta um ponto isoelétrico (pl) entre 4,0 e 4,5, acima do qual os grupos carboxilatos presentes na mesma ficam ionizados. Assim sendo, a aplicação de um campo elétrico através da pele ionizada favorece o movimento de contra-íons que neutralizam suas cargas, tornando a pele cátion seletiva. A existência desse fluxo de solvente que ocorre do ânodo para o cátodo significa que moléculas neutras podem ser liberadas através de iontoforese anódica e que cátions apresentam esta contribuição somada à eletromigração (KALIA et al., 2004).

Já existem no mercado inúmeros dispositivos que aplicam a iontoforese clinicamente, como os eletrodos da ProMed e da Dynatronics, a fonte de energia Phoresor, dentre outros. A Vyteris teve aprovado pelo FDA em 2004 um sistema já carregado com lidocaína para anestesia local. Em 1999, foi lançado um relógio denominado Glucowatch<sup>®</sup> que se baseia no princípio da iontoforese para retirar glucose do organismo e monitorá-la quantitativamente (TAMADA et al., 1999).

Dessa forma, nota-se que os bons resultados científicos obtidos com a aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos têm sido aproveitados pelas indústrias, as quais colocam no mercado produtos com ação comprovada e que buscam melhorar a vida dos pacientes.

Face ao exposto, neste trabalho será estudada a influência de uma técnica promissora na penetração cutânea de fármacos, a iontoforese, sobre a penetração da ZnPcS<sub>4</sub>, um fotossensibilizante de 2º geração que apresenta características favoráveis para aplicação tópica como descrito anteriormente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Estudar a penetração cutânea da zinco ftalocianina aniônica ZnPcS₄ após administração tópica passiva e iontoforética, *in vitro* e *in vivo*, em tecidos sadios e avaliar a citotoxicidade em cultura células tumorais.

#### 3.2 Objetivos específicos

Desenvolver e validar uma metodologia analítica de quantificação da ZnPcS<sub>4</sub>
na pele;

Realizar a administração tópica passiva e iontoforética da ftalocianina aniônica (ZnPcS<sub>4</sub>) e avaliar sua penetração cutânea *in vitro* em pele de orelha de porco; e *in vivo* em tecidos sadios através da quantificação do fármaco retido na pele e microscopia confocal de varredura a laser;

Avaliar a fototoxicidade de soluções aquosas de ZnPcS<sub>4</sub> em cultura de células de carcinoma escamoso de células epidermais humanas (A431) na presença e na ausência de corrente elétrica.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Material

### 4.1.1 Fármaco

Zinco ftalocianina tetrassulfonada (ZnPcS<sub>4</sub>) (Frontier Scientific, Logan – USA).

## 4.1.2 Solventes e Reagentes

- > 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Sigma
- > Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) ultra puro Gibco
- > Fio de prata pura de 1,5 cm de diâmetro (99,99% pureza) (Aldrich)
- Fio de platina (Aldrich)
- Linhagem de célula carcinoma humano de células epidermais escamosas A431- ATCC
- > Meio de cultura "Dulbecco's Modified Eagle Médium" Gibco
- > Meio de cultura RPMI 1640 (+ L-Glutamina/ Vermelho de fenol) Gibco
- > Penicilina G 10.000 unidades/mL Gibco
- Soro Bovino Fetal Gibco
- ➢ Streptomicina 10.000 µg/mL Gibco
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Vetec
- Hidroxietilcelulose (HEC) Galena
- Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES) J.T. Baker
- Propilenoglicol Synth
# 4.1.3 Equipamentos e Acessórios

- > Agitador magnético Variomag Multipoint, Labortechnik, Alemanha;
- Balança analítica AdventurTM, Ohaus, USA;
- Balança Semi-analítica AS 2000C, Marte;
- Banho termostatizado Ecoline 003 E100, Lauda, Alemanha;
- Banho-Maria 314/4 Nova Ética, Brasil;
- ➤ Células de difusão tipo "Franz" (Hanson research Microette Plus Q-Park™);
- Criostato (Microm Modelo D-6900);
- Espectrofotômetro UV-VIS- Femto 800XI
- Fonte de energia (KEPCO POWER SUPPLY Modelo APH 500DM)
- Fonte de energia (Phoresor II (model PM 850 lomed);
- Leitor automático de microplacas Microquant, Biotek Instruments, Inc.;
- Medidor de pH DM-20, Digimed;
- Microscópio Confocal LEICA TCS SP2; software: LAS AF; equipado com Laser Hene 633 nm;
- Ultracentrífuga Beckman XL 70.

# 4.1.4 Soluções

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Foram dissolvidos 10 g de SDS em 50 mL de uma solução de HCI a 0,01 mol/L, obtendo-se uma solução a 20%. Esta foi armazenada em tubo falcon a temperatura ambiente.

➤ Meio de cultura Dubelco's (pH 7,2 – 7,4) suplementado

Foram adicionados 13,4 g do meio e 1,5 g de bicarbonato de sódio em 1 L de água Mili-Q. Em seguida, o meio foi suplementado com 7,5% de soro bovino fetal inativado, 0,5% de penicilina G e 0,5% de estreptomicina (10.000 U/mL e 10.000  $\mu$ g/mL). Este meio foi preparado e esterilizado por filtração em membranas de 0,22  $\mu$ m em fluxo laminar.

#### Inativação do Soro Bovino Fetal (SBF)

Para utilização do SBF no meio de cultura, foi necessária a inativação do sistema complemento. Para isso, ele foi descongelado em temperatura ambiente e seu frasco completamente submerso em banho-maria, por uma hora, à temperatura de 56 °C.

# Meio de cultura RPMI 1640 incolor

Este meio de cultura foi adquirido já preparado, mas foram adicionadas a ele a penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm em fluxo laminar.

#### ≻ MTT

50 mg do reagente colorimétrico MTT foram dissolvidos em água MilliQ, em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução a 5 mg/mL. Esta solução foi esterilizada através de filtração em membrana de 0,22 µm em fluxo laminar. Posteriormente, a solução foi aliquotada em *eppendorfs* estéreis de 1 mL e estocada a temperatura de -6 °C (freezer).

#### Solução de Turk

15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de violeta de genciana (2%) foram dissolvidos em água MilliQ em balão volumétrico de 500 mL. Esta solução foi

utilizada para a contagem de células na proporção de 1:20 amostra / solução de Turk.

Tampão HEPES 25 mM isotônico pH 7,4

1,489 g de HEPES e 1,945 g de cloreto de sódio foram dissolvidos em 250 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4 com NaOH.

> Tripsina

A tripsina adquirida comercialmente foi adequadamente transferida para vários *eppendorfs* estéreis de 1 mL e estocada a temperatura de -6°C (freezer).

Solução Anestésica

Com o auxilio de uma pipeta automática, foram misturados 1 mL de Dopaser<sup>®</sup> (Xilazina 2%) a 1 mL de Dopalen<sup>®</sup> (Ketamina 10%).

# 4.2 Métodos

# 4.2.1 Padronização de método analítico para quantificação da ftalocianina extraída da pele por espectrofotometria de UV/Vis

Quando se realiza um experimento de permeação *in vitro*, parte do fármaco em estudo pode ficar retida na pele e parte atravessar a pele e solubilizar-se na solução receptora. Dessa forma, é necessário que métodos analíticos adequados sejam desenvolvidos para se quantificar o fármaco tanto na solução receptora quanto nas diferentes camadas da pele. O método para analisar o fármaco na solução receptora foi anteriormente desenvolvido em nosso laboratório (GELFUSO, 2006). Portanto, foi necessário agora desenvolver e validar um método para a extração e quantificação do fármaco em estudo retido na pele nos experimentos de permeação.

# 4.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima (λ MÁX) para a ftalocianina em DMSO

Como o DMSO foi o solvente extrator selecionado para a ftalocianina da pele, realizou-se a varredura da solução de ftalocinaina em DMSO, em espectrofotômetro de UV/Vis, na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 800 nm. O comprimento de onda referente ao máximo de absorção ( $\lambda_{MAX}$ ) para a ZnPcS<sub>4</sub> foi selecionado então para sua quantificação por análise espectrofotométrica em UV/Vis. Além disso, a ocorrência de agregação entre as moléculas da ZnPcS<sub>4</sub> foi analisada através de espectros de varredura. Desta forma, considerando que a agregação de ftalocianinas é um fenômeno diretamente proporcional à concentração do fármaco em solução, os espectros de varredura foram obtidos em diferentes concentrações de ZnPcS<sub>4</sub>: 0,2, 1,0, 2,5 e10 µg/mL.

### 4.2.1.2 Validação do método analítico

O método analítico utilizado para a quantificação da ftalocianina por espectrofotometria UV/VIS em DMSO foi validado visando assegurar sua qualidade e confiabilidade, segundo recomendações bem descritas na literatura (RIBANI et al., 2004). A validação seguiu os parâmetros analíticos de seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão.

#### a) Linearidade

A linearidade de um método representa a capacidade de produzir resultados que são diretamente (ou através de transformação matemática bem definida) proporcionais à concentração do analito nas amostras, dentro de uma determinada faixa (ANVISA, 2003).

A linearidade foi avaliada através da construção de curva analítica, em triplicata para cada concentração, com valores expressos em  $\mu$ g/mL, a partir de soluções de ZnPcS<sub>4</sub> nas concentrações de 0,25, 0,5, 2,5, 5,0 e 7,5  $\mu$ g/mL. Essas soluções foram preparadas por diluição em DMSO da solução padrão de ZnPcS<sub>4</sub> na concentração de 40  $\mu$ g/mL.

As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressas pela equação de primeira ordem y = ax+b, onde (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. As faixas lineares foram calculadas utilizando o coeficiente de correlação linear (r), como o critério mínimo aceitável de r = 0,990.

#### b) Sensibilidade

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância analisada utilizando um determinado procedimento experimental que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser estabelecido por meio de análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável. O limite de quantificação foi determinado a partir da leitura em espectrofotômetro de soluções de  $ZnPcS_4$  em DMSO nas concentrações de 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 e 0,25 µg/mL, todas em quintuplicata, e analisadas com base na curva analítica preparada na concentração de 0,25 a 7,5 µg/mL.

# c) Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Uma maneira bastante utilizada para determinar a precisão de um método é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: precisão intraensaio; precisão interensaios e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

A precisão intraensaio representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A precisão intraensaio envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-corrida ou repetitividade e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) (ANVISA, 2003).

A precisão interensaio indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da precisão interensaios é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Para se determinar a precisão intra-ensaio, foram avaliadas soluções de ZnPcS<sub>4</sub> nas concentrações de 0,25, 2,5 e 7,5 µg/mL, em triplicata para cada concentração.

Para se determinar a precisão interensaio, foram avaliadas soluções de  $ZcPcS_4$  nas concentrações de 0,25, 2,5 e 7,5 µg/mL, em triplicata para cada concentração, e analisou-se durante 3 dias consecutivos. As análises foram realizadas com base na curva analítica preparada na faixa de concentração de 0,25 a 7,5 µg/mL, sendo para cada dia foi feita uma curva analítica.

#### d) Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ANVISA, 2003). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

Exatidão = (concentração média experimental / concentração teórica) x 100

A exatidão do método foi avaliada da mesma forma que a precisão intradia e utilizando-se os mesmos dados para os cálculos estatísticos.

e) Estudo de interferência da pele na metodologia de quantificação da ftalocianina por espectrofotometria de UV/Vis (Seletividade)

Foram realizadas varreduras no UV/Vis do homogeneizado de (i) EC e (ii) de pele de orelha de porco dermatomizada a 700 µm sem EC ("epiderme viável"), ambos em DMSO. Esses espectros foram comparados ao espectro de absorção do fármaco (ZnPcS<sub>4</sub>) em DMSO para verificar a existência de absorbância da pele no mesmo comprimento de onda do fármaco.

Assim, um pedaço de pele de orelha de porco com área de aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$  teve seu EC removido com o auxílio de 15 fitas adesivas (*tapping stripping*) e as fitas contendo o EC da pele foram colocadas em um béquer com 10 mL do solvente extrator (DMSO). A solução foi agitada em agitador magnético durante 1 h, seguido da filtração da solução (Solução 1). O restante da pele sem o EC foi cortada, picotada e colocada em um tubo plástico contendo 10 mL do solvente extrator (DMSO). Com o auxílio de um homogeneizador de tecidos, este tecido foi triturado por 1 min. Logo após, o tubo foi colocado em banho de ultrassom por 45 min para que houvesse a quebra das estruturas celulares da pele (Solução 2). As soluções 1 e 2 foram filtradas individualmente em filtro com poros de 0,45 µm e a partir de cada filtrado foram realizadas as varreduras em espectrofotômetro de UV/Vis, na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 800 nm.

### 4.2.1.3 Estudo de recuperação da ftalocianina

Para o teste de recuperação da  $ZnPcS_4$  presente na pele, o EC foi retirado de uma área de ~1 cm<sup>2</sup> da pele de orelha de porco com o uso de 15 fitas adesivas (*tape* 

*stripping*) e a epiderme sem o EC foi picotada. As fitas contendo o EC e a epideme viável (pele dermatomizada sem o EC) foram colocadas em tubo de ensaio onde se adicionou volumes conhecidos de uma solução metanólica da ZnPcS<sub>4</sub> contendo 0,2 mg/mL de fármaco (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quantidade de solução metanólica de ZnPcS<sub>4</sub> adicionada às fitas adesivas contendo o EC ou a epiderme viável para estudo de recuperação da ZnPcS<sub>4</sub>.

| Concentração de    | Volume de solução     | Concentração final  |
|--------------------|-----------------------|---------------------|
| ZnPcS₄ na solução  | metanólica adicionada | após adição de DMSO |
| metanólica (µg/mL) | à pele (µL)           | (µg/mL)             |
| 200                | 80                    | 1,6                 |
| 200                | 160                   | 3,2                 |
| 200                | 240                   | 6,4                 |

O metanol foi evaporado, para deixar uma massa conhecida de fármaco em contato com a pele, e em seguida adicionou-se 10 mL de DMSO, utilizado como solvente extrator, para a extração da ZnPcS<sub>4</sub> das fitas adesivas contendo o EC. O tubo foi agitado por 1 h, seguido de filtração e quantificação por UV/Vis.

À epiderme sem o EC (epiderme viável) adicionou-se 10 mL de DMSO, sendo que o tubo foi colocado no homogeneizador de tecidos por 1 min e em banho de ultrassom por mais 45 min. Como apenas uma extração não foi suficiente para recuperar todo o fármaco adicionado, foi realizada uma nova extração com 2,5 mL de DMSO e o tubo ficou por mais 30 min no ultrassom. As amostras foram filtradas e quantificadas por UV/Vis. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada quantidade de fármaco adicionada. A curva analítica utilizada neste experimento foi construída a partir da adição de volumes conhecidos da solução metanólica de ZnPcS<sub>4</sub> em tubos que não continham a pele, na faixa de concentração de 0,25 a 7,5 µg/mL, sendo que a curva foi feita em triplicata. O metanol foi evaporado e o fármaco seco presente nos tubos foi ressuspendido em 5,0 mL de DMSO. Realizou-se a leitura das soluções contendo diferentes concentrações do fármaco em 679 nm e construiu-se a curva analítica, sendo que as amostras obtidas a partir do teste de recuperação foram analisadas com base nos parâmetros da curva construída. A recuperação foi determinada através da seguinte equação:

Recuperação (%)= (<u>quantidade experimental obtida do fármaco</u>) x 100 (quantidade teórica adicionada do fármaco)

# 4.3 Experimentos *in vitro* de penetração e retenção cutânea passiva e iontoforética do fármaco

### 4.3.1 Preparo da formulação

0,1% de ZnPcS<sub>4</sub> foi incorporada a um gel não-iônico de hidroxietilcelulose (HEC - Natrosol<sup>®</sup>). O gel foi preparado pesando-se 1,5 g de HEC e 5 g de propilenoglicol, completando-se a massa para 100 g com água destilada. Essa dispersão foi aquecida e agitada até a formação do hidrogel. Em seguida, 5 mg do fármaco foram dissolvidos em uma quantidade mínima de água e a solução foi incorporado a 5 g do gel preparado. Dependendo do experimento a ser realizado, foram adicionados ou não 90 mM de NaCl a esta formulação.

#### 4.3.2 Célula de difusão iontoforética

Foram utilizadas células de difusão vertical, descritas por Glikfeld et al. (1988) com área de permeação de 0,80 cm<sup>2</sup>. Essas células são divididas em duas partes de forma que uma metade (compartimento doador) fica sobre a outra (compartimento receptor com volume de 6,0 mL). A metade superior destas células é dividida por duas paredes verticais em três compartimentos (Figura 8). Os eletrodos (positivo e negativo) são colocados nos dois compartimentos de fora (ânodo e cátodo, respectivamente). Estes compartimentos são separados por um pequeno espaço (terceiro compartimento), o qual permite que as partes da pele em contato com os eletrodos figuem física e eletricamente isoladas entre si.



**Figura 8.** Esquema representando a célula de difusão iontoforética proposta por GLIKFELD et al. (1988).

# 4.3.3 Eletrodos

Os eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl), obtidos segundo Lopez (2000). Com o auxílio de um bico de Bunsen, em um cadinho de porcelana, foi fundida uma quantidade de

cloreto de prata (AgCI) suficiente para mergulhar uma extremidade do fio de prata com a ponta dobrada conforme ilustra a Figura 9. Após a imersão do fio de prata (99,9% de pureza), este foi retirado com a extremidade banhada coberta com cloreto de prata solidificado. Desta maneira, obteve-se o eletrodo negativo (cátodo).



**Figura 9.** Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (1) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido (2). Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso.

Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), uma solução salina de 5,78 M de NaCl foi utilizada para reduzir o AgCl, com o auxílio de um pedaço de fio de platina e a passagem de corrente elétrica. O terminal positivo do gerador foi conectado ao pedaço de fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo de AgCl, o qual foi reduzido em Ag, através da passagem de uma corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h (Figura 10).



**Figura 10.** Preparo do ânodo em solução salina (5,78 M NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h.

#### 4.3.4 Corrente total e densidade de corrente

No decorrer dos experimentos de iontoforese a corrente elétrica utilizada foi de 0,4 mA, mantida constante e contínua por 6 h. Para isso foi utilizado o gerador Kepco Power Supply<sup>®</sup>, modelo APH 500DM. A densidade da corrente, em função da área exposta, foi de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>. Para garantir o mínimo de íons necessários para carregar a corrente elétrica de 0,4 mA por 6 h de experimento foi necessário adicionar NaCl no doador, segundo a equação abaixo:

$$T = \frac{i(A) \times t(s)}{F(C)}$$

onde: T é o número de mols necessários para transportar a corrente elétrica (i) contínua e constante por t segundos; e F é a constante de Faraday = 96500 C. Sendo assim, foram adicionados à formulação que continha o fármaco 89,5 mmol/L de NaCl para as 6 h de experimento.

# 4.3.5 Experimento in vitro de penetração e retenção do fármaco

A célula de difusão foi montada com a pele da orelha de porco separando os compartimentos doadores (dos eletrodos) do compartimento receptor. Este último foi preenchido com a solução receptora de tampão HEPES isotonizado. Na metade superior da célula, foi adicionado 1 g da formulação contendo a ZnPcS₄ em um dos compartimentos e 1 mL da solução tampão pH 7,4 isotônica no outro compartimento. Sobre estes compartimentos doadores (ânodo e cátodo) foi colocada uma tampa de plástico para minimizar a evaporação das soluções que banham os eletrodos. Nesta tampa foram feitos dois pequenos orifícios para permitir a inserção dos eletrodos de

Ag e AgCl e facilitar a reprodutibilidade da posição dos eletrodos a uma distância fixa da superfície da pele (~ 3 mm). Estes eletrodos foram ligados a uma fonte de energia e submetidos a uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>. A variação de potencial (voltagem), necessária para manter a corrente constante em resposta à resistência da pele de porco, foi monitorada com o auxílio de um multímetro. A solução receptora foi mantida a 37°C e agitada a 300 rpm por 6 horas.

Os experimentos passivos foram realizados de maneira idêntica aos iontoforéticos, exceto pela não inserção dos eletrodos para que não houvesse passagem de corrente elétrica.

Após 6 h de experimento, a solução receptora foi retirada da célula de difusão e analisada por espectrofotometria no UV/Vis para quantificação de ZnPcS<sub>4</sub> permeada.

A pele foi removida da célula de difusão e presa em uma superfície lisa com o EC (EC) voltado para cima. A parte da pele submetida à difusão foi então retirada através da técnica do *"tape stripping"* com auxílio de 15 fitas adesivas. A remoção mais ou menos completa do EC após este procedimento foi indicada pelo "brilho" da face exposta da pele (epiderme sem o EC). As 15 fitas adesivas contendo partes do EC foram colocadas conjuntamente em um tubo, e a ZnPcS<sub>4</sub> nelas contida foi extraída com 10 mL de DMSO com agitação constante por 1 h, seguido de filtração em membrana de 0,45 μm e análise em UV/Vis para se determinar a quantidade de fármaco no EC.

A pele remanescente (epiderme viável) foi picotada, transferida para tubo falcon, e o fármaco aí contido foi extraído com DMSO, conforme descrito no item 4.2.4. As amostras foram filtradas e quantificadas por UV/Vis a 679 nm.

Com o intuito de se verificar a influência do NaCl e da polaridade do eletrodo sobre a penetração da ZnPcS<sub>4</sub> na pele, realizaram-se os seguintes experimentos:

a) lontoforese catódica do gel contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub> e 89,5 mM de NaCl
b) lontoforese catódica do gel contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub> na ausência de NaCl
c) lontoforese anódica do gel contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub> e 89,5 mM de NaCl
d) Penetração passiva do gel contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub> e 89,5 mM de NaCl

# 4.4 Estudos de iontoforese *in vivo* em tecido sadio com a formulação otimizada *in vitro*

Esses estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP (Protocolo nº 08.1.980.53.5).

Os experimentos foram realizados conforme metodologia padronizada em nosso laboratório (GELFUSO, 2006; GELFUSO et al., 2008). No dia anterior ao experimento, rasparam-se os pêlos da região abdominal de ratos Wistar (linhagem Wistar) machos, de 30 dias de vida e com massa corporal de aproximadamente 100 g. Minutos antes dos experimentos, cada animal utilizado foi pesado e anestesiado através da aplicação intraperitonial de 0,1 mL/100 g de massa corpórea de uma solução anestésica (preparada conforme o ítem 4.1.4). Sobre a área abdominal raspada do animal anestesiado foi colocado um *template* de vidro, cuja borda da superfície inferior foi

impregnada de graxa de silicone para evitar vazamento da formulação, e 1 g do gel de HEC contendo a ftalocianina de zinco tetrassulfonada na concentração de 0,1% na ausência de NaCI (formulação que apresentou maior penetração nos estudos *in vitro*) foi colocada em contato com a pele do rato. Nos estudos de iontoforese, a fonte de energia miniaturizada (Phoresor® II Auto, Modelo Nº PM850, produzida pela IOMED) foi utilizada, e um eletrodo negativo de AgCI ligado a ela foi colocado em contato com a formulação (Figura 11). A cauda do animal foi envolvida com um *patch* desenvolvido pela *lomed* contendo o eletrodo positivo embebido numa solução salina. Na Figura 11 está ilustrado o experimento de liberação iontoforética *in vivo*. O tempo de aplicação da formulação foi igual a 5 e 15 minutos.

Experimentos passivos de 5, 15 e 60 min foram realizados de maneira semelhante, mas sem a inserção dos eletrodos para a passagem da corrente elétrica.



Figura 11. Experimento in vivo de liberação iontoforética em modelo animal.

#### 4.4.1 Quantificação do fármaco retido na pele após os experimentos in vivo

No final do experimento de iontoforese *in vivo*, descrito anteriormente, o animal foi sacrificado em câmara de CO<sub>2</sub> e a pele foi dissecada e presa em uma

superfície lisa com o EC voltado para cima. A parte da pele submetida à difusão foi então retirada através da técnica do *"tape stripping"* com auxílio de 8 fitas adesivas. A remoção mais ou menos completa do EC após este procedimento foi indicada pelo brilho da face exposta da pele (epiderme viável). As 8 fitas adesivas contendo camadas do EC foram colocadas conjuntamente em um tubo, e a ZnPcS<sub>4</sub> nelas contida foi extraída com 5 mL de DMSO com agitação constante por 1 h, seguido de filtração em membrana de 0,45 µm e análise para se determinar a quantidade de fármaco no EC empregando o método de análise validado.

A pele remanescente (epiderme viável) foi picotada, transferida para tubo falcon e o fármaco aí contido extraído com DMSO, conforme descrito no item 4.2.4. As amostras foram filtradas e quantificadas por UV/Vis a 679 nm.

# 4.4.2 Microscopia confocal de varredura a laser

Após estudos de permeação passiva e iontoforética *in vivo*, algumas amostras de pele foram analisadas por microscopia confocal de varredura, seguindo metodologia também padronizada em nosso laboratório (GELFUSO, 2006; GELFUSO et al., 2008). Desta forma, após aplicação passiva e iotoforética *in vivo* da formulação contendo a ftalocianina em diferentes tempos de aplicação da formulação (5 e 15 minutos para os experimentos de iontoforese; e 5, 15 e 60 minutos de aplicação passiva), a pele foi dissecada e criosseccionada em cortes com espessura de 30 µm perpendicular à superfície da pele. A localização da fluorescência na pele foi examinada usando um microscópio confocal a laser Leica, modelo TCS SP2, empregando uma fonte de laser de HeNe 633 nm para excitação

e uma banda de emissão entre 640 e 800 nm, na qual foi possível observar a fluorescência da ZnPcS<sub>4</sub>.

#### 4.5 Estudos in vitro em cultura de células tumorais

### 4.5.1 Linhagem e contagem de células tumorais

Foram empregadas como modelo celular linhagens de células de carcinoma de células escamosas humanas A431. Esta linhagem foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A linhagem foi mantida sob criopreservação no nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de dimetilsulfóxido e 90% de SBF inativado. Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, em meio Dulbecco's completo, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram removidas dos frascos de cultura celular através da adição de uma solução de tripsina a 0,5% em solução salina. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por 15 minutos, sendo que as garrafas foram agitadas nos tempos 7 e 15 min. Logo após, adicionou-se em cada garrafa 10 mL de meio Dulbecco's completo a fim de neutralizar a tripsina. O conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubo falcon e centrifugado a 10°C e 1100 rpm durante 15 minutos.

Realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer, seguindo-se da ressuspensão das mesmas em meio Dulbecco's completo. O plaqueamento foi feito adicionando-se, em cada poço da placa de 96 poços, 1 x 10<sup>5</sup> células contidas em um

volume de 200  $\mu$ L de meio. Incubaram-se as placas por 24 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio do MTT, que avaliou a toxicidade do composto em estudo sobre a linhagem celular estudada.

# 4.5.2 Citotoxicidade da ZnPcS<sub>4</sub> sob diferentes concentrações e doses de radiação

No dia seguinte ao plaqueamento das células, o meio Dulbecco's foi removido e lavaram-se os poços uma vez com solução salina. Adicionou-se aos poços 100 µL de meio RPMI contendo 1% de SBF, 10.000 U/mL de penicilina G e 10.000 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, foram adicionados em cada poço 20 µL de soluções de ZnPcS<sub>4</sub>, e, por fim, mais 80 µL de meio RPMI, perfazendo as concentrações finais de 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 e 100,0 µg/mL. A placa de cultura com o fármaco foi incubada por 4 horas (HUANG et al., 2009). Após a incubação, o meio contendo o fármaco foi removido e lavou-se cada poço três vezes com solução salina, seguido da adição de 200 µL do meio RPMI. Foram aplicadas diferentes doses de irradiação com laser, de acordo com o seguinte protocolo.

A) Incubação por 4 h, Irradiação em 660 nm, dose de 0,2 mJ/cm<sup>2</sup>
B) Incubação por 4 h, Irradiação em 660 nm, dose de 1,0 mJ/cm<sup>2</sup>
C) Incubação por 4 h, Irradiação em 660 nm, doses de 5,0 mJ/cm<sup>2</sup>

A incidência de luz foi feita a uma distância de 10 cm da fenda do laser. A potência de luz (em mW) foi obtida pelo próprio software (Colibri, QuantumTech®)

utilizado para a irradiação no comprimento de onda escolhido e confirmada utilizando o equipamento medidor de potência de laser/energia FieldMastII-TOP (Coherent®) localizado a 10 cm de distância da luz incidente. Após a irradiação, as placas foram incubadas por 16 horas em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e a citotoxicidade determinada pelo teste do MTT.

Para avaliar se a radiação por si só apresentou algum efeito citotóxico, foram realizadas irradiações dos poços, nas 3 diferentes doses de radiação, na ausência do fármaco. Os resultados desta irradiação foram utilizados para se determinar a toxicidade nas diferentes doses de radiação comparando-se com os grupos que receberam fármaco e radiação. Também foi feito um grupo controle que não recebeu nenhuma dose de radiação, nem fármaco.

4.5.3 Ensaio da atividade antitumoral da ZnPcS₄ em solução aquosa na presença de uma corrente elétrica fraca em células de carcinoma epidermal escamoso (A431)

As células A 431, da mesma maneira que para o estudo na ausência de corrente elétrica, foram contadas e transferidas para as placas, mas neste caso em placas de 24 poços com densidade de 5 x  $10^5$  em 2000 µL de meio por poço. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37° C, em estufa com atmosfera umidificada contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período de incubação, o meio de cultura foi renovado por RPMI 1640 sem vermelho de fenol e sem SBF, para adição das soluções de ZnPcS<sub>4</sub> contendo 1,0  $\mu$ g/mL. Em seguida, as placas foram submetidas a uma corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 hora e incubadas a 37° C por 3 horas. Foi feito também um controle (sem aplicação de corrente elétrica), no qual as células contendo 0,2 ug/mL de ZnPcS<sub>4</sub> foram incubadas por 4 horas.

A corrente elétrica foi aplicada nas placas utilizando-se eletrodos de Ag (positivo) e AgCI (negativo) (preparados da mesma forma que os eletrodos utilizados nos estudos de permeação cutânea iontoforética (item 4.3.3), e ponte salina a 0,9%, em placas de 24 poços, como descrito a seguir.

Ponte salina 0,9%

Para o preparo das pontes salinas, foram pesados 0,3 g de ágar e 0,18 g (0,9%) de NaCl e completou-se o peso para 20 g com água destilada. Esta mistura foi aquecida até completa fusão. Com uma seringa de 1 mL, colocou-se esta mistura, ainda fundida, dentro de tubos de silicone de aproximadamente 9 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro. Após solidificação do ágar nos tubos, pressionou-se uma de suas extremidades e o ágar em forma cilíndrica foi retirado dos tubos (Figura 12).



**Figura 12**: Ponte salina (A) Ponte salina sendo retirada do tubo de silicone, (B) Ponte salina ao lado do tubo de silicone, visão frontal, (C) Ponte salina ao lado do tubo de silicone, visão superior (TAVEIRA, 2007).

> Montagem do circuito elétrico

Para aplicação da corrente elétrica nas placas de cultura celular, os eletrodos positivo (Ag) e negativo (AgCI) foram colocados em recipientes plásticos separados contendo uma solução saturada de NaCI. O circuito elétrico destes com o meio de cultura presente nas placas foram completados com o auxílio das pontes salinas, como ilustrado na Figura 13.



**Figura 13**: Circuito elaborado na placa de cultura, (A) Eletrodos em contato com o meio de cultura através da ponte salina, (B) Eletrodo positivo, (C) Ponte salina submersa (TAVEIRA, 2007).

Os eletrodos foram conectados a uma fonte de energia (Figura 14), onde foram programadas as intensidades de corrente e o tempo de aplicação dos experimentos.



Figura 14. Phoresor<sup>®</sup> - Fonte de energia utilizada nos experimentos em cultura de células.

Tratamento fotodinâmico e teste de citotoxicidade – MTT

Após aplicação da iontoforese por 1 hora e incubação por 3 horas, foi realizado o tratamento fotodinâmico e o teste do MTT, como descrito anteriormente nos estudos na ausência de corrente elétrica.

# 4.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad<sup>®</sup> (versão 3.02, 1999). Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média (EPM) ou ± desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA (Teste de Tukey e Dunnett's). Foram consideradas diferenças significativas os valores de p<0,05.

#### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 5.1 Padronização de método analítico para quantificação da ftalocianina extraída da pele por espectrofotometria de UV/Vis

Foram poucos os métodos analíticos encontrados na literatura para a quantificação de derivados hidrossolúveis de ftalocianina, por tratarem-se de substâncias relativamente novas, apresentando, ainda, poucos estudos quantitativos bem estabelecidos. A espectrofotometria em UV/Vis foi escolhida para a quantificação da ZnPcS<sub>4</sub> no presente trabalho por dois motivos: (i) por ser um método simples e sensível o bastante para a detecção e determinação de pequenas quantidades de substâncias em soluções (JEFFERY et al., 1992) e (ii) porque as ftalocianinas apresentam absortividade molar alta ( $\epsilon$ >10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (ALLEMAN et al., 1997) em comprimento de onda diferente daquele em que a maioria dos componentes da pele absorve. Sendo assim, é esperado que a quantificação deste fármaco, nos experimentos de permeação e retenção cutânea, seja sensível e seletiva.

Como o solvente escolhido para extrair a  $ZnPcS_4$  da pele foi o DMSO (o motivo da escolha deste solvente será discutido posteriormente, no item 5.1.3), o método de quantificação do fármaco foi padronizado e validado para soluções de  $ZnPcS_4$  em DMSO.

# 5.1.1 Estudos de agregação da ZnPcS<sub>4</sub> em DMSO

A agregação é um fenômeno relativamente comum à classe das ftalocianinas e ocorre principalmente em meio aquoso devido à grande extensão dos sistemas π conjugados. Ela causa decréscimo da fluorescência da molécula, do tempo de meiavida do estado triplete e, conseqüentemente, compromete a eficiência do fármaco como agente fotossensibilizante (LIU et al., 2005; HOWE; ZANG, 1997). Já foi relatado, no entanto, que em solventes orgânicos como o DMSO as moléculas de ZnPcS<sub>4</sub> encontram-se em seu estado monomérico e permanecem excitadas por um tempo maior quando comparado à sua solução aquosa (HOWE; ZANG, 1997).

Em solução aquosa, quando as moléculas encontram-se na forma agregada, o espectro de absorção da ZnPcS<sub>4</sub> apresenta duas bandas intensas: a primeira banda ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) localizada em 336 nm e uma segunda banda, chamada de banda Q ( $n \rightarrow \pi^*$ ), localizada em 636 nm. Já quando solubilizadas em DMSO, as moléculas de ZnPcS<sub>4</sub> fornecem um espectro de absorção com as bandas de máxima absorção mais estreitas e deslocadas em direção à região do vermelho, o que caracteriza o fármaco em seu estado monomérico (HOWE; ZHANG, 1997; LIU et al., 2005).

Os espectros de absorção de soluções de ZnPcS<sub>4</sub> em concentrações que variaram de 0,2 a 10 µg/mL (Figura 15) confirmam a não agregação das moléculas de ZnPcS<sub>4</sub> nesta faixa de concentração, uma vez que não houve alargamento das bandas de maior absorção do fármaco e nem deslocamento das mesmas em direção à regição UV quando a concentração foi aumentada. Sendo assim, o DMSO é um solvente promissor para se quantificar a ZnPcS<sub>4</sub> nas amostras de pele sem problemas de agregação do fármaco, o que poderia acarretar na quantificação incorreta do mesmo.



**Figura 15.** Varredura de soluções em DMSO da ZnPcS<sub>4</sub> na faixa de concentração de 0,2 e 10,0  $\mu$ g/mL.

Pode-se observar na Figura 12 que o comprimento de onda máximo ( $\lambda$ ) de absorção da ZnPcS<sub>4</sub> em DMSO é o de 679 nm. Este foi, portanto, o  $\lambda$  escolhido para quantificação da ZnPcS<sub>4</sub> nos experimentos.

# 5.1.2 Validação do método analítico

# a) Linearidade

A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que o método desenvolvido para quantificação da  $ZnPcS_4$  apresentou-se linear no intervalo de 0,25 a 7,5 µg/mL (Figura 16), com coeficiente de correlação linear adequado (r = 0,9999).



**Figura 16.** Curva analítica demonstrando a linearidade do método de análise da ZnPcS<sub>4</sub>, no intervalo de concentração entre 0,25 e 7,5  $\mu$ g/mL ( $\lambda_{MAX}$  = 679 nm). Equação da reta: y = 0,1447x + 0,0025; coeficiente de correlação linear: r = 0,9999.

### b) Sensibilidade

O limite de quantificação determinado para a ZnPcS<sub>4</sub> foi igual à menor concentração das curvas analíticas, ou seja, igual a 250 ng/mL (Tabela 2), com coeficiente de variação (CV%) igual a 2,7% e erro relativo (E%) de -4,6%, valores inferiores ao máximo preconizado na literatura (máximo de 5%) (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 2.** Parâmetros obtidos por espectrofotometria de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$  = 679 nm) para a análise da sensibilidade do método analítico para a ZnPcS<sub>4</sub>.

| Concentração |                 |        |       |
|--------------|-----------------|--------|-------|
| de ZnPcSO₄   | Absorbância*    | CV (%) | E(%)  |
| (µg/mL)      |                 |        |       |
| 0,25         | 0,037 (± 0,001) | 2,7    | -4,6  |
| 0,10         | 0,014 (± 0,001) | 8,4    | -22,8 |
| 0,08         | 0,011 (± 0,002) | 13,5   | -23,7 |
| 0,06         | 0,009 (± 0,001) | 11,1   | -25,1 |
| 0,04         | 0,006 (± 0,001) | 10,2   | -45,3 |

\*Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de 5 determinações.

c) Ensaios intra e interdia de Precisão e Exatidão

A precisão (CV%) e a exatidão (E%), expressas em porcentagem de erro (E%), analisadas intra e interdia foram satisfatórias para o composto em estudo, já que os valores de coeficiente de variação e porcentagem de erro relativo obtidos estão de acordo com o recomendado pela literatura vigente, ou seja, menores que 5% (RIBANI et al., 2004). Desta forma, na análise quantitativa do composto estudado, pode-se inferir que os valores de concentração encontrados estão muito próximos do valor real (baixas porcentagens de erro). A Tabela 3 mostra os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intradia para a ZnPcS<sub>4</sub>, utilizando-se a curva analítica para esse composto em DMSO.

| Parâmetros                  | Precisão e exatidão intradia |           |           |  |
|-----------------------------|------------------------------|-----------|-----------|--|
| Concentração                | 0.25                         | 2.5       | 7.5       |  |
| teórica (µg/mL)             | 0,25                         | 2,5       | 7,5       |  |
| Concentração                | 0,241                        | 2,524     | 7,469     |  |
| obtida (µg/mL)              | (±0,0004)                    | (±0,0012) | (±0,0088) |  |
| n <sup>a</sup>              | 3                            | 3         | 3         |  |
| Precisão (CV%) <sup>b</sup> | 0,16                         | 0,05      | 0,12      |  |
| Exatidão (E%) <sup>c</sup>  | -3,71                        | 0,94      | -0,41     |  |

**Tabela 3.** Análises de Precisão e Exatidão intra dia para a  $ZnPcS_4$  em espectrofotômetro de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$  = 679 nm).

\*Os valores entre parênteses representam os desvios - padrão de 3 determinações; a número de determinações; <sup>b</sup> expressa como coeficiente de variação (CV% = (desvio padrão/média) x 100); <sup>c</sup> expressa como porcentagem de erro (E% = [(conc. obtida – conc. teórica)/ conc. teórica] x 100).

A Tabela 4 mostra os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos interdia para a ZnPcS<sub>4</sub>, utilizando-se a curva analítica deste composto.

**Tabela 4.** Análises de Precisão e Exatidão interdia para a ZnPcS<sub>4</sub> em espectrofotômetro de UV/Vis ( $\lambda_{MAX}$  = 679 nm).

| Parâmetros                  | Precisão e exatidão interdia |          |          |  |
|-----------------------------|------------------------------|----------|----------|--|
| Concentração                |                              |          |          |  |
| teórica (µg/mL)             | 0,25                         | 2,5      | 7,5      |  |
| Concentração                | 0,241                        | 2,522    | 7,477    |  |
| obtida (µg/mL)              | (±0,002)                     | (±0,009) | (±0,010) |  |
| n <sup>a</sup>              | 9                            | 9        | 9        |  |
| Precisão (CV%) <sup>b</sup> | 0,93                         | 0,35     | 0,14     |  |
| Exatidão (E%) <sup>c</sup>  | -3,55                        | -0,87    | -0,31    |  |

\*Os valores entre parênteses representam os desvios padrões de 9 determinações; <sup>a</sup> número de determinações; <sup>b</sup> expressa como coeficiente de variação (CV% = (desvio padrão/média) x 100); <sup>c</sup> expressa como porcentagem de erro (E% = [(conc. obtida – conc. teórica)/ conc. teórica] x 100).

d) Estudo de interferência da pele na quantificação dos fármacos por espectrofotometria de UV/Vis para análise da sensibilidade do método

A análise dos espectros de varredura em UV/Vis do homogeneizado de pele de orelha de porco e de rato (Figura 17), empregadas como modelo de pele humana nos estudos de permeação cutânea *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, foi importante para se verificar possíveis interferências destes tecidos quimicamente complexos na quantificação do fármaco estudado. Foi evidente que substâncias presentes em ambas as peles absorvem mais a luz na faixa de comprimento de onda compreendida entre 300 e 500 nm, não interferindo, portanto, na análise da ZnPcS<sub>4</sub>.



**Figura 17.** Espectro de absorção em UV/Vis dos homogeneizados de pele em DMSO. (A) pele de orelha de porco sem EC, (B) EC de pele de orelha de porco, (C) pele de rato sem EC, (D) EC de pele de rato.

#### 5.1.3 Recuperação da ftalocianina da pele

O teste de recuperação da ftalocianina foi realizado com o intuito de verificar se o fármaco é adequadamente extraído da pele sob as condições de extração empregadas. O DMSO foi escolhido como solvente extrator porque a ZnPcS<sub>4</sub> não agrega na sua presença (Figura 15) e pelo fato deste solvente ser o que melhor conseguiu extrair o composto em estudo das camadas da pele se comparado aos outros solventes testados (água e metanol). Alguns trabalhos já relatam a eficiente extração de vários corantes da pele com o uso do DMSO, demonstrando sua alta aplicabilidade para este fim (VALIANOU et al., 2009).

A Tabela 5 mostra que, dentro das condições estabelecidas, o solvente empregado (DMSO) foi capaz de extrair a ftalocianina de zinco a partir da pele de orelha de porco em quantidades detectáveis pelo método de análise validado, apresentando valores de recuperação acima de 85%. Desta forma, a determinação das quantidades de ZnPcS<sub>4</sub>, retidas na pele após os experimentos de permeação cutânea, foi realizada de maneira confiável.

| Concentração      | Epiderme sem o EC           |                 | EC                                    |                 |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| teórica (µg/ml) ª | [] <sup>b</sup> obtida ± DP | %R <sup>c</sup> | [] <sup>b</sup> <sub>obtida</sub> ±DP | %R <sup>c</sup> |
| 1,6               | 1,429 ±(0,035)              | 89,3            | 1,519 (±0,020)                        | 94,9            |
| 3,2               | 2,766 (±0,124)              | 86,4            | 2,965 (±0,139)                        | 92,7            |
| 6,4               | 5,486 (±0,146)              | 85,7            | 5,905 (±0,131)                        | 92,3            |

**Tabela 5.** Parâmetros do estudo de recuperação da ZnPcS<sub>4</sub> da epiderme de orelha de porco sem o EC e do EC.

<sup>a</sup> concentração de fármaco colocada em contato com a pele; <sup>b</sup> concentração de fármaco extraída da pele; <sup>c</sup> porcentagem de recuperação do fármaco da pele; O experimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

#### 5.2 Estudos in vitro de permeação e retenção cutânea da ZnPcS<sub>4</sub>

As soluções receptoras relativas a todos os experimentos de permeação realizados, passivos e de iontoforese, foram analisadas ao final das 6 h de experimento com o intuito de se determinar a quantidade de ZnPcS<sub>4</sub> que atravessou a pele. O fármaco não foi detectado, no entanto, na solução receptora de nenhum deles. O método analítico utilizado para se quantificar a ZnPcS<sub>4</sub> nessas soluções aquosas foi padronizado por Gelfuso (2006), com limite de quantificação de 700 ng/mL. Pode-se afirmar, portanto, que se a ZnPcS<sub>4</sub> conseguiu atravessar a pele após 6 h de iontoforese nas diferentes condições experimentais, a concentração da solução receptora foi menor do que 700 ng/mL. Estes resultados são de grande importância, visto que para que um agente fotossessibilizante consiga exercer sua atividade citotóxica dentro de tumores cutâneos é importante que ele consiga chegar às camadas profundas da pele. No entanto, como o objetivo deste trabalho é realizar a aplicação tópica da formulação desenvolvida para o tratamento de tumores cutâneos deve-se evitar que ocorra a permeação do fármaco através da pele e que o mesmo atinja a circulação sanguínea, a fim de evitar efeitos colaterais sistêmicos.

Como dito anteriormente, para que o agente fotossensibilizante possa ser empregado no tratamento de doenças cutâneas através de sua administração tópica é interessante que ele não chegue na solução receptora, para evitar efeitos colaterais, mas é fundamental que haja penetração da substância em quantidades adequadas nas camadas profundas da pele, ou seja, é necessário que o fármaco consiga atravessar o EC (FABRIS et al., 2006) e atinja as camadas profundas da pele para ter acesso aos tumores aí presentes. Sendo assim, as diferentes camadas da pele (EC e epiderme viável) foram analisadas quanto a presença de ZnPcS<sub>4</sub> de forma quali e quantitativa, como descrito a seguir.

Qualitativamente, após a retirada da formulação do contato com a pele (lavada abundantemente com água destilada e seca com papel absorvente), observou-se, a olho nu, uma coloração azul, característica da ZnPcS<sub>4</sub>, nas áreas da pele que tiveram contado com as formulações. Essa coloração apresentou-se homogeneamente distribuída nos experimentos de aplicação passiva (Figura 18A) e por iontoforese anódica (Figura 19A), mas heterogênea e localizada nas aberturas dos folículos pilosos, nos experimentos de iontoforese catódica (Figuras 20A e 21A), indicando acúmulo do fármaco nesses locais. A partir desta observação, inferiu-se que a principal via de penetração da ZnPcS<sub>4</sub> na presença da iontoforese é através dos folículos pilosos (transporte folicular do fármaco), confirmando a importância da via folicular como via de penetração de fármacos através da pele por iontoforese (BARRY, 2001, KASSAN et al., 1996). A penetração da ZnPcS<sub>4</sub> pela via folicular pode ser bastante vantajosa para o tratamento de patologias que ocorram nesta região da pele. O epitélio folicular, por exemplo, é o ponto de origem da doença de Bowen. O aumento da quantidade de fármaco neste local, ocasionado pela aplicação da iontoforese, pode contribuir para o tratamento mais eficiente e localizado desta patologia (WELCH et al., 1997). Nossos resultados mostram que a TFD tópica com a ZnPcS<sub>4</sub> administrada por iontoforese catódica pode ser uma alternativa para o tratamento desta patologia.



**Figura 18.** Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de permeação passiva de gel de HEC com NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>.**A:** Pele antes da retirada do EC (EC); **B:** Pele após a retirada do EC.



**Figura 19.** Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de iontoforese anódica de gel de HEC com NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>. **A:** Pele antes da retirada do EC (EC); **B:** Pele após a retirada do EC.



**Figura 20.** Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de iontoforese catódica de gel de HEC com NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>. **A:** Pele antes da retirada do EC (EC); **B:** Pele após a retirada do EC.



**Figura 21.** Fotografia da pele de orelha de porco obtida após 6 horas de iontoforese catódica de gel de HEC sem NaCl contendo 0,1% de ZnPcS<sub>4</sub>.**A:** Pele antes da retirada do EC (EC); **B:** Pele após a retirada do EC.

Ainda com relação a observação da ZnPcS₄ na pele a olho nu, pode-se notar nas Figuras 18 a 21, que a coloração da pele é bem mais intensa nas áreas submetidas a iontoforese catódica (Figuras 20 e 21) do que nas outras (Figuras 18 e 19), indicando maior penetração de fármaco na pele quando a iontoforese catódica foi aplicada.

Com o intuito de verificar se essa coloração persistia nas camadas mais profundas da pele ou se estava presente apenas nas camadas superiores, o EC foi retirado e a epiderme viável (pele sem EC) analisada (Figuras 18B a 21B). Como pode ser notado nas Figuras 20B e 21B, a coloração intensa permaneceu na epiderme viável das peles submetidas a iontoforese catódica, mas desapareceu nas outras (Figuras 18B e 19B). Esses resultados indicam que a iontoforese catódica não apenas aumentou a penetração da ZnPcS<sub>4</sub> no EC como também fez com que ela atingisse as camadas mais profundas da pele, onde se localizam os tumores cutâneos.

Esses resultados qualitativos foram confirmados pela análise quantitativa da ZnPcS<sub>4</sub> no EC e na epiderme viável. As Figuras 22 e 23 representam graficamente as quantidades de ZnPcS<sub>4</sub> retidas no EC e na epiderme viável, respectivamente, após aplicação da iontoforese catódica da formulação contendo ou não 89.5 mM de NaCl, iontoforese anódica da formulação contendo NaCl e permeação passiva.



**Figura 22.** ZnPcS<sub>4</sub> no EC após 6 h de iontoforese catódica e anódica e permeação passiva. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de 5 determinações. (\* P < 0,05; <sup>#</sup> P < 0,05, teste de Tukey).



**Figura 23.** ZnPcS<sub>4</sub> na epiderme sem o EC após 6 h de iontoforese catódica e anódica e permeação passiva. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de 5 determinações. **a** e **b**: valores abaixo do limite de quantificação do método (\*P < 0,05, teste de Tukey).
Pela análise dos dados apresentados nos gráficos acima, tem-se que a penetração passiva e iontoforética anódica da ftalocianina retida no EC foi muito baixa e que nessas duas condições o fármaco atingiu a epiderme em quantidades tão baixas que não foi possível quantificá-las através do método analítico validado, já que os valores obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação do método.

De fato, a baixa penetração passiva da ZnPcS<sub>4</sub> já era esperada, uma vez que esta molécula tem um peso molecular relativamente elevado (898,15 g/mol) e apresenta em sua estrutura um átomo de zinco e quatro grupos carregados negativamente, o que dificulta o seu transporte através do EC da pele. A baixa penetração passiva do fármaco, desta forma, justifica o uso da iontoforese para promover uma maior entrada dele na pele.

No entanto, quando em contato com o eletrodo positivo (iontoforese anódica), esperava-se que a iontoforese aumentasse a penetração cutânea da ZnPcS<sub>4</sub>, aniônica, por contribuição do fluxo eletrosmótico que há deste eletrodo em direção ao cátodo quando a solução doadora se encontra em pH acima de 4,5 (GELFUSO et al., 2008). Este aumento de permeação ocorreu de forma pouco significativa, como pode ser observado na Figura 22, e uma explicação para isto seria a atração do fármaco que apresenta cargas negativas pelo eletrodo positivo, impedindo seu transporte anódico. Resultados semelhantes ao nosso foram observados em estudos feitos com o fosfato de dexametasona, sob condições em que suas moléculas apresentavam duas cargas negativas e demonstrou-se que a iontoforese anódica deste fármaco também foi ineficiente (SYLVESTRE et al., 2008).

Por outro lado, quando colocado em contato com o eletrodo negativo (iontoforese catódica), a ZnPcS<sub>4</sub> teve sua penetração cutânea aumentada significativamente (P<0,05). Tem-se agora, obviamente, a contribuição

eletrorrepulsiva como principal fator para explicar a maior entrada de fármaco na pele por iontoforese, devido a semelhança de polaridade entre as moléculas do fármaco e o eletrodo, propiciando a eletrorepulsão.

Ainda de acordo com os resultados apresentados nas Figuras 22 e 23, verificou-se que a ausência de NaCl no experimento de iontoforese catódica promoveu um aumento significativo da retenção da ZnPcS₄ tanto no EC (cerca de 2 vezes) como na epiderme viável (cerca de 5 vezes) em relação aos experimentos realizados na presença deste sal. É importante destacar que a presença de íons Cl<sup>-</sup> no cátodo não é necessária para garantir a ocorrência de reações no eletrodo, já que o eletrodo de AgCl libera Cl<sup>-</sup> durante a passagem de corrente elétrica. Em ambas as situações a voltagem de cada célula foi monitorada durante as 6 h de experimentos realizados na ausência de NaCl, indicando que não faltaram íons no sistema para conduzir a corrente elétrica, que foi mantida constante durante as 6 h.

A diminuição da penetração do fármaco por iontoforese catódica quando o NaCl estava presente na formulação pode ser explicada pela competição do íon cloreto com os íons  $ZnPcS_4^{4-}$  pelo transporte de corrente, levando a uma menor penetração de  $ZnPcS_4$  no EC e na epiderme viável (SYLVESTRE et al., 2008).

A iontoforese anódica da formulação na ausência de NaCl não foi avaliada no sentido de se comparar a influência da presença ou não do NaCl sobre a penetração do fármaco na pele, pois os íos Cl<sup>-</sup> precisam estar presentes na formulação quando em contato com eletrodo positivo porque reagem com a Ag para garantir a passagem de corrente elétrica.

Com base nesses resultados decidiu-se então partir para os estudos *in vivo* administrando a formulação de ZnPcS<sub>4</sub> sem NaCl por iontoforese catódica devido a

maior penetração nas camadas profundas da pele conferidas quando a iontoforese foi aplicada nessas condições. Experimentos passivos, sem corrente elétrica, foram feitos para efeito comparativo.

#### 5.3 Estudos de permeação iontoforética in vivo

Os estudos *in vitro* foram realizados com o intuito de entender a influência da iontoforese na penetração da ZnPcS<sub>4</sub> e escolher a formulação que mais aumentou a penetração cutânea do fármaco. Nesses estudos, no entanto, a pele não se apresenta viável. Neles, apenas o EC, que é uma barreira formada por células mortas, apresenta-se com a mesma estrutura da pele *in vivo*.

Estudos realizados recentemente *in vivo* em ratos relataram que a regressão tumoral por TFD está diretamente relacionada com a concentração do fármaco no seu sítio de ação (BAI et al., 2009). Em outro estudo, foi demonstrado que o agente fotossensibilizante Pc4, uma ftalocianina lipofílica, distribui-se de forma heterogênea na mesma lesão (a superfície apresentou uma maior quantidade de composto que as regiões mais profundas da lesão) e entre diferentes lesões (LEE et al., 2008), dificultando o tratamento e a regressão tumoral. Sendo assim, como a distribuição, além da concentração, da ZnPcS<sub>4</sub> na epiderme viável e derme é uma condição importante para o sucesso da TFD tópica, e como ela não pode ser avaliada adequadamente na epiderme viável em estudos *in vitro*, os estudos *in vivo* foram conduzidos na tentativa de avaliar esta distribuição.

Os experimentos *in vivo* foram realizados empregando-se como modelo animal ratos Wistar, um modelo *in vivo* de penetração cutânea, já empregado em nosso laboratório (GELFUSO, 2008) e que oferece facilidade nos estudos realizados. É importante salientar que comparações entre as quantidades de fármaco penetradas na pele *in vitro* e *in vivo* devem ser feitas com muito cuidado, principalmente porque os modelos animais utilizados nos dois experimentos foram diferentes. Várias são as diferenças entre as peles dos dois modelos. A espessura do EC é maior na pele de porco, por exemplo, e a densidade de folículos totais por área é aproximadamente 123 vezes maior na pele de rato do que na pele de porco (STAHL et al., 2009). Além disso, o ponto isoelétrico da pele de rato é maior do que o da pele de porco (LUZARDO-ALVAREZ et al., 1998), conferindo menor residual de cargas negativas na pele do primeiro quando em contato com formulação em pH fisiológico. Esse menor residual negativo da pele de rato pode tanto facilitar a penetração passiva da ftalocianina negativa neste modelo, devido a menor repulsão entre o fármaco e a pele, como dificultar a penetração iontoforética devido a diminuição do fluxo eletrosmótico (que é maior quanto maior o residual negativo da pele) (LOPEZ et al., 2004).

Resumidamente, os estudos *in vivo* na pele de rato permitem: (i) observar a distribuição do fármaco na epiderme viável, (ii) determinar a influência do tempo de aplicação da formulação na extensão da quantidade de fármaco que penetra na pele, e (iii) estimar o tempo de aplicação e padronizar condições experimentais para os estudos que serão conduzidos nas células tumorais *in vivo* (que devem ser realizados no mesmo modelo animal).

Para se verificar a distribuição da  $ZnPcS_4$  após sua administração tópica *in vivo*, a pele dos animais foi tratada com 0,1%  $ZnPcS_4$  sem NaCl com aplicação passiva por 5, 15 e 60 minutos, e por iontoforese catódica durante 5 e 15 min. Em seguida, a pele foi observada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) (Figuras 24, 25 e 26).



**Figura 24.** Fotomicrografias da pele de ratos Wistar (cortada transversalmente) tratada durante 5 min com gel de HEC contendo 0,1% do ZnPcS<sub>4</sub>. As amostras de pele foram analisadas empregando uma objetiva de 40 x e uma fonte de laser de 633 nm para excitação e uma banda de emissão de 640–800 nm. (A) pele não tratada com fármaco, (B) aplicação passiva, (C) iontoforese catódica (0,5 mA/cm<sup>2</sup>). E+D: epiderme + derme, EC: estrato córneo.



**Figura 25.** Fotomicrografias da pele de ratos Wistar (cortada transversalmente) tratada durante 15 min com gel de HEC contendo 0,1% do ZnPcS<sub>4</sub>. As amostras de pele foram analisadas empregando uma objetiva de 40 x e uma fonte de laser de 633 nm para excitação e uma banda de emissão de 640–800 nm. (A) pele não tratada com fármaco, (B) aplicação passiva, (C) iontoforese catódica ( $0,5 \text{ mA/cm}^2$ ). E+D: epiderme + derme, EC: estrato córneo.



**Figura 26.** Fotomicrografias da pele de ratos Wistar (cortada transversalmente) tratada durante 1 hora com gel de HEC contendo 0,1% do  $ZnPcS_4$ . As amostras de pele foram analisadas empregando uma objetiva de 40 x e uma fonte de laser de 633 nm para excitação e uma banda de emissão de 640–800 nm. (A) pele não tratada com fármaco, (B) aplicação passiva. E+D: epiderme + derme, EC: estrato córneo.

Após 5 min de tratamento, a ZnPcS<sub>4</sub> não penetra nem no EC quando administrada passivamente (Figura 24B). A aplicação da iontoforese catódica por este rápido período permitiu observar uma alta intensidade de fluorescência, relativa à ZnPcS<sub>4</sub>, não apenas no EC, mas também na epiderme viável (Figura 24C), indicando que a aplicação da corrente elétrica facilitou a penetração do fármaco. Observa-se também na Figura 24C, que esta fluorescência se concentra nos

folículos pilosos, confirmando a contribuição da via de penetração folicular, observada visualmente nos experimentos *in vitro* (Figuras 20 e 21), quando a iontoforese é aplicada.

O aumento do tempo de contato da formulação contendo o fármaco com a pele, de 5 min para 15 min, permitiu que uma leve fluorescência fosse observada nas camadas mais superficiais da pele após a aplicação passiva (Figura 25B). A aplicação da iontoforese catódica, como esperado, aumentou significativamente a intensidade de fluorescência (Figura 25C). Note na Figura 25C que após os 15 min de iontoforese, a fluorescência apresenta-se homogeneamente distribuída na epiderme e derme, indicando que o fármaco, hidrofílico, que permeou principalmente pela via folicular quando a iontoforese foi aplicada, se distribui homogeneamente nessa região mais hidrofílica da pele quando consegue atravessar a barreira lipofílica (EC). Para verificar se com a aplicação passiva da formulação por um tempo maior que 15 minutos o fármaco consegue chegar em grandes quantidades às camadas mais profundas da pele como observado para os 15 minutos de iontoforese, a formulação foi aplicada durante 60 minutos. Observando a Figura 26B, é possível afirmar que o tempo maior de aplicação passiva não levou a um aumento da fluorescência quando comparado aos 15 minutos de aplicação na mesma condição (Figura 25B).

Esses resultados demonstraram que o tempo de aplicação da formulação para o experimento de permeação passiva não exerceu tanta influência na penetração cutânea do fármaco. Ao contrário dos experimentos em que houve aplicação da iontoforese, em que o tempo de aplicação exerce grande influência na quantidade do fármaco que penetra na pele, já que com tempos maiores de aplicação ocorre uma maior penetração do fármaco. Esses dados são bastante importantes, visto que a quantidade de fármaco

acumulada no tumor é um parâmetro que exerce grande influência na eficiência de seu tratamento por TFD. Quantidades insuficientes de fármaco no tumor são incapazes de promover uma resposta significativa contra o mesmo por TFD. A iontoforese aumenta consideravelmente a penetração cutânea do agente fotossensibilizante em estudo em um curto período de tempo e é possível controlar a quantidade e a profundidade que o fármaco penetra na pele de acordo com o tempo de aplicação da corrente elétrica.

Para se confirmar se a fluorescência observada nas imagens obtidas por microscopia confocal foi proporcional à quantidade de fármaco que penetrou na pele, a ZnPcS<sub>4</sub> foi extraída do EC e da epiderme viável, separadamente, como descrito no item 4.2.1.3, e quantificada. A Figura 27 representa graficamente as quantidades de ZnPcS<sub>4</sub> presentes no EC e na epiderme viável após os 15 e 60 minutos de aplicação passiva da formulação e 15 minutos de iontoforese catódica.



**Figura 27.** ZnPcS<sub>4</sub> no EC e epiderme viável após iontoforese catódica e permeação passiva do gel de HEC contendo ZnPcS<sub>4</sub> a 0,1% na ausência de NaCl. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  DP de 5 determinações. <sup>#</sup>P < 0,05 (Teste de Tukey).

Pode-se observar, na Figura 27, que não houve uma diferença significativa na quantidade de fármaco presente nas diferentes camadas da pele após a permeação passiva por 15 e 60 minutos. Por outro lado, quando a iontoforese foi aplicada por 15 minutos, houve uma maior penetração do fármaco nas camadas mais profundas da pele (cerca de 11 vezes quando comparado à condição passiva) (teste da Tukey, P > 0,05).

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a iontoforese catódica mostrou-se ser uma técnica capaz de transportar grandes quantidades de ZnPcS<sub>4</sub> para as camadas profundas da pele rapidamente. A incorporação da ZnPcS<sub>4</sub> no gel de HEC possibilitou a aplicação da corrente elétrica *in vivo* sem problemas de escorrimento ou contato inadequado da formulação com o eletrodo.

# 5.4 Citotoxicidade sob diferentes concentrações de ZnPcS<sub>4</sub> e doses de radiação

Com o intuito de verificar se a concentração de ZnPcS<sub>4</sub> que chega a epiderme viável, após os experimentos de penetração, é suficiente para causar morte celular de células tumorais cutâneas empregando TFD, estudos em cultura de carcinoma de células escamosas humanas A431 foram realizados em função da concentração do fármaco e da intensidade de luz aplicada.

Durante a TFD, é desejável que o fármaco empregado no tratamento apresente a mínima toxicidade na ausência de irradiação. Nota-se, pelos resultados obtidos (Figura 28), que quando a placa não sofreu irradiação (sem fotoestímulo) a citotoxicidade do fármaco para todas as concentrações testadas (0,01 µg/mL a 100 µg/mL) ficou abaixo de 12%. No entanto, quando as células foram fotoestimuladas, o fármaco apresentou citotoxicidade em todas as concentrações estudadas. Pode-se

notar que essa citotoxicidade é mais intensa para maiores concentrações de fármaco (Figura 28). Vale ressaltar também que quanto maior a dose de irradiação, maior a citotoxicidade do fármaco.



**Figura 28**: Viabilidade celular (%) após irradiação das células A 431 nas placas de 96 poços, na densidade de 1 x  $10^5$  células por poço, em 660 nm, com doses de irradiação de 0,2; 1,0 e 5 J/cm<sup>2</sup>, verificada pelo teste do MTT. Os resultados representam média ± EPM de 4 determinações. \* P < 0,05 comparado com controle (sem fotoestímulo). Teste de Dunnett's.

Pode-se observar, na Figura 28, que concentrações de ZnPcS<sub>4</sub> maiores do que 10 µg/mL, ou seja, 2 µg de fármaco por poço com células, são necessários para matar ao menos 60% das células tumorais. Quando a ZnPcS<sub>4</sub> foi aplicada passivamente nos estudos *in vivo*, apenas cerca de 1,3 µg de fármaco foi recuperado em 1 cm<sup>2</sup> de epiderme viável. Mais ainda, quando este estudo foi realizado *in vitro*, em pele de porco, com estrato córneo com espessura mais semelhante a pele humana do que a fina pele de rato, o fármaco não pode nem ser quantificado na epiderme viável, indicando que

quantidades muito baixas do fármaco estão presentes na epiderme viável após 6 h de aplicação passiva. A aplicação da iontoforese, no entanto, permitiu que quantidades maiores do que 10 µg atravessassem o EC e atingissem a epiderme viável tanto nos estudos *in vitro* como nos *in vivo*, o que corresponderia a uma concentração de 50 µg/mL nos ensaios de citotoxicidade. Essa quantidade de ZnPcS<sub>4</sub> parece ser suficiente para matar uma alta porcentagem de células tumorais na presença de irradiação, como indicado na Figura 28.

5.5 Estudo do efeito citotóxico da ZnPcS₄ em solução aquosa na presença e ausência de uma corrente elétrica de baixa intensidade em células de carcinoma epidermal escamoso A431.

Os estudos de citotoxicidade da ZnPcS₄ em solução aquosa sobre células A431 com a aplicação de corrente elétrica foram realizados com intuito de verificar se a corrente, além de aumentar a penetração do fármaco na pele, também é capaz de permeabilizar a célula, o que promoveria um aumento na entrada do fármaco para o interior desta. Taveira et al. (2009) avaliaram o efeito citotóxico da doxorubicina, fármaco carregado positivamente, associado à aplicação de corrente elétrica em cultura de células tumorais B16F10. Os autores demonstraram que a corrente elétrica foi capaz de aumentar o efeito citotóxico do fármaco significativamente.

Dessa forma, neste estudo grupos foram avaliados:

Grupo 1: controle

Grupo 2: apenas ZnPcS<sub>4</sub>;

Grupo 3: apenas radiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup>

Grupo 4: radiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup> mais ZnPcS<sub>4</sub>;

Grupo 5: radiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup> mais corrente elétrica na densidade de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>;

Grupo 6: radiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup> mais corrente elétrica na densidade de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> mais ZnPcS<sub>4</sub>.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma viabilidade em torno de 80% para esta linhagem celular quando as células foram tratadas apenas com o fármaco ou então com a radiação de 5,0 J/cm<sup>2</sup> mais aplicação de corrente elétrica (Figura 29).

Quando as células foram tratadas com ZnPcS<sub>4</sub> e posteriormente irradiadas, observou-se uma redução na viabilidade celular para 30%, o mesmo efeito observado quando as células foram tratadas com a ZnPcS<sub>4</sub> com aplicação de corrente elétrica e posterior irradiação. Dessa forma, ficou demonstrado que a aplicação de corrente elétrica na cultura de céluas não aumentou o efeito citotóxico da ZnPcS<sub>4</sub> sob as condições testadas (Figura 29). Tal fato pode estar relacionado com a atração das moléculas do fármaco carregadas negativamente pelo pólo positivo do circuito, o que poderia mascarar um possível efeito positivo da eletrorrepulsão gerada pela repulsão entre o pólo negativo do circuito e as moléculas de ZnPcS<sub>4</sub> carregadas negativamente, o que levaria teoricamente a um aumento no transporte do fármaco para dentro das células. Tal fato deve estar relacionado com a inserção dos dois pólos do circuito dentro de um mesmo compartimento.



**Figura 29**: Viabilidade celular (%) com ou sem aplicação de corrente elétrica após irradiação das células A 431 nas placas de 24 poços, na densidade de 5 x  $10^5$  células por poço, em 660 nm, com dose de irradiação de 5 J/cm<sup>2</sup>, verificada pelo teste do MTT. Os resultados representam média ± EPM de 3 determinações. \* P < 0,05 comparado com controle (sem fotoestímulo). Teste de Tukey.

## 6. CONCLUSÃO

O método proposto para quantificação da ZnPcS<sub>4</sub> por espectrofotometria de UV/Vis mostrou-se adequado, apresentando valores satisfatórios de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade. A formulação sem NaCl submetida à iontoforese foi a que apresentou maior retenção cutânea do fármaco nos experimentos in vitro, sendo a escolhida para os experimentos in vivo. Nos experimentos in vivo, foi visualizado por microscopia confocal de varredura a laser e mostrado quantitativamente que a iontoforese foi capaz de promover um aumento significativo da entrada da ZnPcS<sub>4</sub> para camadas mais profundas da pele em um curto período de tempo e que esta entrada se deu principalmente através dos folículos pilosos da pele. A ftalocianina apresentou-se homogeneamente distribuída na epiderme viável. Com relação aos experimentos de citotoxicidade realizados em cultura de células tumorais, vale ressaltar que a ZnPcS<sub>4</sub> foi capaz de promover toxicidade celular e que esse efeito está diretamente relacionado com as concentrações de fármaco e doses de irradiação empregadas, obtendo-se um maior efeito citotóxico em concentrações do fármaco e doses de irradiação maiores. Correlacionando-se os estudos in vitro de citotoxicidade celular e os de iontoforese in vivo, verificou-se que a quantidade de ZnPcS<sub>4</sub> que chegou às camadas profundas da pele é citotóxica in vitro na presença de irradiação. O rápido acúmulo cutâneo da ftalocianina através das condições estudadas mostra que este tipo de sistema é bastante promissor na terapia tópica de tumores cutâneos por TFD.

## 7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); *Resolução RE nº* 899, de 29/05/2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899-03.htm.

ALLÉMANN, E.; BRASSEUR, N.; KUDREVICH, S.V.; MADELEINE, C.; VAN LIER, J.E. Photodynamic activities and biodistribution of fluorinated zinc phthalocyanine derivatives in the murine EMT-6 tumour model. **Int. J. Cancer**, v.72, p.289-294, 1997.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, 8–18, 2001.

BADRAN, M.M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) *in vitro*: Dependency on needle size and applied formulation. **Eur. J. Pharm. Sci.,** v. 36, p. 511-523, p. 2008.

BAI, L.; GUO, J.; BONTEMPO, F.A.; EISEMAN, J.L. The Relationship of Phthalocyanine 4 (Pc 4) Concentrations Measured Noninvasively to Outcome of Pc 4 Photodynamic Therapy in Mice. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1011–1019, 2009.

BALL, D.J.; MAYHEW, S.; WOOD, S.R.; GRIFFITHS, J.; VERNON, D.I.; BROWN, S. B. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge, **Photochem. Photobiol.**, v.69, p. 390-396, 1999.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 101–114, 2001.

BEEBY, A.; FITZGERALD, S.; STANLEY, C. F. Protonation of tetrasulfonated zinc phthalocianine in aqueous acetonitrile solution, **Photochem. Photobiol**., v.74, p. 566-569, 2001.

BRASSEUR, N.; ALI, H.; LANGLOIS, R.; WAGNER, J.R.; ROSSEAU, J.; VAN LIER, J. Biological activities of phtalocyanines-V. Photodynamic therapy of EMT-6 mammary tumors in mice with sulfonated phthalocyanines. **Photochem. Photobiol.**, v.45, n.5, p.581-586, 1987.

BRAULT, D. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. J. Photochem. Photobiol. B, v. 6(1-2), p. 79-86, 1990.

BREMNER, J.C.M.; WOOD, S.R.; BRADLEY, J.K.; ADAMS, G.E.; BROWN, S.B. 31P magnetic resonance spectroscopy as a predictor of efficacy in photodynamic therapy using differently charged zinc phthalocyanines, **Br. J. Cancer**, v. 81, p. 616-621, 1999.

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

BUBEDDU, R.; CANTI, G.; ANDREA, D.C.; PIFFERI, A.; TARONI, P.; TORRICELLI, A.; VALLENTINE, G. Effects of photodynamic therapy on the absorption properties of disulfonated aluminum phtalocyanine in tumor-bearing mice, **J. Photochem. Photobiol.**, v. 60, p. 73-78, 2001.

CAMPOS, L.M.P. Microemulsões como sistema de liberação tópica para a veiculação do 5-ALA, H-ALA e do O-ALA para uso na terapia fotodinâmica do câncer de pele: obtenção, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* de permeação cutânea. 2006. 195f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

CHIEN, Y.W.; BANGA, A.K. Iontophoretic (transdermal) delivery of drugs: overview of historical development. **J. Pharm. Sci**., v.78, n.5, p.353-4, 1989.

CRISTÓBAL, J.; STOCKERT, J.C.; VILLANUEVA, A.; RELLO-VARONA, S.; JUARRANZ, A.; CAÑETE, M. Caspase-2: A possible trigger of apoptosis induced in A-549 tumor cells by ZnPc photodynamic treatment. **Int. J. Oncology,** v. 28, p. 1057-1063, 2006.

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, p.55-64, 1991.

DENET, A.R.; VANBEVER, R.; PREAT, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev**., v. 56, p. 659-674, 2004.

DE ROSA, F. S., BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives, **Pharm. Res**., v. 17, p. 1447-1455, 2000.

DIXON, D.W.; STEULLET, V. Dimerization of tetracationic pophyrins: ionic strength dependence, **J. Inorg. Biochem**., v. 69, p. 25-32, 1998.

FABRIS, C.; SONCIN, M.; MIOTTO, G.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; DEI, D.; RONCUCCI, G.; JORI, G. Zn (II) – phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous disases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. **Journal of Phtochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, p. 48-53, 2006.

FADEL, M.; KASSAB, K.; FADEEL, D.A. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. **Lasers Med. Sci**, v. 25, p. 283–292, 2010.

FERNÁNDEZ, D.A.; AWRUCH, J.; DICELIO, L.E. Synthesis and photophysical properties of a new cationic water-soluble Zn phthalocyanine, **Photochem. Photobiol.**, v. 41, p. 227-232, 1997.

GELFUSO, G. M. Iontoforese de cerivados catiônicos e aniônicos de porfirinas e ftalocianinas de zinco: otimização de formulações e da liberação iontoforética in vitro e in vivo. Ribeirão Preto, 2006 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

GELFUSO, G. M.; FIGUEIREDO, F. V.; GRATIERI, T.; LOPEZ, R.F.V. The effects of pH and ionic strength on topical delivery of a negatively charged porphyrin (TPPS<sub>4</sub>). **J. Pharm. Sci**., v. 97, n. 10, p. 4249-4257, 2008.

GELFUSO, G.M.; GRATIERI, T.; SOUZA, J.G.; THOMAZINE, J.A.; LOPEZ, R.F.V. The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 249–256, 2011.

GEORGE, J.E.; AHMAD, Y.; VARGHAI, D.; LI, X.; BERLIN, J.; JACKOWE, D.; JUNGERMANN, M.; WOLFE, M.S.; LILGE, L.; TOTONCHI, A.; MORRIS, R.L.; PETERSON, A.; LUST, W.D.; KENNEY, M.E.; HOPPEL, C.L.; SUN, J.; OLEINICK, N.L.; DEAN, D. Pc 4 Photodynamic Therapy of U87-Derived Human Glioma in the Nude Rat. Lasers in Surgery and Medicine, v. 36, p. 383–389, 2005.

GERSCHER, S.; CONNELLY, J.P.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J., MACROBERT, A. J., WATT, P., RHODES, L. E. A quantitative assessment of protoporphyrin IX metabolism and phototoxicity in human skin following dose-controlled delivery of the prodrugs 5-aminolaevulinic acid and 5-aminolaevulinic acid*n*-pentylester, **Br. J. Dermatol.**, v.144, p. 983-990, 2001.

GIBSON, S.L.; HAVENS, J.J.; FOSTER, T.H.; HILF, R. Time-dependent intracellular accumulation of d-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity, **Photochem. Photobiol**., v. 65, n. 3, p. 416 – 421, 1997.

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

GLOSTER, H. M.; BRODLAND, D. G. The epidemiology of skin cancer. **Dermatol. Surg.**, v. 22, p. 217-26,1996.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 6, 1490-1498, 2008.

GUY, R.H.; HADGRAFT, J. **Transdermal Drug Delivery**. Chapter 1, 2° Edition, 2003.

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

HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. Lancet Oncol., v. 1, p. 212–19, 2000.

HOUWE, L.; ZANG, J.Z. Ultrafast Studies of Excited-State Dynamics of Phthalocyanine and Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate in Solution. J. Phys. Chem. A, v. 101, p. 3207-3213, 1997.

HOUWE, L.; ZANG, J.Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excetedstate dynamics of zinc phtalocyanine tetrasulfonated in solution, **Photochem. Photobiol.**, v. 67, p. 90-96, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – MINISTÉRIO DA SAÚDE. www.inca.gov.br, acessado em abril de 2010.

JADOUL, A.; BOUWSTRA, J.A.; PREAT, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: review on the biophysical studies, **Adv. Drug Deliv. Rev**., v. 35, p. 89-105, 1999.

JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. Vogel: **Análise Química Quantitative.** 5<sup>a</sup> ed. LTC Editora: Rio de Janeiro, 1992.

JERANT, A.F.; JOHNSON, J.T.; SHERIDAN, C.D.; CAFFREY, T. J. Early Detection and Treatment of Skin Cancer. **Am. Fam. Physician**, v. 62, p. 357-68, 375-6, 381-2, 2000.

KAESTNER, L.; CESSON, M.; KASSAB, K.; CHRISTENSEN, T.; EDMINSON, P.D., COOK, M.J.; CHAMBRIER, I.; JORI, G. Zinc octa-*n*-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 2, p. 660–667, 2003.

KAI, S.; HIRAMITSU, S.; SUZUKI, M.; MASAKI, Y. Synthesis and photodynamic activity of a cationic zinc monoazaporphyrin bearing a nitrogen atom at the peripheral position, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 363-365, 2001.

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

KANIKKANNAN, N., SINGH, J., RAMARAO, P. Transdermal iontophoretic delivery of bovine insulin and monomeric human insulin analogue. **J. Contr. Rel**., v. 59, p. 99-105, 1999.

KASSAN, D.G.; LYNCH, A.M.; STILLER, M.J. Physical enhancement of dermatologic drug lontophoresis and phonophoresis. **J. Am. Acad. Dermatol**., v. 34, p. 657-66, 1996.

KYRIAZI, M.; ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; RALLIS, M.; TREBST, T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 87–94, 2008.

LEE, R. D.; WHITE, H.S.; SCOTT, E. R. Visualization of iontophoretic transport paths in cultured and animal skin models. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p.1186-90, 1996.

LIU, W.; JENSEN, T.J.; FRONCZEK, F.R.; HAMMER, R.P.; SMITH, K.M.; VICENTE, M.G.H. Synthesis and Cellular Studies of Nonaggregated Water-Soluble Phthalocyanines. **J. Med. Chem**., V. 48, 1033-1041, 2005.

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

LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis, **J. Control. Rel**., v. 88, p. 65-70, 2003-A.

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

LOPEZ, R.F.V.; LANGE, N.; GUY, R.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug Del. Reviews**, v.56, p.77-94, 2004.

LOPEZ, R.F.V.; SETO, J.E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, n.3, p.33-41, 2011.

LUZARDO-ALVAREZ, A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, M.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Iontophoretic permselectivity of mammalian skin: characterization of hairless mouse and porcine membrane models. **Pharm. Res**.; v. 15(7), p. 984-7, 1998.

MARKS, R. The epidemiology of non-melanoma skin cancer: who, why and what can we do about it. **J. Dermatol.**, v. 22, p. 853-7, 1995.

MARRO, D.; KALIA, Y.N.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Contributions of eletromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharm. Res.**, v.18, n.12, p.1701-8, 2001.

MENEZES, P.F.C. Estudos espectrocópios e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser, in Instituto de Química de São Carlos-IQSC, Universidade de São Paulo-USP: São Carlos, p. 154p, 2007.

MILLER, J. D.; BARON, E. D.; SCULL, H.; HSIA, A.; BERLIN, J. C.; MCCORMICK, T.; COLUSSI, V.; KENNEY, M. E.; COOPER, K. D.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 224, p. 290-299, 2007.

MILLER, S. J. Aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. **Clin. Dermatol**., *v*. 13, p. 527-36, 1995.

PHIPPS, J. B.; GYORY, J. R. Transdermal ion migration, **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 9, p. 137 – 176, 1992.

REDDI, E.; ZHOU, C.; BIOLO, R.; MENEGALDO, E.; JORI, G. Lipossome- ou LDLadministered Zn(II)-phtalocyanine as a photodynamic agent for tumours. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency, **Br. J. Cancer**, v. 61,p. 407-411, 1990. RHODES, L. E.; TSOUKAS, M.M.; ROX ANDERSON, R.; KOLLIAS, N. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin, **J. Invest. Dermatol**., v. 108, p. 87-91, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, H.C.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, No 5, 771-780, 2004.

ROBERTS, D.J.H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review, **Br. J. Plastic Surgery**, v. 48, p. 360-370, 1995.

SCOTT, E.R.; LAPLAZA, A.I.; WHITE, H.S.; PHIPPS, J.B. Transport of ionic species in skin: contribution pores to the overall skin conductance. **Pharm Res.**, v. 10, p. 1699-709, 1993.

SEKYIA, S.; KUBOTA, K.; KASAI, T.; IWASAKI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKAMISAWA, H.; TENJIN, Y. Cytocidal effects of hematoporphyrin derivate and argon dye laser on human gynecologic tumor cell *in vitro*, **Int. J. Gynecology and Obstetrics**, v. 26, p. 151-158, 1988.

SHELTON, R. M. Skin Cancer: A Review and Atlas for the Medical Provider. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 68, Nos. 4 & 5 September/October, 2001.

STAHL, J.; NIEDORF, F.; KIETZMANN, M. Characterisation of epidermal lipid composition and skin morphology of animal skin *ex vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 310–316, 2009.

STEINBAUER, J.M.; SCHREML, S.; KOHL, E.A.; KARRER, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.M. Photodynamic therapy in dermatology. **JDDG**, v. 8, p. 454–464, 2010.

SYLVESTRE, J.P.; GUY, R.H., DELGADO-CHARRO, M.B. *In vitro* optimization of dexamethasone phosphate delivery by iontophoresis. **Phys. Ther.**, v. 88 (10), p. 1177-85, 2008.

TAMADA, J.A.; GARG, S.; JOVANOVIC, L.; PITZER, K.R.; FERMI, S.; POTTS, R.O.; CYGNUS, A. Noninvasive glucose monitoring: comprehensive clinical results, **JAMA**, v. 282, p. 1839-1844, 1999.

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.

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

TITA, S.P.S.; PERUSSI, J.R. The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light, **Br. J. Medical Biol. Research**., v. 34, p. 1331-1336, 2001.

TRAKATELLI, M.; ULRICH, C.; DEL MARMOL, V.; EUVRARD, S.; STOCKFLETH, E.; ABENI, D. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. **Br. J. Dermatol.**, 156 (Suppl. 3), p. 1–7, 2007.

VALDUGA, G.; REDDI, E.; GARBISA, S.; JORI, G. Photosensitization of cells with different metastatic potentials by liposome-delivered Zn(II)-phtalocyanine. **Int. J. Cancer**, v.75, p.412-417, 1998.

VALIANOU, L., KARAPANAGIOTIS, I., CHRYSSOULAKIS, Y. Comparison of extraction methods for the analysis of natural dyes in historical textiles by high-performance liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 395, p. 2175–2189, 2009.

VAN LEENGOED, H.L.L.M.; CUOMO, V.; VERSTEEG, A.A.C.; VAN DER VEEN, N.; JORI, G.; STAR, W.M. *In vivo* fluorescence and photodynamic activity of zinc phthalocyanine administered in liposomes, **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 840-845, 1994.

VILLANUEVA, A.; JORI, G. Pharmacokinetic and tumor photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra (4N-methylpyridyl) porphyne, **Cancer Lett.**, v. 73, p. 59-64, 1993.

WELCH, M.L.; GRABSKI, W.J.; MCCOLLOUGH, M.L.; SKELTON, H.G.; SMITH, K. J.; MENON, P.A.; ANDERSON, L.L. 5-Fluorouracil iontophoretic Bowen's disease. J. Am. Acad. Dermatol., v. 36, p. 956-8, 1997.

WOOD, S.; NATRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J.; ROBINSON, C. An *in vitro* study of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*, **J. Photochem. Photobiol. B**. *Biol.*, v. 50, p. 1-7, 1999.

WONG, C.S.M.; STRANGE, R.C.; LEAR, J. T. Basal cell carcinoma. **B.M.J**.; v. 327, p. 794-798, 2003.

### ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.980.53.5), intitulado: "Iontoforese *in vitro* e *in vivo* de uma Ftalocianina de Zinco Aniônica em Tecidos Sadios e Tumores Induzidos para a Terapia Fotodinâmica de Tumores Cutâneos", de autoria de Joel Gonçalves de Souza e de Renata Fonseca Vianna Lopez, por estar de acordo com os Principios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01.10.2008.

Ribeirão Preto, 3 de outubro de 2008

Presidente da CEUA Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretaria da CEUA Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 - CEP 14040-900 - Ribeirão Preto - São Paulo Fone: (16) 3602 4469 - Fax: (16) 3633 7964