UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de formulações iontoforéticas
semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos:
estudo *in vitro* em cultura de células tumorais.**

STEPHÂNIA FLEURY TAVEIRA

Ribeirão Preto

2007

STEPHÂNIA FLEURY TAVEIRA

**Desenvolvimento de formulações iontoforéticas
semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos:
estudo *in vitro* em cultura de células tumorais.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. 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 PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Taveira, Stephânia Fleury

Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo *in vitro* em cultura de células tumorais/ Stephânia Fleury Taveira Ribeirão Preto, Orientadora; Renata Fonseca Vianna Lopez - Ribeirão Preto, 2007.

160p.;il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

1. Doxorubicina. 2. Iontoforese. 3. Cultura de células

Folha de Aprovação

Stephânia Fleury Taveira.

Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo *in vitro* em cultura de células tumorais.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de Mestre.

Dedicatória

À Deus, pela permissão de realizar um grande sonho e pela presença constante em todos momentos da minha vida.

Ao meu marido, companheiro e amigo de todos os momentos, Eduardo. Obrigada por estar sempre presente, de me apoiar nas minhas decisões e fazer com que meus dias fiquem cada vez melhores.

Aos meus pais, que apesar da pequena distância estiveram sempre presentes, participando, apoiando e compartilhando os desafios desta caminhada.

Aos meus irmãos, Nilo e Eliseu, e minha cunhada Beatriz, que também me apoiaram e me deram suporte durante todo esse tempo. Aos meus avós que também são muito presentes na minha vida, e me ajudaram de várias formas durante este tempo.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Renata Fonseca Vianna Lopez pelo carinho, paciência e dedicação na orientação deste trabalho.

Agradecimentos

A Danielle, que sempre foi solícita a ajudar e a omitir opiniões sobre o trabalho, ajudando de todas as formas, dentro e fora da faculdade, fazendo com que os dias em Ribeirão se tornassem mais divertidos.

A Luciana pela grande ajuda, muitas vezes em experimentos nos fins de semana e pelas opiniões valiosas durante todo trabalho; além da companhia e da amizade sempre próxima.

Ao Guilherme por ajudar sempre e por auxiliar nos primeiros experimentos de iontoforese.

A Taís pela paciência e auxílio durante os estudos de microscopia.

Aos colegas de laboratório: Cláudia, Danielle, Fábio, Gabriela, Guilherme, Jonas, Koréa, Priscila, Taís e Thaís pela agradável convivência no laboratório ao longo desse período.

Ao Prof Dr. Auro pelas valiosas contribuições neste trabalho e por ceder seu laboratório juntamente com a Prof. Dra. Lucia Faciole para realização dos experimentos.

A todos os membros do Laboratório de Imunologia que contribuíram para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer em especial ao Carlos, pela leitura das placas, Érika pelo auxílio constante e as alunas Luciana e Adriana que auxiliaram constantemente no preparo dos materiais e na troca de meio de cultura nos feriados.

Ao funcionário Henrique e José Orestes do Departamento de Farmacotécnica da FCFRP-USP pela colaboração e divertida convivência.

Ao Prof. Dr. Edemilson, professor, amigo e grande incentivador.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, que foi receptivo ao me receber como estagiária e que permitiu com que fosse possível a realização da pós-graduação. A todos os membros do seu laboratório, que me incentivaram a realizar o mestrado.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Bernardo Gonçalves Maia Campos e as funcionárias Ana Lúcia, Denise e Rosana pela colaboração e trabalho prestado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro concedido a este projeto.

RESUMO

TAVEIRA, S. F. **Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para tratamento de tumores cutâneos : estudo *in vitro* em cultura de células tumorais.** 2007. 160 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O objetivo deste trabalho foi estudar a permeação iontoforética da Doxorubicina (DOX) em formulações semi-sólidas e testar a citotoxicidade destas formulações em cultura de células de melanoma com e sem a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade. O estudo de liberação da DOX das formulações (gel de Hidroxiethylcelulose – HEC, gel de quitosana e solução aquosa) mostrou que o gel de quitosana possuiu uma velocidade de liberação quase três vezes maior do que nas demais formulações. Os estudos de permeação passiva mostraram que o fármaco não atravessa a pele em quantidades detectáveis. No entanto, a iontoforese contribui significativamente não só na permeação da DOX, mas também na sua retenção cutânea. O gel de HEC foi o que levou a uma maior retenção cutânea do fármaco em comparação com as demais formulações. Nos estudos de citotoxicidade realizados em células de melanoma de camundongos, verificou-se que as formulações contendo DOX possuíram citotoxicidade maior comparadas ao controle (solução de DOX). Isso significa que os componentes de cada formulação contribuem no poder de citotoxicidade contra as células de melanoma. A solução de monoleína 5% em propilenoglicol apresentou maior atividade citotóxica dentre todas as formulações estudadas. Seus componentes, monoleína e propilenoglicol contribuem sinergicamente para sua atividade citotóxica, a qual é de aproximadamente 90% quando a concentração de DOX é de 20 ng/mL. Enquanto que em solução de DOX sua citotoxicidade é de aproximadamente 34% na mesma concentração. Foi feita a padronização dos estudos de aplicação de corrente elétrica em cultura de células, quanto a placa de cultura, número de células, volume do meio de cultura e ponte salina (utilizada para a passagem da corrente para o meio de cultura). A aplicação de 0,1 a 0,5 mA/cm² de corrente elétrica não causou morte significativa para as células de melanoma quando aplicada por um período de 10 a 60 minutos. A citotoxicidade das formulações com e sem aplicação de corrente elétrica por 10 minutos não apresentaram diferença significativa. Porém, a aplicação de 20 minutos de corrente elétrica aumentou significativamente a citotoxicidade da DOX em solução aquosa. Conclui-se, resumidamente, que a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade aumentou a penetração da DOX através da pele e auxiliou a entrada do fármaco nas células tumorais, quando esta é dissolvida em solução aquosa.

Palavras-chave: Doxorubicina, iontoforese, cultura de células.

ABSTRACT

TAVEIRA, S., F. **Development of semi-solid iontophoretic formulations for treatment of cutaneous tumor: *in vitro* studies on tumor cell culture.** 2007. 160 f. Dissertation (Maester) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The aim of this work was to study the iontophoretic delivery of Doxorubicin (DOX) dispersed in semi-solid formulations and test its cytotoxicity activity on melanoma cell lines, with or without the application of a low intensity electrical current. The release study of DOX from the formulations (hydroxyethylcellulose – HEC, chitosan gel and aqueous solution) showed that chitosan gel increased almost 3 times the diffusion coefficient of the drug when compared to a water solution. Passive permeation studies showed that the drug does not cross the skin in detected amounts. However, iontophoresis of DOX increased significantly not only the permeation but also the skin retention of the drug. HEC gel improved DOX skin retention when compared to other formulations. Cytotoxicity studies, performed in rat melanoma cell culture indicated that formulations containing DOX have high cytotoxicity compared to the control (DOX solution). These results means that the components of the formulations probably contribute to melanoma cells death. Monoolein 5% solution in propilene glycol showed high cytotoxicity compared to the other formulations. Its components act synergically and produce a great cytotoxicity: approximately 90% when the concentration of DOX is 20 ng/mL, whereas in DOX solution its cytotoxicity is approximately 34% on this concentration. Standardization of the electrical current studies has been made as matter as the culture plate, number of cells, volume of culture medium and agar bridge (used to pass electrical current for the culture medium). The application of 0,1 to 0,5 mA/cm² of electrical current during 10 to 60 minutes did not kill melanoma cell lines significantly. The cytotoxicity of DOX incorporated in water and semi-solid formulations are not statistical different in the presence or not of an electrical current for 10 minutes. However, 20 minutes of an electrical current raised significantly the cytotoxicity effects of DOX in aqueous solution. In summary, the application of low intensity electrical current increases the penetration of DOX through the skin and helps the drug to enter into the tumor cells, when dispersed in water solution.

Key words: Doxorubicin, iontophoresis and cell culture.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da estrutura da pele (Skin care fórum, 2001).	6
Figura 2: 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).	9
Figura 3: Curva de crescimento gompertziano dos tumores (Silva, 1994).	11
Figura 4: Esquema da radiação UV nos melanócitos e queratinócitos (Gilchrest et al., 1999).	13
Figura 5: Câncer de pele do tipo Melanoma (Skin care fórum, 2001).	14
Figura 6: Carcinoma Espinocelular (Skin care fórum, 2001).	15
Figura 7: Seqüência de eventos prováveis de ocorrer após a radiação UV incidir sobre a pele (Alam & Ratner, 2001).	16
Figura 8: Carcinoma do tipo basocelular (Skin care fórum, 2001).	17
Figura 9: Estrutura química das antraciclinas (DeVita, 2005).	19
Figura 10: Representação esquemática da movimentação de íons e as reações eletroquímicas durante a iontoforese (adaptado de Kalia et al., 2004).	27
Figura 11: Fluxo de íons na pele durante a iontoforese (Subramony et al., 2006).	28
Figura 12: Dispositivo iontoforético aplicado na parte superior do braço de um paciente, onde o mesmo pode iniciar a liberação do fármaco pressionando o botão de controle (Subramony et al., 2006).	29
Figura 13: Vyteris Inc. LidoSite™ sistema tópico. Sistema de liberação iontoforética de lidocaína para anestesia local (Subramony et al., 2006).	30
Figura 14: Esquema representativo de cultivo de órgãos, tecido e células (adaptado de Freshney, 1994).	33
Figura 15: Células aderentes, linhagem IEC-6 (A) Células aderidas em fase de crescimento (B) cultura confluenta (Peres & Curi, 2005).	40

Figura 16: Cultura de células em suspensão, linhagem Raji (formação dos cachos celulares durante a proliferação) (Peres & Curi, 2005).	40
Figura 17: Esquema da estrutura da tripsina.	41
Figura 18: Conversão do MTT nas mitocôndrias das células viáveis. (A) Sal de tetrazol (amarelo e solúvel), (B) Azul de Formazan (insolúvel) (Heo et al., 1990).	43
Figura 19: Mecanismos da eletroquimioterapia: eletropermeabilização celular e utilização de agentes citotóxicos. (A) Representação esquemática de uma célula (B) Célula após a aplicação da eletroporação (C) Permeabilização da membrana celular permitindo a entrada do agente citotóxico.	44
Figura 20: Formação do poro hidrofílico durante a eletroporação, (A) antes da aplicação do campo elétrico, (B) depois da aplicação do campo.	45
Figura 21: Célula de difusão vertical tipo "Franz".....	57
Figura 22: (A) Célula de difusão iontoforética, (B) Vista superior do compartimento doador.....	60
Figura 23: Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (A) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido. Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (B) o eletrodo foi encapado com plástico isolante (C) estando pronto para o uso.....	61
Figura 24: Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6 mA por 8 horas.	62
Figura 25: 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.....	70
Figura 26: 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. ..	71
Figura 27: Phoresor [®] - Fonte de energia utilizada nos experimentos em cultura de células.	71

Lista de Quadros

Quadro 1: Desenvolvimento dos estudos em cultura de células	31
---	----

Lista de Abreviaturas

BCC	Carcinoma Basocelular
CCE	Carcinoma Espinocelular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
DOX	Doxorrubicina
EC	Etrato córneo
HEC	Hidroxietilcelulose
mA	Miliampere
MM	Melanoma Maligno
MO	Monoleína
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
i	Intensidade de corrente elétrica

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1 Estrutura da pele a absorção percutânea.....	6
2.2 Câncer de pele	10
2.2.1 Melanoma	14
2.2.2 Carcinoma Espinocelular ou de Células Escamosas.....	15
2.2.3 Carcinoma Basocelular	17
2.3 Cloridrato de Doxorrubicina (DOX)	18
2.4 Iontoforese	22
2.4.1 Dispositivo iontoforético e reações eletroquímicas.....	25
2.4.2 Dispositivos comerciais iontoforéticos.....	28
2.5 Cultura de células	30
2.5.1 Meio de cultura.....	35
2.5.2 Cultura em monocamada	38
2.5.3 Teste de citotoxicidade – MTT	42
2.5.4 Emprego da corrente elétrica em cultura de células	44
3. Objetivos.....	48
3.1 Objetivos Específicos.....	49
4. Material e Métodos	50
4.1 Material.....	51
4.1.1 Equipamentos e Acessórios	51

4.1.2	Pele	52
4.2	Métodos	52
4.2.1	Padronização da metodologia analítica para quantificação da DOX por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	52
4.2.1.2	Estudo de estabilidade	55
4.2.2	Desenvolvimento das formulações	56
4.2.3	Estudo de liberação da DOX a partir das formulações desenvolvidas	57
4.2.3.1	Determinação da quantidade de DOX liberada – cálculos para correção da diluição	58
4.2.3.2	Determinação da cinética de liberação da DOX a partir das formulações estudadas	59
4.2.4	Estudo de penetração cutânea da DOX	59
4.2.4.1	Estudo de permeação cutânea passiva da DOX	60
4.2.4.2	Estudo da permeação iontoforética da DOX	61
4.2.4.3	Estudos de retenção da DOX na pele	63
4.2.4.4	Microscopia de Fluorescência	64
4.2.5	Estudos <i>in vitro</i> em cultura de células	65
4.2.5.1	Soluções e reagentes.....	65
4.2.5.2	Meio de cultura de celular	66
4.2.5.3	Linhagens de tumores	67
4.2.5.4	Ensaio de atividade antitumoral – Teste do MTT	67
4.2.5.5	Ensaio de atividade antitumoral com aplicação de corrente elétrica	70

5. Resultados75

5.1 Padronização da metodologia analítica para a quantificação da DOX por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**Erro! Indicador não definido.**

5.1.1 Validação do método analítico**Erro! Indicador não definido.**

5.1.2 Estudos de estabilidade da DOX.....**Erro! Indicador não definido.**

5.2 Estudos de liberação da DOX a partir das formulações desenvolvidas.....**Erro! Indicador não definido.**

5.3 Estudo da penetração e retenção cutânea *in vitro* da DOX**Erro! Indicador não definido.**

5.3.1 Penetração e retenção cutânea passiva da DOX**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2 Estudo de penetração e retenção iontoforética da DOX**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2.1 Estudo de estabilidade da DOX frente a corrente elétrica**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2.2 Estudo do pH das formulações**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2.3 Estudo da condutividade das formulações.....**Erro! Indicador não definido.**

5.3.3 Microscopia de Fluorescência.....**Erro! Indicador não definido.**

5.4 Cultura de células**Erro! Indicador não definido.**

5.4.1 Estudos preliminares.....**Erro! Indicador não definido.**

5.4.2 Citotoxicidade das formulações sem aplicação de corrente elétrica.....**Erro! Indicador não definido.**

5.4.3	Citotoxicidade das formulações contendo DOX com aplicação de corrente elétrica	Erro! Indicador não definido.
5.4.3.1	Viabilidade das células frente a corrente elétrica	Erro! Indicador não definido.
5.4.3.2	Citotoxicidade da DOX com aplicação de corrente elétrica	Erro! Indicador não definido.
6.	Discussão	Erro! Indicador não definido.
6.1	Padronização da metodologia analítica para a quantificação da DOX por CLAE.	Erro! Indicador não definido.
6.2	Estudos de liberação da DOX a partir das formulações desenvolvidas.....	Erro! Indicador não definido.
6.3	Estudos de penetração cutânea <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
6.4	Experimentos em cultura de células	Erro! Indicador não definido.
7.	Conclusão.....	77
8.	Referências Bibliográficas	79

1.Introdução

O câncer de pele é um dos neoplasmas mais diagnosticados dentre todos existentes, e seu risco de vida é potencialmente igual aos outros tipos de câncer (Assefaa et al., 2005). O câncer de pele acomete mais de 500.000 pessoas nos Estados Unidos. A maioria das lesões encontradas são carcinomas de células basais, carcinomas de células escamosas e melanomas (Locke et al., 2001).

A doxorubicina (DOX) é um antineoplásico amplamente utilizado na clínica para o tratamento de vários tumores, inclusive o câncer de pele (Moore et al., 1985). Sua administração é feita por via endovenosa levando a um baixo índice terapêutico para os tumores cutâneos e causando vários efeitos colaterais (Zagonel et al., 1996). Sendo assim, esses tumores são tratados na maioria das vezes com cirurgia e radioterapia (Locke et al., 2001). Essas terapias acarretam diversos incômodos para o paciente, como o aparecimento de cicatrizes, perda de cabelo, queimaduras, desconfortáveis dores abdominais, entre outros. Novas alternativas de tratamento mais eficientes e que minimizem os efeitos colaterais são, portanto, necessários. Uma alternativa seria a aplicação tópica de quimioterápicos.

A pele é uma barreira para o ambiente externo, mantendo os fluidos corporais dentro do sistema e impedindo a entrada de substâncias prejudiciais. O transporte de substâncias através de membranas biológicas como a pele é um fenômeno complexo que compreende interações físicas, químicas e biológicas. Dificilmente, portanto, a administração tópica passiva da DOX levará o fármaco para camadas mais profundas da pele em concentrações suficientes para o tratamento de tumores cutâneos.

Dentre os métodos utilizados para melhorar a penetração cutânea de fármacos pode-se citar o uso de promotores de absorção químicos, novos sistemas de liberação, como as microemulsões e os lipossomas, e métodos físicos, normalmente mais eficientes quando se trata de moléculas grandes, como: a iontoforese, a sonoforese e a eletroporação. Dos métodos físicos a iontoforese, sem dúvida, é o mais estudado (Moser et al., 2001).

A liberação iontoforética de fármacos resulta na condução de moléculas carregadas ou não através da pele pela aplicação de uma corrente elétrica. Ela é utilizada para aumentar a penetração na pele de várias moléculas, incluindo proteínas e peptídeos que normalmente são de difícil administração por outras vias (Banga & Chien, 1988). Sendo assim, a iontoforese deve aumentar a penetração cutânea da DOX. Para tanto, é necessário aplicá-la em formulações adequadas, que permitam a passagem da corrente elétrica e o contato desta com a pele. No entanto, a iontoforese pode também aumentar a penetração cutânea dos excipientes da formulação. Estes excipientes podem ou não contribuir para o poder de citotóxico da DOX. Esta citotoxicidade pode ser estudada em cultura de células.

O cultivo de células é usado com muita frequência nos laboratórios, principalmente para estudos das funções celulares. Isso porque é muito difícil a análise das atividades celulares em tecidos de animais vivos, em que simultaneamente atuam fatores tão diversificados. A escolha da cultura de células como ferramenta de estudo dos processos biológicos permite que se façam várias abordagens relacionadas à avaliação das atividades celulares, como: expressão gênica, tráfego através da

membrana, carcinogênese, captação de molécula do meio externo, etc (Peres e Curi, 2005).

Grande atenção tem sido voltada para o estudo da carcinogênese em cultura de células tumorais. Várias linhagens já existem destas células, com intuito de elucidar vários processos celulares. Um dos principais estudos nestas células são os de citotoxicidade de substâncias antitumorais (Freshney, 1994). Dentre os diversos estudos de citotoxicidade, estão aqueles que testam substâncias sintetizadas em laboratório, a fim de comprovar sua ação antitumoral (Nihei, 2001), aqueles que testam o uso de pró-fármacos que irão agir a partir de algum estímulo, como a luz (Freitag et al., 2004) ou mesmo aqueles que auxiliam a entrada do fármaco dentro das células, como é o caso da aplicação de corrente elétrica (Horikoshi et al., 2000; Cemazar et al., 2001; Batista et al., 1994).

Sendo assim, formulações iontoforéticas foram estudadas *in vitro* na tentativa de melhorar a penetração cutânea e celular da DOX, a fim de, futuramente, viabilizar o tratamento quimioterápico tópico com este fármaco em pacientes que apresentam tumores cutâneos.

2.Revisão da Literatura

2.1 Estrutura da pele a absorção percutânea

A pele recobre toda a superfície corporal protegendo os órgãos internos e eliminando a passagem de produtos químicos dentro e fora do corpo. Sendo assim, ela tem função protetora contra as adversidades do ambiente, como formas de poluição, temperatura, irradiação ultra-violeta (UV) e umidade (Aulton, 2005). Também tem como função primordial proteger o organismo contra a perda de substâncias endógenas (Bouwstra et al, 2002) . É composta de três camadas: a epiderme, a derme e a mais profunda hipoderme (subcutis) (Figura 1).

Figura 1: Esquema da estrutura da pele (Skin care fórum, 2001).

A epiderme é subdividida em cinco camadas ou estratos, que são denominados, de dentro para fora da pele de estrato germinativo ou basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. A maior parte da epiderme é formada por um

epitélio escamoso, que consiste principalmente de queratinócitos. Estas células se diferenciam em cada estrato, até que chegam ao estrato córneo, que é a camada mais externa da pele (Welss et al, 2004). A camada celular basal também possui melanócitos, que produzem e distribuem os grânulos de melanina para os queratinócitos (Aulton, 2005). As células de Langerhans são proeminentes na epiderme, e tem um papel importante na defesa imune desta camada (Welss et al, 2004).

O estrato córneo é a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele. Ele é constituído por um sistema de dois compartimentos heterogêneos, compostos por queratinócitos (também chamados de corneócitos) cheios de queratina embebidos em uma matriz lipídica intracelular. A matriz lipídica é organizada em bicamadas lamelares. As principais classes de lipídios encontradas no estrato córneo são: ceramidas, ácidos graxos livres, esteróis e triacilgliceróis. A dificuldade em se permear o estrato córneo provém destas bicamadas lipídicas e dos queratinócitos. (Bergh et al, 1997).

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina) que são embebidas em uma substância de fundo amorfa composta por mucopolissacarídeos (Aulton, 2005). O suprimento vascular da derme regula a temperatura, a pressão e a nutrição do tecido (Chien, 1992).

O tecido subcutâneo é uma camada adiposa situada abaixo da derme que funciona como uma barreira protetora e isolante e juntamente com a derme e a epiderme formam o tegumento (Abraham, 1994).

A pele é uma via para liberação de fármacos usada há muitos anos. O entendimento do processo de penetração de substâncias por ela e através dela tem demonstrado avanços consideráveis nos últimos 60 anos (Hadgraft & Lane, 2005). O estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias (Lachman, 2001). Um fármaco pode atravessar o estrato córneo através de três diferentes vias (Figura 2). São elas:

- Via intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica;
- Via transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária;
- Via apêndices (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, poros, imperfeições): rota paralela na qual os fármacos polares e de baixo peso molecular podem ser absorvidos (Moser et al., 2001).

Figura 2: 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 via específica que uma substância pode tomar e a importância relativa de uma em contraste com outra depende quase exclusivamente das propriedades físico-químicas do fármaco, das condições da pele e da formulação ou sistema de liberação. Em condições apropriadas, cada uma das vias de permeação pode mudar e ser a dominante. Em particular, a difusão passageira que ocorre pouco após a aplicação de uma substância na superfície da pele parece ser maior através dos apêndices do que através da matriz lipídica do estrato córneo. Uma vez que a substância atravessa o estrato córneo, aparentemente não há nenhum impedimento adicional a penetração nas demais camadas, principalmente para fármacos hidrofílicos (Lachman, 2001).

2.2 Câncer de pele

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo criar metástase para outras regiões do corpo (INCA, 2006). Ele se desenvolve a partir de uma célula que perdeu a capacidade de frear o processo de proliferação, resultando num acúmulo de células anormais. Estas passam a ter dificuldade de suprimento sangüíneo e, subseqüentemente, de nutrientes. No entanto, este pequeno nódulo tumoral produz o fator de angiogênese tumoral (TAF) o qual estimula a formação e atrai novos capilares para a massa neoplásica (Silva, 1994). A estrutura anatômica dos vasos tumorais apresenta aumento da permeabilidade microvascular em relação ao vaso normal. Os tecidos tumorais se caracterizam pela falta de vasos linfáticos e por alta pressão intersticial, que resulta na dificuldade de drenagem da região podendo retardar o extravasamento de macromoléculas para o interior dos tecidos (Chin, 1999).

As fases clínicas do crescimento tumoral são mais bem descritas pela equação de Gompertz (Figura 3), que representa uma desaceleração da velocidade de crescimento com o aumento do tamanho do tumor. Tumores descritos pela curva gompertziana inicialmente crescem próximos a uma taxa exponencial, por um período curto de observação. Tal curva apresenta uma fase rápida e, à medida que a massa tumoral aumenta, diminui o seu ritmo de crescimento, chegando a atingir uma fase de plateau (Silva, 1994).

Figura 3: Curva de crescimento gompertziano dos tumores (Silva, 1994).

Dentre os tipos de câncer, o câncer de pele é uma das patologias mais comuns. Só nos Estados Unidos são notificados mais de um milhão de casos por ano. Quase dois milhões de novos casos são diagnosticados em todo mundo, e este número continua a crescer (Lopez et al, 2004). No Brasil, segundo estimativa do Ministério da Saúde, no ano de 2006, 472.050 casos de câncer de pele foram diagnosticados (INCA, 2006).

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

Os principais fatores que aumentam relativamente os riscos de desenvolvimento de câncer de pele são (i) história de câncer de pele primário ou lesões percutâneas

como displasias atípicas, queratoses, múltiplos nevos comuns, nevos congênitos e nevos sebáceos, (ii) história de queimaduras solares, exposição aos raios ultravioletas (UV), bem como sintomas das queimaduras solares (pele seca, eritemas característicos), (iii) fatores de risco não modificáveis como pele clara e idade avançada (Eisen, 2003).

A exposição a radiação ultravioleta é geralmente aceita como a maior causa para os cânceres de pele (Rubin et al., 2005). O carcinoma de células basais e espinhosas ocorre mais comumente em pessoas que são expostas diariamente e intensamente durante um longo período de suas vidas, como em trabalhadores do campo (exposição ocupacional). Acomete principalmente regiões do corpo largamente expostas. Ao contrário do melanoma, que atinge pessoas que se expõe intensamente aos raios UV apenas em alguns períodos do ano (Gilchrest et al., 1999).

A Figura 4 mostra que as exposições a raios UV causam danos substanciais ao DNA celular, dependendo da intensidade e da frequência com que os raios acometem os melanócitos e os queratinócitos (Gilchrest et al., 1999). Nos queratinócitos altas doses de radiação UV são capazes de danificá-los irreversivelmente (Figura 4A). Estes sofrem apoptose, enquanto aqueles que são recuperáveis sofrem reparação no DNA celular. A produção de melanina é ativada para proteção dos queratinócitos que se recuperaram e não sofreram apoptose. Algumas células podem não conseguir efetuar o reparo no DNA, ocorrendo então mutações que podem ser repassadas quando ocorrer sua proliferação. Em baixas doses de radiação, também ocorrem estes eventos, porém menos ativamente (Figura 4B). Nos melanócitos, as altas doses de radiação não provocam sua apoptose, como ocorre nos queratinócitos, mas acarretam mutações que serão transmitidas após a

divisão celular (Figura 4C). Em baixas doses de radiação UV as mutações também ocorrem, porém, com menor frequência (Figura 4D). Sendo assim, pode-se inferir que grandes danos celulares são causados por: (i) exposição intermitente de radiação UV (ii) baixa quantidade de melanina (iii) baixa capacidade de reparo do DNA. Exposições fracas e freqüentes aos raios UV não provocam tantos danos celulares nos melanócitos. O melanoma não se desenvolve quando a quantidade de melanina é alta e quando o reparo do DNA é eficiente (Gilchrest et al., 1999).

Figura 4: Esquema da radiação UV nos melanócitos e queratinócitos (Gilchrest et al., 1999).

2.2.1 Melanoma

Por definição, melanoma (Figura 5) é um câncer de pele potencialmente fatal que se origina de melanócitos, e que pode metastatizar através dos vasos linfáticos e da circulação (Vivier & McKee, 2000).

Figura 5: Câncer de pele do tipo Melanoma (Skin care fórum, 2001).

O melanoma cutâneo, antes uma doença rara, agora é um dos cânceres de maior incidência no mundo (Haluska & Hodi, 1998). No ano de 2006, estimou-se o diagnóstico de 62190 casos de melanoma e 7910 casos de morte nos Estados Unidos. Porém, projeções de novos casos estão subestimadas, pois não incluem melanomas localizados e superficiais que podem ser tratados. A incidência de melanoma continua a crescer dramaticamente, acometendo mais homens do que mulheres. O risco de se ter melanoma nos Estados Unidos é, em homens, 1 em cada 58 casos, e em mulheres, 1 em cada 82 casos. É a quinta doença mais comum a acometer homens e mulheres, e é considerada no ranking a segunda doença em que mais se perde ano de vida produtiva, ficando atrás apenas da leucemia adulta (Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2006).

A causa do melanoma ainda não é entendida. Inúmeros fatores de risco têm sido identificados para o desenvolvimento da doença (Haluska & Hodi, 1998). Estes incluem: história familiar, displasia de nevo, características e cor da pele, (Practice Guidelines in

Oncology,2006) além da exposição ao sol. O tipo de exposição é considerado importante. O melanoma maligno de disseminação superficial e o nodular são muito mais evidentes em pessoas que trabalham em ambientes fechados do que aqueles que trabalham em ambientes externos (Vivier & McKee, 2000).

Para o tratamento do melanoma maligno a cirurgia constitui o único tratamento bem-sucedido até o momento (Vivier & McKee, 2000).

2.2.2 Carcinoma Espinocelular ou de Células Escamosas

Por definição, é um tumor maligno que se origina de queratinócitos, o qual pode eventualmente metastatizar. As causas mais comuns são: irradiação ultravioleta, raio X, hidrocarbonetos policíclicos, arsênico, cicatrizes, certas doenças genéticas (albinismo, xeroderma pigmentoso), doenças de pele que afetam as mucosas, vírus de papiloma humano, entre outras (Vivier e McKee, 2000). O carcinoma cutâneo espinocelular geralmente se apresenta como uma hiperqueratose assintomática em forma de pápula, nódulo ou placa (Figura 6) (Marks et al, 1988). Seu principal precursor é a queratose actínica, sendo que 60% destes carcinomas evoluem a partir desta patologia (Marks et al., 1988).

Figura 6: Carcinoma Espinocelular (Skin care fórum, 2001).

Os fatores de risco que causam o carcinoma espinocelular são os mesmos já citados para os melanomas, mas é importante ressaltar a exposição aos raios UV, principalmente aos raios UVB. A radiação UV produz mutações no DNA, usualmente com a formação de dímeros timidínicos, no gen p53 supressor de tumores. A falha na reparação destes genes resulta em formação de tumores, como mostrado na Figura 7 (Alam e Ratner, 2001).

Figura 7: Sequência de eventos prováveis de ocorrer após a radiação UV incidir sobre a pele (Alam & Ratner, 2001).

2.2.3 Carcinoma Basocelular

O carcinoma basocelular (Figura 8) é um tumor cutâneo maligno muito comum, localmente destrutivo e derivado das células basais da epiderme inferior e seus anexos (Vivier e McKee, 2000).

Figura 8: Carcinoma do tipo basocelular (Skin care fórum, 2001).

Esse carcinoma também é chamado de epitelioma, por sua baixa capacidade de metastatizar. Porém, o nome de carcinoma é mais apropriado, pois ele leva a uma patologia invasiva, agressiva e destrutiva para a pele e para as estruturas ao seu redor, incluindo os ossos (Green et al., 1996).

A exposição solar é a causa mais importante para o carcinoma basocelular. Portanto, os riscos que definem sua causa estão diretamente relacionados aos hábitos de exposição a radiação solar (Van Dam et al, 1999). O bronzamento artificial, por exemplo, principalmente na população feminina jovem, pode acelerar os riscos de desenvolvimento precoce deste tumor (Boyd et al, 2002).

A mutação genética que ocorre nesta patologia é geralmente no gen supressor de tumores PTCH no cromossomo 9 (Rubin et al, 2005). Mutações no gen p53 são menos freqüentes do que no carcinoma de células escamosas (Gailani et al, 1996).

Tumores não-pigmentados malignos são geralmente tratados com cirurgia, eletrodissecação, laser, criocirurgia, quimioterapia e radioterapia. Apesar destes serem os tratamentos de escolha mais usados, possuem vários efeitos colaterais como dor e várias inflamações e irritações locais que podem persistir por muitas semanas. Além disso, pode ocorrer formação de cicatrizes. Assim, é de grande importância encontrar tratamentos alternativos e menos destrutivos, levando a resultados mais aceitáveis, principalmente em pacientes imunossuprimidos, com lesões extensas em várias regiões (Lopez et al, 2004).

2.3 Cloridrato de Doxorrubicina (DOX)

As antraciclinas são muito utilizadas na oncologia sozinhas ou em conjunto com outros fármacos em regimes quimioterápicos (DeVita, 2005). Dentre elas pode-se destacar a daunorrubicina, a doxorrubicina e mais recentemente a epirrubicina e idarrubicina. A daunorrubicina foi descoberta como substância capaz de diminuir tumores em testes *in vivo* com ratos, e mostrou ser eficaz no tratamento de leucemia pediátrica (Doroshov et al, 2001). A Doxorrubicina, descoberta em 1970, é um derivado hidroxilado da daunorrubicina, e apresenta uma ação terapêutica maior. Acredita-se que o efeito antitumoral das antraciclinas se deve principalmente a sua ação inibidora da topoisomerase II α , impedindo assim a ligação das cadeias do DNA das células e, conseqüentemente, provocando a quebra do DNA e a morte celular. Algumas variações podem ocorrer neste mecanismo, dependendo do derivado antracíclico. A daunorrubicina e a doxorrubicina, por exemplo, ainda podem inibir as helicases, que são

enzimas responsáveis por separar as fitas de DNA. As helicases estão diretamente relacionadas com a inibição das topoisomerases (Tewey et al., 1984).

As antraciclinas, possuem um grupo quinona é que contém um anel aromático rígido e planar ligado por uma ligação glicosídica ao anel de um amino açúcar (Figura 9). Por causa dessa estrutura aromática complexa, absorvem luz visível e ultravioleta, o que lhes confere cor vermelha-alaranjada. O grupo quinona é responsável pela cardiotoxicidade das antraquinonas. Além disso, ele faz com que estas substâncias sofram reações de oxi-redução, as quais geram radicais livres de oxigênio que contribuem para o seu efeito anti-tumoral (DeVita, 2005).

Figura 9: Estrutura química das antraciclinas (DeVita, 2005).

A doxorubicina é comumente usada no tratamento de vários tipos de tumores, incluindo linfomas de Hodgkins e não- Hodgkins, mielomas múltiplos, sarcoma de ovário, pulmão, estômago e seio (DeVita, 2005) além de cânceres no ovário e cervical (Israel et al, 2000), malignidades hematológicas (Dorr et al.,1980) e outros.

O cloridrato de doxorubicina (DOX) corresponde ao hidrocloreto 8-hidroxiacetil (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lyxo-hexopiranosil)oxi)-6,8,11-trihidroxi-Lmetoxi-7,8,9,10-tetrahidronaftaceno-5,12-diona ($C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ MM=580,0). Ele é solúvel em água, metanol e solução aquosa de álcool. É insolúvel em clorofórmio, éter e outros solventes orgânicos. Uma solução a 0,5% de DOX em água tem um pH de 4,0 a 5,5. A solução de injeção, segundo a USP 24, tem um pH entre 2,5 e 4,5. A DOX deve ser estocada em frascos hermeticamente fechados (Reynolds, 1996). Ela é uma base fraca com pKa de 8,3 (Perrin et al., 1981).

Segundo Stiles e Allen (1991), a DOX é estável em soluções ácidas em pH entre 3 a 6,5 mas se decompõe com o aumento do pH. No estado sólido, a DOX demonstrou ser muito estável, podendo ser estocada por anos à temperatura ambiente e na presença de luz sem perder seu potencial.

Normalmente a DOX é diluída em solução de NaCl (0,9%) ou glucose (5%) e administrada por injeção intravenosa. É administrada em doses de 60-75 mg/m² de área de superfície corporal, ou 1,2-2,4 mg/kg de peso corporal. A DOX não é administrada oralmente devido à sua baixa absorção pelo aparelho digestivo (Strohl, 1997). A administração intravenosa é também utilizada para o tratamento de tumores cutâneos (Liu et al., 2002). Sua administração endovenosa permite rápida distribuição no organismo humano ($V_d = 20 - 30$ l/Kg). Acumula-se nos tecidos muito irrigados como: fígado, pulmão, rim e especialmente no coração. Uma das explicações à toxicidade cardíaca desse fármaco é que grande parte dele se aloja neste órgão, especialmente no miocárdio (Álvares-Cedron et al., 1999).

O tratamento prolongado com a DOX costuma ser evitado devido ao mecanismo de resistência que as células desenvolvem ao fármaco ou estruturas químicas semelhantes. As células passam a expressar uma glicoproteína P-gp dependente da bomba ATP, que expelle o fármaco para fora do meio intracelular, não restando quantidades suficientes para inibir o crescimento celular (Heywang et al., 1998).

Várias alternativas estão sendo tomadas para que os efeitos tóxicos da DOX sejam eliminados para o melhor tratamento dos pacientes. Uma das estratégias para isso é a mudança da via de administração, da endovenosa para tópica, no caso do tratamento de câncer de pele. A via tópica, além de ser mais prática, não possui riscos de contaminação e não necessita de profissional especializado para administração do fármaco. Os efeitos tóxicos podem ser menores já que a dose administrada é menor e localizada.

Shimizu et al. (1986) estudaram a ação tópica da DOX em pacientes com neoplasia cutânea decorrente de câncer de mama avançado. Utilizaram a DOX a 0,04% incorporada em pomada de polietilenoglicol e observaram que não ocorreu crescimento da úlcera neoplásica, mas não atuou no tumor de mama propriamente dito.

Moore et al. (1985) também estudaram a ação tópica da DOX, incorporada em veículo contendo dimetilsulfóxido, aplicada topicamente em ratos com carcinoma metastático de pele. Observaram um crescimento mais lento do tumor comparado ao controle após 10 dias de experimento.

O sucesso da aplicação tópica, direcionada, da DOX é limitado devido principalmente à suas características físico-químicas. Sua grande massa molecular e seu

coeficiente de partilha σ/a ($K=1,27$) (Hansch et al., 1995; Heraí, 2004), além da presença de carga elétrica na molécula em pH fisiológico ou ácido, dificultam a sua penetração na pele. O uso de promotores de absorção e/ou a aplicação de corrente elétrica (iontoforese) nas formulações, podem aumentar a penetração da DOX, levando a uma concentração terapêutica desta na pele e, assim, permitindo que tumores cutâneos sejam tratados com sucesso por uma forma não-invasiva e que apresente menos efeitos colaterais.

2.4 Iontoforese

O termo iontoforese refere-se a introdução de espécies iônicas dentro do corpo, pela aplicação de um potencial elétrico, para fins terapêuticos. A primeira investigação quantitativa de liberação iontoforética de fármacos relatada foi feita por LeDuc em 1907 (Phipps et al, 1988). LeDuc demonstrou que os íons de estriquinina e cianida eram transferidos para dentro da pele de coelhos pela ação de uma corrente elétrica contínua e comprovou que essa transferência era pólo orientada, ou seja, dependia da polaridade do íon e do eletrodo sob o qual era colocado (Banga & Chie, 1988). Desde então, uma variedade de fármacos, como pilocarpina, lidocaína, dexametasona, insulina, têm sido administradas topicamente e com o auxílio da iontoforese (Phipps et al, 1988).

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

infecções ou danos, além de ser uma importante alternativa para a administração endovenosa (Singh et al, 1996).

O procedimento consiste na passagem de uma corrente elétrica fraca ($\sim 0,5$ mA/cm²) por uma solução eletrolítica contendo o fármaco em contato com a pele. Um eletrodo-terra colocado em qualquer lugar do corpo completa o circuito elétrico (Aulton, 2005). O princípio iontoforético é baseado no princípio geral da eletricidade, de que cargas iguais se repelem e cargas opostas se atraem. Assim, para a penetração através da pele de uma substância carregada negativamente, esta é colocada em contato com um eletrodo negativo, onde, na presença de corrente elétrica ocorrerá repulsão ela e o eletrodo, com conseqüente entrada na pele. O mesmo ocorre com íons carregados positivamente, colocados em contato com eletrodos positivos. O transporte de moléculas neutras ou sem carga também pode ser facilitado pela iontoforese (Singh et al, 1996).

Sendo assim, o transporte das moléculas carregadas é dirigido primeiramente por repulsão elétrica do eletrodo motriz. No entanto, moléculas polares neutras também podem ser liberadas por um fluxo de água convectivo induzido pela corrente, denominado de eletrosmose (Aulton, 2005). Além disso, A corrente elétrica induz um fenômeno estrutural secundário e a mudança de permeabilidade da pele (Jadoul et al, 1999).

A eletrosmose favorece o movimento de íons no sentido do eletrodo positivo (ânodo) para o eletrodo negativo (cátodo) (Pikal, 2001). Isto porque, a pele possui ponto isoelétrico de aproximadamente 4 - 4,5 e, acima desta faixa de pH, os grupos

carboxilatos associados a resíduos de aminoácidos presentes na membrana encontrarem-se ionizados negativamente (Merino et al., 1997). Assim, o fluxo eletrosmótico é essencialmente o resultado de cargas negativas imóveis na membrana, que requerem íons móveis positivos (saídos do ânodo) para manter sua eletroneutralidade. Moléculas neutras colocadas em contato com o eletrodo positivo beneficiam-se deste fluxo para penetrar na pele por iontoforese (Pikal, 2001). Pikal et al (2001) estudou a influência de diferentes pHs no fluxo eletrosmótico. Ele observou que, em camundongos sem pêlo, quando o pH está entre 5,8 a 8,3 o fluxo eletrosmótico quase não se altera. Entretanto, quando o pH é menor do que 4,0 o fluxo eletrosmótico cai, indicando que ocorre inversão de cargas na pele quando o pH está entre 3 e 4. Lopez et al (2003), obtiveram resultados similares investigando o efeito do pH no fluxo eletrosmótico do ácido 5-aminolevulínico (ALA), pró-fármaco utilizado no tratamento tópico de tumores cutâneos.

Estudos confirmam o aumento da penetração de fármacos por iontoforese quando comparada ao transporte passivo isolado. Curdy et al (2000), relatam maior penetração de piroxicam por iontoforese em relação à difusão passiva, independente do tempo de aplicação. Além disso, outros autores também verificaram que a iontoforese aumenta a penetração tópica e transdérmica de fármacos. Chesnoy et al. (1999) demonstraram que a iontoforese aumentou o transporte do fármaco catiônico cloridrato de propranolol no estrato córneo humano. Hirvonen et al (1998) demonstraram a permeação de polipetídeos e a influência dos mecanismos de eletrorrepulsão e eletrosmose na sua liberação.

A iontoforese também tem sido estudada para melhorar a eficácia tópica e local, de diversas substâncias. Bose et al. (2001) exploraram a liberação iontoforética do cloridrato de buprenorfina incorporada em microesferas através da epiderme humana e observaram que o fluxo do fármaco foi aumentado pela iontoforese. Lopez et al. (2001) realizaram a iontoforese do ácido aminolevulínico (ALA) e verificaram um aumento no fluxo do fármaco comparado à difusão passiva. A iontoforese de uma série de ésteres do ALA carregados positivamente também foi realizada. Os autores observaram um fluxo iontoforético 50 vezes maior para o metil-ALA (Lopez, et al., 2003).

2.4.1 Dispositivo iontoforético e reações eletroquímicas

Um dispositivo iontoforético compreende em uma fonte de energia e dois compartimentos com eletrodos. A fonte de energia pode ser uma bateria ou um controlador eletrônico. Este expande a capacidade do dispositivo iontoforético, pois permite regular a intensidade e frequência da corrente elétrica de acordo com a demanda. Desta forma, pode controlar de forma precisa o perfil de liberação do fármaco (Tapper, 1989). A maioria dos dispositivos disponíveis no comércio funciona com uma corrente elétrica contínua e unidirecional. A formulação com fármaco (D^+A^-) contendo a molécula ionizada (D^+) é colocada no compartimento com eletrodo de mesma carga, por exemplo, um fármaco carregado positivamente em pH fisiológico, como a lidocaína, é colocado no compartimento anódico (positivo). O compartimento do eletrodo oposto é colocado em outro local distante da pele.

Quando a corrente é aplicada, o campo elétrico induz um direcionamento nos íons presentes: cargas positivas no compartimento anódico movem-se em direção ao

cátodo, enquanto os ânions movem-se em direção oposta (Kalia et al, 2004). O par de eletrodos mais utilizados na iontoforese é o de Ag/AgCl. As reações eletroquímicas no ânodo (eletrodo de Ag) necessitam da presença de íons Cl^- . Esses íons reagem com a prata e formam cloreto de prata, que, por sua baixa solubilidade em meio aquoso é simultaneamente depositado na superfície do eletrodo liberando um elétron. Na tentativa de manter a eletroneutralidade no ânodo, ou um cátion deve mover-se para fora do compartimento em direção a pele, ou um ânion deve deixar a pele e mover-se em direção ao compartimento anódico. Já no cátodo (eletrodo de AgCl), 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 libera íons Cl^- para a solução. Novamente, a neutralidade elétrica deve ser mantida, ou com a entrada de cátions da pele, ou com a perda de um ânion (Figura 10) (Kalia et al, 2004; Chang et al., 2000).

Figura 10: Representação esquemática da movimentação de íons e as reações eletroquímicas durante a iontoforese (adaptado de Kalia et al., 2004).

A presença obrigatória de íons Cl^- no compartimento anódico leva usualmente a diminuição da liberação do fármaco. Isso ocorre porque sais comumente usados para produzir Cl^- também levam a produção de íons Na^+ , os quais competem efetivamente com o fármaco pela corrente elétrica (Kalia et al, 2004).

A Figura 11 também mostra os movimentos dos íons na pele durante a iontoforese. Sobre a influência da corrente, os íons biológicos (X^-) que são os chamados cloros primários, viajam da pele para o compartimento do ânodo. Os ânions do cátodo são repelidos para a pele, enquanto que os íons biológicos (M^+) como o Na^+ e K^+ , vão da pele para o cátodo. O fármaco carregado positivamente (D^+), sobre a influência do campo elétrico, migra para dentro da pele. A taxa de transporte de íons através da pele

é proporcional a magnitude da corrente elétrica aplicada (Subramony et al, 2006). Dependendo de várias características, como as propriedades físico-químicas do fármaco, a intensidade da corrente elétrica e as interações químicas existentes entre fármaco e pele, a substância submetida a iontoforese pode ficar retida no estrato córneo, na epiderme, na derme e / ou atingir a corrente sanguínea.

Figura 11: Fluxo de íons na pele durante a iontoforese (Subramony et al., 2006).

2.4.2 Dispositivos comerciais iontoforéticos

Atualmente, os dispositivos comercialmente disponíveis para liberação iontoforética são os da Iomed Inc (Salt Lake City, UT), Empi Corporation (St. Paul, MN) e Travanti Pharma Inc. (St. Paul, MN). Estes sistemas são vendidos sem os fármacos, e é necessário adicionar a solução com fármaco ao reservatório antes do tratamento. O IontoPatch[®] (Travanti Pharma Inc.) possui uma bateria que é descartada junto com o dispositivo iontoforético (Figura 12). A desvantagem destes dispositivos está na falta de padronização e otimização da solução quando é colocada em contato com o eletrodo, podendo acarretar em baixa eficiência de corrente e, conseqüentemente, baixa liberação do fármaco.

Figura 12: Dispositivo iontoforético aplicado na parte superior do braço de um paciente, onde o mesmo pode iniciar a liberação do fármaco pressionando o botão de controle (Subramony et al., 2006).

A Vyteris, Inc (Fair Lawn, NJ) (Figura 13) recebeu em 2004 a aprovação do New Drug Applications (NDA) para colocar no mercado um sistema de liberação iontoforética de lidocaína, para anestesia local. A Alza tem também no mercado o ALZA'S E-TRANS[®], um dispositivo para liberação de hidrocloreto de fentanila, desenvolvido para o paciente controlar a liberação do fármaco em crises de dor, com acompanhamento de um especialista. Além destes, existe ainda um dispositivo que extrai a glicose da pele com o auxílio de corrente elétrica, chamado Glucowatch[®], capaz de detectar hipoglicemia e hiperglicemia, criado pela Cyguns Inc. (Redwood City, CA) e a disposição no mercado desde 1999 (Subramony et al., 2006).

Figura 13: Vyteris Inc. LidoSite™ sistema tópico. Sistema de liberação iônica de lidocaína para anestesia local (Subramony et al., 2006).

2.5 Cultura de células

Passados quase 100 anos desde que os primeiros experimentos de cultivo de células foram realizados por Ross Granveile Harrison, na Universidade Johns Hopkins, o uso desta técnica continua sendo uma importante ferramenta de estudo (Peres & Curi, 2005). Com ela pode-se investigar as interações específicas que ocorrem em nível celular, além de realizar vários experimentos sob as mesmas condições e minimizar a utilização de animais para vários testes (Pizzoferrato et al., 1994).

Em condições apropriadas, a maioria das células, tanto animais quanto vegetais, podem viver, multiplicar e expressar diferentes propriedades. Estas células podem ser observadas continuamente sobre um microscópio e serem analisadas morfolologicamente e bioquimicamente. Pode-se estudar a morte celular, quanto a adição de moléculas ou substâncias específicas, para a realização de estudos diversos. Além disso, também pode ser feito o cultivo de diferentes tipos celulares simultaneamente, permitindo a elucidação de vários processos e interações (Bruce et al., 2002).

O experimento original de cultura celular foi feito com fragmentos de fibras nervosas, chamado cultura de explantes. Hoje, as culturas são usualmente feitas a partir de suspensões de células dissociadas dos tecidos (Bruce et al., 2002).

O Quadro 1 representa as principais descobertas no ramo da biologia celular, bem como da cultura de células; o aprimoramento das técnicas e do conhecimento sobre o cultivo de células fora do organismo desde 1885 (Bruce et al., 2002).

Quadro 1: Desenvolvimento dos estudos em cultura de células

Ano		Desenvolvimento dos estudos em cultura de células
1885	Roux	Demonstrou que células embrionárias de galinha podem ser mantidas vivas em solução salina fora do corpo do animal.
1907	Harrison	Cultivou medula espinhal de anfíbio demonstrando que o axoma é a produzido com uma extensão de uma única célula nervosa.
1910	Rous	Induziu tumor usando um extrato filtrado de tumor de galinha, mostrando que continha um vírus RNA (Sarcoma de Rous).
1913	Carrel	Mostrou que células podem crescer por longo período de tempo quando supridas de nutrientes e sob condições assépticas
1952	Gey et al.	Produziram linhagem de células contínuas a partir de carcinoma cervical humano, que posteriormente tornou-se a linhagem HeLa.
1954	Levi- Montalcini et al.	Mostraram que o fator de crescimento dos nervos estimulam o crescimento dos axomas na cultura de tecidos.
1955	Eagle	Iniciou a primeira investigação sistemática das necessidades nutricionais das células para o cultivo celular. Descobriu que células animais vivem com uma mistura de moléculas suplementadas por proteínas do soro.
1956	Puck et al.	Selecionaram mutantes de acordo com as necessidades nutricionais da linhagem celular HeLa.
1961	Hayflick and Moorhead	Demonstraram que os fibroblastos humanos morrem após um número finito de divisão celular em cultura.
	Kato and Takeuchi	Obteve uma planta completa da cenoura obtida por apenas uma célula da cenoura na cultura de tecido.
1965	Ham	Introduziu um novo meio de cultura sem a presença do soro, capaz de crescer algumas células clonadas provinda de mamíferos.
1968	Augustin-Tocco and Sato	Adaptação de uma célula tumoral em cultura de tecido. Grandes números de diferentes linhagens celulares são isolados neste período, incluindo células do músculo esquelético e células do fígado.
1976	Sato et al.	Publicou uma série de artigos mostrando que diferentes linhagens de células requerem diferentes hormônios e fatores de crescimentos para desenvolvimento em meio de cultura livre do soro.
1986	Martin and Evans et al.	Isolaram e cultivaram células embrionárias pluripotentes de camundongos.
1998	Thomson e Gearhart et al.	Isolaram células humanas embrionárias.

O sistema de cultivo *in vitro* permite o estudo de três tipos de cultura : de órgão, de tecido e de célula.

A cultura de órgãos é obtida quando todo o órgão, geralmente de embriões, é extraído e cultivado *in vitro*. Essa cultura deve preservar todos os componentes do órgão na íntegra, assim como suas conexões e funções. Exemplos de cultura de órgãos são as de fêmur de rato e de fígado de galinha. A cultura deve ser mantida em condições que previnam a migração de células para fora do explante e mantenham a organização estrutural do tecido original. Depois do trauma inicial da retirada do explante e de algumas necroses centrais, a cultura de órgãos geralmente remete-se num estado basal sem crescimento por um longo período. Depois disso, ela começa a sofrer degeneração.

A cultura de tecidos é obtida com um pequeno fragmento de tecido (como o epitélio). Ela deve manter as características histológicas e diferenciação bioquímica do tecido cultivado. Um exemplo de tecido cultivado *in vitro* é o de fígado de embrião, o qual é largamente usado em análise toxicológica de drogas. Como na cultura de órgãos, na cultura de tecidos não podem se propagar e geralmente possuem uma replicabilidade de resultados.

A cultura de células origina-se de tecidos embriológicos. As células cultivadas podem crescer e sobreviver mais facilmente do que os tecidos adultos. Elas são obtidas pela desagregação enzimática ou mecânica de um pedaço de tecido ou pela migração espontânea de um explante (Pizzoferrato et al., 1994). A Figura 14 demonstra esquematicamente os diferentes tipos de cultura.

Figura 14: Esquema representativo de cultivo de órgãos, tecido e células (adaptado de Freshney, 1994).

As células cultivadas *in vitro* mantêm as suas características e funções originais. Por exemplo, as células de fibroblastos continuam secretando colágeno; as células derivadas do músculo esquelético se fundem e formam fibras musculares, que se contraem espontaneamente no meio de cultura; as células nervosas estendem o axioma que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com as demais células nervosas; e as células epiteliais formam grandes extensões com as mesmas propriedades do epitélio intacto. Devido a estes fenômenos ocorrerem na cultura de células, são possíveis diferentes estudos que normalmente não seriam possíveis no tecido intacto (Bruce et al., 2002).

Condições específicas são necessárias para que cada tipo de célula se multiplique. Muitos aspectos do sistema de cultivo podem afetar o crescimento celular, como a composição do meio de cultura, o número de células, a adesão ao substrato, a natureza do substrato, a maneira pela qual as células são manipuladas durante o repique, entre outros (Rizzo et al., 1983). Além destes fatores, o trabalho com culturas celulares requer uma série de cuidados para que não haja ou, pelo menos, se reduzam os riscos de contaminação e, conseqüentemente, a perda de tempo, de reagentes e de material biológico (Peres & Curi, 2005).

Ao se trabalhar com cultura de células, seja ela de qualquer tipo, é necessário um ambiente estéril. Isto porque, uma vez que estas células são cultivadas em meios ricos em nutrientes, a possibilidade de ocorrer propagação de microrganismos contaminantes é alta. No local reservado à cultura de células, a conduta durante a execução dos experimentos é fundamental para a manutenção do ambiente esterilizado. Para manter o ambiente estéril a cuidadosa e permanente limpeza do local, de objetos e equipamentos utilizados, são necessários. (Peres & Curi, 2005). Assim, a manipulação de células é realizada em câmara de fluxo laminar.

Para esterilização dos objetos o aquecimento por autoclavação é o método mais utilizado. Nele, o calor úmido causa desnaturação e coagulação de proteínas vitais para os microrganismos, tais como enzimas. É um método eficiente que exige pouco tempo de exposição dos materiais (Pelczar et al., 1997).

As células crescem e mantêm-se vivas em temperaturas adequadas e numa atmosfera composta de mistura de gases em uma incubadora (estufa). Esta incubadora

é um equipamento fundamental para o cultivo celular, já que mantêm a temperatura, a umidade e a quantidade de gás carbônico e de oxigênio em níveis adequados. Para a maioria das células a temperatura utilizada é de 37° C e a umidade relativa > 95%. O pH é mantido estável devido a injeção de CO₂ numa concentração de 5%. Desta maneira estas incubadoras também recebem o nome de estufas de CO₂. Além destes fatores, existem outras condições essenciais para sobrevivência celular, a principal delas é um meio de cultura adequado (Freshney, 1994).

2.5.1 Meio de cultura

Para que se desenvolvam em cultura, as células necessitam de nutrientes específicos que são promovidos pelo meio de cultura celular (Eagle, 1995). O meio de cultura deve fornecer às células, além de todos os nutrientes essenciais, um ambiente que se assemelhe ao máximo àquele que elas dispunham "in vivo". Dentre os nutrientes essenciais, estão as matérias primas necessárias a síntese de novas células, substratos para o metabolismo energético, vitaminas, traços de minerais com função primordialmente catalítica e íons inorgânicos brutos, que possuem tanto função catalítica como fisiológica. Existem limites aceitáveis para cada um destes componentes, a fim de manter a osmolaridade e o pH adequados (Freshney, 1994).

As soluções preparadas para manter as células em cultura são baseadas na solução salina fisiológica de Ringer. Esta solução é composta por três cátions (cálcio, potássio e sódio), em proporções iguais àquelas existentes na água do mar ou no sangue de animais superiores (Katsuta et al., 1959). A solução de Tyrode foi a primeira solução salina balanceada formulada especificamente para suportar o metabolismo de

células de mamíferos, mas apresentava a desvantagem de geralmente precipitar o cálcio presente (Moore et al., 1967). Desde então, várias outras salinas apareceram, dentre as quais a de Earle e a de Hanks. A salina balanceada de Earle é mais fortemente tamponada devido à sua alta concentração de bicarbonato de sódio. A de Hanks foi originalmente desenvolvida para equilibrar com o ar, ao invés de CO₂, e é adequada para aquelas células para as quais o bicarbonato é tóxico. As salinas tamponadas de fosfato de Dulbecco e Vogt são bastante enriquecidas e, além de serem utilizadas como meio de cultura também são usadas para a lavagem de células e como base para obtenção de solução de tripsina (Rizzo et al., 1983).

Além dos sais, o meio de cultura, principalmente aquele que mantém cultura de células de mamíferos, deve conter soro ou algum tipo de fluido corporal complexo, para o crescimento e sobrevivência das células. Somente alguns tipos de células podem crescer na ausência do soro, e mesmo estas crescem melhor quando o meio é adicionado deste. Sendo assim, a maioria das vezes eles são suplementados com soro fetal bovino (*fetal bovine serum* – FBS), soro de cavalo (*horse serum* – HS) ou soro fetal de bezerro (*fetal calf serum* – FCS). Muitos estudos indicam que são as macromoléculas presentes no soro, ou seja, as proteínas, as responsáveis pela promoção do conteúdo celular (Bates & Levene, 1970).

As últimas investigações revelam que uma das principais funções das proteínas do soro é inibir a ação de enzimas sintetizadas pelas próprias células e liberadas no meio de cultura (Orr et al., 1973). Wallis *et al.* (1969) acreditam que, devido a esta função inibidora de enzimas, o soro é necessário para inativar a tripsina residual que

permanece após as tripsinizações, assim como as proteases sintetizadas posteriormente pelas células.

As frações séricas de elevado peso molecular presentes no soro, além de ter papel nutritivo, parecem promover a adesão e o achatamento das células ao substrato. Também são uma fonte rica em hormônios, fatores de crescimento e elementos capazes de acelerar o crescimento celular. A elevada quantidade de albumina presente no soro assegura que as células sejam protegidas de condições adversas, como a flutuação do pH e outros fatores que poderiam danificar as células. Porém, a composição do soro é variável e ainda indefinida, podendo acarretar em uma ineficiente produtividade em decorrência do variável crescimento celular (Butler, M., 2005). Além disso, os soros de origem animal devem ser inativados a 55° C por no máximo uma hora, com o intuito de inativar o complemento e alguns vírus contaminantes, além de torná-los mais estáveis a temperatura de 4 °C (Freshney, 1994).

Alguns estudos estão sendo realizados para a substituição do soro derivado de animais por outras substâncias de composição definida, como proteínas do fator de crescimento, alfa-globulinas e albuminas (Butler, M., 2005).

Healy e Parker foram capazes de cultivar explantes de células embrionárias de camundongos em um meio de cultura livre de soro bovino e com meio de cultura definido quimicamente. Rubin & Hatie e Levinthal & Rubin notaram que células embrionárias de galinhas crescem sem a adição de soro. Rappaport e Wallis reportaram sucesso no cultivo de células primárias de fígado de macacos na ausência de soro (Orr et al., 1973). Orr et al. (1973) estudaram o cultivo de diversos tipos celulares com a

presença e a ausência do soro no meio de cultura. Foi observado que a adição de soro ou de suas proteínas, como as frações de globulinas e albuminas, permitiram o desenvolvimento de culturas celulares em monocamadas. Algumas células foram capazes de crescer na ausência do soro, porém outras linhagens necessitaram pelo menos da adição das proteínas.

A observação da morfologia celular é uma prática que deve ser feita durante o cultivo celular. Alterações no substrato e na constituição do meio de cultura podem alterar a morfologia celular. Portanto, observações comparativas devem ser feitas em diferentes estágios de crescimento, concentrações celulares ou mesmo em diferentes meios de cultura (Goulet et al., 1996; Freshney et al., 1980).

Atualmente, os meios de cultura são comercialmente vendidos já prontos (importados, sob forma líquida ou sob a forma de pó). Os meios líquidos podem apresentar seus componentes em concentração normal ou dez vezes concentrado. Geralmente, apenas requerem a adição de soro bovino e de antibióticos para serem usados como meio de crescimento. A partir daí, têm tempo de vida limitado porque alguns componentes começam a perder suas propriedades. Os meios em pó tem maior prazo de validade, pois o bicarbonato de sódio e os antibióticos são geralmente omitidos (Freshney, 1994).

2.5.2 Cultura em monocamada

As linhagens celulares podem ser classificadas em dois tipos: linhagens aderentes e em suspensão (não aderentes). As células aderentes dependem da fixação à base dos frascos ou placas de cultura para se proliferarem e representam a grande maioria das

linhagens estudadas. Já as linhagens em suspensão não dependem de ancoragem e se proliferam, como o próprio nome sugere, em suspensão. Esta habilidade é restrita a células hematopoéticas, linhagens celulares transformadas e células tumorais malignas (Carney et al., 1981). Isso porque muitas das propriedades associadas com a transformação neoplásica *in vitro* resultam na modificação da superfície celular, contribuindo para o decréscimo da adesão e aumentando a capacidade das células crescerem em suspensão (Peres e Curi, 2005).

As culturas aderidas ou em suspensão podem ser primárias ou permanentes (imortal ou transformada). As primárias originam-se de células recentemente isoladas de tecidos e possuem tempo limitado de vida em cultura. Já as linhagens permanentes têm capacidade ilimitada de crescimento. Estas são derivadas de células tumorais ou de células que foram transfectadas com oncogenes ou tratadas com carcinogênicos. Elas podem não possuir malignidade, porém seu crescimento é contínuo com vida infinita (Pereira-Smith, 1988).

A manutenção de células aderentes (Figura 15) é simples, uma vez que a substituição periódica do meio (a cada 48h) possibilita a nutrição adequada das células e a eliminação de metabólitos secretados para o meio. Quando a cultura atinge confluência, ou seja, quando as células crescem e preenchem em torno de 90% da garrafa, é necessário replicar a cultura tripsinizando-a (tratamento com tripsina para o descolamento das células da superfície do frasco de cultura). Já para a manutenção de células em suspensão (Figura 16), adiciona-se meio de cultura quando estas estão em

alta densidade. Sempre deve-se calcular a densidade celular para decidir quanto de meio deverá ser adicionado a cultura (Peres & Curi, 2005).

Figura 15: Células aderentes, linhagem IEC-6 (A) Células aderidas em fase de crescimento (B) cultura confluenta (Peres & Curi, 2005).

Figura 16: Cultura de células em suspensão, linhagem Raji (formação dos cachos celulares durante a proliferação) (Peres & Curi, 2005).

Em 1947, Earle e colaboradores descobriram e desenvolveram a técnica de cultivo de células animais em monocamadas sobre superfície sólida, usando meio de cultura líquido. Nessa técnica as células aderem à superfície sólida, achatam-se e multiplicam-se até formarem o que se costuma chamar de tapete celular ou camada contínua, uniestratificada, que tem geralmente a espessura de uma célula (Peres & Curi, 2005).

Quando a cultura em monocamada está muito populosa, as células começam a soltar da superfície e é preciso repicá-las. Para tanto pode-se empregar enzimas proteolíticas, agentes quelantes ou técnicas de raspagem. As enzimas mais empregadas são: tripsina, pancreatina, elastase e colagenase. A tripsina (Figura 17) é usada desde 1916 em soluções salinas completas ou isentas de íons. Só em 1952 foi introduzida por Dulbecco nos métodos de virologia. Ela cataliza a hidrólise de ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou lisina e o grupo amínico de outro aminoácido. Sendo assim ela degrada a matriz protéica (cimento celular) que une as células do tecido, liberando-as na suspensão antes que sejam seriamente danificadas. Este processo de obtenção de suspensões celulares finamente dispersas, a partir de fragmentos de órgãos ou de tecidos, pelo uso da tripsina, chama-se tripsinização. Todo tecido a ser tripsinizado deve ser lavado previamente com solução tampão ou meio de cultura sem soro, para a eliminação do sangue ou soro presente nos tecidos. De acordo com o tipo de célula e da substância intercelular, que determina uma adesão maior ou menor ao substrato, varia-se o tempo de ação da tripsina sobre as células (Freshney, 1994).

Figura 17: Esquema da estrutura da tripsina.

2.5.3 Teste de citotoxicidade – MTT

Existem inúmeros métodos destinados a medir a proliferação e a sobrevivência celular. A própria contagem de células pelo microscópio é um deles, incluindo ou excluindo as células mortas. Existe ainda o método que mede a quantidade de proteínas marcadas com cromo, o método radioativo e o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). O método radioativo, que mede a incorporação de nucleotídeos radioativos ($[^3\text{H}]$ Timidina ou $[^{125}\text{I}]$ Iodo-deoxiuridina), durante a proliferação celular, pode ser parcialmente automatizado, possibilitando a análise de uma grande quantidade de amostras. Porém, mesmo para estes processos automatizados não é possível o processamento de centenas de amostras por dia (Mosmann, 1983).

O MTT, método que uso o sal de tetrazol, tem se mostrado quantitativo para a detecção da proliferação e sobrevivência celular. Este método identifica as células vivas de mamíferos, e não depende de sinais de ativação das células (Momann, 1983).

O sal de tetrazol atua nas mitocôndrias das células vivas. As desidrogenases mitocondriais nos sítios do citocromo *b* e *c* das células viáveis convertem o sal amarelo de tetrazol em um produto azul insolúvel (Azul de Formazan) no meio intracelular, após um período de incubação. Este produto é solubilizado em solvente adequado e pode ser quantificado por um método espectrofotométrico (Leitor de ELISA) (Heo et al., 1990) (Figura 18). A quantidade de Azul de Formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Figura 18: Conversão do MTT nas mitocôndrias das células viáveis. (A) Sal de tetrazol (amarelo e solúvel), (B) Azul de Formazan (insolúvel) (Heo et al., 1990).

O método MTT apresenta várias vantagens frente aos outros métodos, como: capacidade de fornecer resultados rápidos para um grande número de amostras, não necessita de procedimentos de lavagem, não utiliza material radioativo, pode ser utilizado mesmo não havendo proliferação celular e pode ser aplicado para os mais variados tipos de células (Mosmann, 1983). Porém, existem desvantagens, como: impossibilidade de aplicação do método para células não aderentes e diminuição da aderência de alguns tipos celulares acarretando em uma leitura com baixa citotoxicidade (Heo et al., 1990).

O método do MTT, desde que surgiu, tem sido modificado por vários autores. Estas adaptações incluem tempo de incubação, meio de incubação e comprimento de onda usado para leitura das microplacas. No entanto, as modificações mais significativas estão no passo final do processo, ou seja, na escolha de reagentes para a solubilização dos produtos de formazan (Mosmann & Fong, 1989). Estas modificações incluem a substituição do isopropanol HCl, solvente original descrito pelo método de Mosmann, por acetona contendo 0,5% de ácido tricloroacético (Maehara et al., 1986), por 10% de

dodecilsulfato de sódio a 0,01N (Tada et al., 1986), por dimetilsulfóxido (Alley et al., 1986) e por propanol e etanol puros (Denizot e Lang, 1986).

O uso do MTT tem sido utilizado com sucesso na monitorização da sensibilidade de agentes quimioterápicos em cultura de células tumorais (Ferrari et al., 1990).

2.5.4 Emprego da corrente elétrica em cultura de células

Um novo método de liberação de fármacos tem sido empregado para o tratamento do câncer. Neste, um agente antineoplásico é administrado seguido da aplicação de um campo elétrico pulsátil no tumor. Este campo elétrico aumenta temporariamente a permeabilidade das células e, conseqüentemente, a entrada do antineoplásico. Este processo de permeabilização é chamado de eletroporação. O uso combinado da eletroporação e da quimioterapia é conhecido como eletroquimioterapia (Hyacinthe et al., 1999) (Figura 19).

Figura 19: Mecanismos da eletroquimioterapia: eletropermeabilização celular e utilização de agentes citotóxicos. (A) Representação esquemática de uma célula (B) Célula após a aplicação da eletroporação (C) Permeabilização da membrana celular permitindo a entrada do agente citotóxico.

Para a eletroporação ocorrer, as células ou tecidos são expostos a uma corrente elétrica direta por um curto período de tempo (μ s a ms). Isto causa mudança no

potencial elétrico transmembrânico, que leva a ruptura temporária da membrana, permitindo a permeação do agente em teste. Moléculas maiores que 30.000 Da, que normalmente não atravessariam a membrana celular, conseguem entrar nas células facilmente por difusão. O campo elétrico aplicado depende da distância e da configuração dos eletrodos. Geralmente, ele é aplicado com uma intensidade de 800 a 1300 V/cm. Os pulsos elétricos são curtos ($\sim 100 \mu\text{s}$, dependendo das limitações do aparelho), geralmente de "ondas quadradas", com frequência de 1Hz. O número e a duração dos pulsos determinam o grau de permeabilização (Gothelf et al., 2003).

Acredita-se que a eletroporação ocorre quando a aplicação do campo elétrico externo excede a capacidade da membrana celular, proporcionando a entrada de água na célula, formando poros hidrofílicos temporários (Figura 20).

Figura 20: Formação do poro hidrofílico durante a eletroporação, (A) antes da aplicação do campo elétrico, (B) depois da aplicação do campo.

A eficácia da eletroporação tem sido demonstrada em recentes triagens clínicas para o tratamento de melanoma, carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Hyacinthe et al., 1999).

O primeiro experimento de eletroporação foi feito por Neumann et al (1982) em equipamento de eletroporação primitivo. Contudo, a constatação visual da eletroporação

só veio em 1990, pelos experimentos com microscopia eletrônica realizadas por Chang (1992).

Nesses experimentos, amostras de eritrócitos foram tratadas com pulsos de campo elétrico oscilante com frequência de 100 kHz, duração de 0,3 ms e intensidade de 4 a 5 kV/cm. Imediatamente após um intervalo controlado de 1ms a minutos, cada amostra tratada foi imersa em uma mistura líquida de propano e etano refrigerada por nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram então cortadas e observadas em microscópio eletrônico. Esse método permitiu capturar mudanças morfológicas transitórias na membrana celular. Observou-se que a população de poros induzidos apresentou uma distribuição de diâmetros que evoluiu com o tempo após a aplicação do campo elétrico. Para um intervalo de 40 ms, por exemplo, os diâmetros de poros se distribuíram entre 10 e 120nm, com a frequência máxima de poros ocorrendo em torno de 50nm. O método, contudo, tinha resolução de cerca de 2nm, o que significa que os poros muito pequenos não foram considerados. Também foi observado que após alguns segundos a partir do desligamento do campo, os poros induzidos começavam a se fechar, praticamente desaparecendo após um intervalo de 10 segundos (Chang, 1992).

O primeiro estudo clínico do uso da eletroporação para o aumento da permeação de antineoplásicos em tumores foi feito por Belehradek et al. (1993). Desde então, muitos estudos tem sido publicados com este intuito (Heller et al., 1998; Mir et al., 1998; Panje et al., 1998; Gehl & Geertsen, 2000; Sersa et al., 2000a; Gehl et al., 2003).

Apesar da eletroporação permitir a permeabilização da membrana facilitando a entrada de fármacos, este métodos possui algumas desvantagens. A principal delas são

os danos celulares irreversíveis. Como os pulsos são de grande intensidade e comprimento, alguns poros formados na membrana plasmática podem ser muito grandes e serem incapazes de se fechar após a aplicação da corrente, causando a ruptura da célula. Além disso, o transporte de substâncias para dentro das células não é específico, podendo levar a entrada de íons indesejados para dentro das células, causando danos nas suas funções e morte futura (Weaver, 1995).

Sendo assim, alguns estudos estão sendo direcionados para a aplicação de baixa intensidade de corrente elétrica, na tentativa de minimizar os danos teciduais causados pela eletroporação. Sersa & Miklavcic (1993) estudaram a aplicação de baixa intensidade de corrente elétrica no tratamento do câncer *in vivo*, e observaram um retardo no crescimento tumoral nas células de melanoma (de linhagem B16) em camundongos. Batista et al. (1994) estudaram a influência da aplicação de baixa corrente elétrica em cultura de células tumorais AS1 e B16, mostrando que a corrente elétrica foi citotóxica para ambos os tipos celulares.

3.Objetivos

Estudar a permeação iontoforética da DOX incorporada em formulações semi-sólidas e testar a citotoxicidade destas formulações em cultura de células de melanoma com e sem a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade

3.1 Objetivos Específicos

- Estudar a liberação da DOX a partir de géis não iônicos e iônicos.
- Estudar a permeação passiva da DOX a partir de géis não iônicos e iônicos.
- Estudar a permeação iontoforética da DOX a partir de géis não iônicos e iônicos.
- Estudar a citotoxicidade das formulações, na presença e na ausência de DOX, em cultura de células de melanoma de camundongos (B16F10).
- Padronizar uma metodologia para aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade em cultura de células.
- Estudar a viabilidade das células de melanoma de camundongos (B16F10) frente a corrente elétrica de baixa intensidade.
- Estudar a citotoxicidade das formulações contendo DOX frente a aplicação de corrente elétrica em cultura de células de melanoma de camundongos (B16F10).

4.Material e Métodos

4.1 Material

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (SIGMA)
- Cloreto de prata (99,99% pureza) (ALDRICH)
- Cloridrato de doxorubicina Padrão - 99,0% pureza (EUROFARMA)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) - ultra pure (GIBCO)
- Fio de prata pura de 1,5 cm de diâmetro (99,99% pureza) (ALDRICH)
- Fio de platina (ALDRICH)
- HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico) (BAKER)
- Hidroxietilcelulose (Natrosol® 250 HHR) (GALENA)
- Linhagem de célula - melanoma B16F10 de rato (ATCC)
- Meio de cultura Dulbecco's (GIBCO)
- Metanol (grau cromatográfico) (J.T. BAKER)
- Penicilina G 10.000 unidades/mL (GIBCO)
- Polímero carbovinílico (Carbopol® 940) (GALENA)
- Quitosana (peso molecular: 500.000-5.000.000 g/mol) (Hydagen® CMFP) (COGNIS)
- Streptomicina 10.000 µg/mL (GIBCO)
- Soro Bovino Fetal (GIBCO)
- Tetrahidrofurano (grau cromatográfico) (MERCK)
- Tripsina-EDTA (SIGMA-ALDRICH)

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Células de difusão (LG Modelo 1088-IC USA)
- Coluna cromatográfica (LiChrospher, RP -18,5mm, 125 x 4mm) (MERCK)

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU): injetor automático SIL-10AD, bombas LC-10AT, controlador SCL-10A, detector de fluorescência RF 10AXL, desgaseificador DGU-2A, programa de análise cromatográfica CLASS VP
- Dermatômetro (TCM 3000 - NOUVAG)
- Fonte de energia (KEPCO POWER SUPPLY Modelo APH 500DM)
- Leitor automático de microplacas (μ QUANT, Biotek Instruments, Inc.)
- Membrana de diálise de acetato de celulose 12000 a 14000 Da (FISHER)
- Microtiturador (TURRATEC - Tecnal Modelo TE -102)

4.1.2 Pele

Pele da região dorsal de orelha de porco, dermatomizada à espessura aproximada de 500 μ m, obtida menos de 2 horas após o animal ter sido abatido e congelada por até 30 dias antes de ser usada.

4.2 Métodos

4.2.1 Padronização da metodologia analítica para quantificação da DOX por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Deproteinização da amostra

As amostras que foram extraídas da pele, ou que permearam por ela, necessitaram passar por uma reação de deproteínização para serem analisadas (Heraí et al., 2006). Devido a este fato, todas as amostras (que permearam ou não através da pele), receberam o mesmo tratamento, baseado no método proposto por Álvarez-Cédrón et al. (1999). Foram adicionados em 300 μ L das amostras, 400 μ L de uma solução de metanol : ZnSO_4 40% (1:1). Essa mistura foi submetida à agitação em

agitador de tubos por 1 min e a seguir, centrifugada por 10 min a 1507,95 x *g*. O sobrenadante obtido foi então filtrado em filtros de 0,45 µm e analisado por CLAE.

Condições cromatográficas

As amostras de DOX foram deproteinizadas e analisadas por CLAE, baseando-se no método proposto por Álvarez-Cédron et al. (1999) e adaptado por HERAI et al, 2006. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa C₁₈, fase móvel metanol:tampão fosfato pH 3:tetrahidrofurano (50:50:0,5 v/v/v), forno a 35°C, vazão de 1,5 mL/min, volume de injeção de 100 µL e intensidade de fluorescência de 480/555 nm (excitação/emissão).

4.2.1.1 Validação do método analítico

A metodologia analítica utilizada para a quantificação da DOX em tampão HEPES foi validada, avaliando-se os parâmetros analíticos de (a) linearidade, (b) sensibilidade, (c) precisão, (d) exatidão e (e) seletividade (Causon, 1997).

Linearidade

A linearidade foi avaliada, em triplicata para cada concentração, através da construção de curvas analíticas, com valores expressos em ng/mL, a partir de soluções de DOX, em tampão HEPES pH 7,4, nas concentrações de 200 a 600 ng/mL, preparadas por diluição de uma solução padrão na concentração de 10 µg/mL.

A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa 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. A

faixa linear foi calculada usando o coeficiente de correlação linear (r), com o critério mínimo aceitável de (r) = 0,99 (FDA, 2001).

Precisão (Repetibilidade)

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

Foi verificada analisando-se soluções de DOX em tampão HEPES (pH 7,4) nas concentrações de 200, 400 e 600 ng/mL, em cinco replicatas para cada concentração. A análise foi feita com base em uma curva analítica preparada com dados analíticos obtidos de soluções nas concentrações de 200, 300, 400, 500 e 600 ng/mL, em triplicata para cada concentração. Os resultados foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV%) seguindo a equação I:

$$CV\% = \frac{DesvPad}{Conc.Média} \times 100 \quad (\text{Equação I})$$

Onde: *CV%* corresponde ao coeficiente de variação; *Desv Pad* é a estimativa do desvio padrão e *Conc. Média* é a média das medidas em replicata para cada concentração analisada (FDA, 2001).

PRECISÃO INTER-ENSAIO

Foram avaliadas soluções de DOX nas concentrações de 200, 400 e 600 ng/mL, em cinco replicatas para cada concentração e analisadas durante 5 dias consecutivos. Os resultados foram expressos matematicamente através do CV% segunda a equação I.

Exatidão

EXATIDÃO INTRA E INTER-ENSAIO

Foram avaliadas utilizando as mesmas concentrações do estudo de precisão (200,400 e 600 ng/mL). Os resultados foram expressos em função da porcentagem do erro relativo (E%), descrita na equação II.

$$E\% = \frac{Valor_{obtido} - Valor_{real}}{Valor_{real}} \times 100 \quad (\text{Equação II})$$

onde: $E\%$ corresponde à porcentagem de erro relativo; $Valor_{obtido}$ corresponde a concentração obtida após a análise; e $Valor_{real}$ corresponde a concentração que deveria ser encontrada após a análise.

Sensibilidade

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável. Sendo assim foram analisadas soluções de DOX nas concentrações de 200, 150 e 100 ng/mL, em triplicata.

Seletividade

Estudou-se a interferência de amostras do branco da reação de deproteinização, homogeneizado de pele, fita adesiva tipo "durex" e formulações sem DOX (géis de hidroxietilcelulose e quitosana) nas condições cromatográficas de quantificação da DOX.

4.2.1.2 Estudo de estabilidade

Estabilidade da DOX em água e em tampão HEPES (pH 7,4) com 133 mM NaCl

Soluções de DOX a 500 ng/mL foram preparadas em água, deproteinizadas imediatamente e analisadas por CLAE, no tempo 0, 24 e 48 horas. Soluções de DOX a 500 ng/mL também foram preparadas e deproteinadas somente após 24 e 48 horas.

O mesmo experimento foi realizado com as soluções de DOX em tampão HEPES (pH 7,4) contendo 133 mM de NaCl.

Estudo do pH e da condutividade elétrica

Foram realizados os estudos do pH das formulações (solução aquosa, gel de HEC e quitosana) antes e depois da aplicação da iontoforese. Também foram realizados os estudos de condutividade elétrica dos géis contendo 0,5% de DOX.

4.2.2 Desenvolvimento das formulações

Solução salina de DOX a 0,5%:

Dissolveram-se 50 mg de DOX e 69,5 mg de cloreto de sódio em um béquer com água destilada. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL onde completou-se o volume da solução com água.

DOX a 0,5% em gel de Hidroxietilcelulose (HEC)

Foi preparado um gel de HEC a 1,5% pesando-se 0,15 g de HEC, adicionando-se 0,5 g de propilenoglicol e completando-se a massa para 10 g com água destilada. A suspensão foi então aquecida e agitada até a formação do hidrogel.

Em um gral de vidro com o auxílio de um pistilo incorporou-se 50 mg da DOX e 69,5 mg de NaCl em 10 g do gel usando-se uma quantidade mínima de propilenoglicol como agente de levigação.

DOX a 0,5% em gel de Quitosana

Foi preparado um gel de quitosana a 2% pesando-se 500mg de quitosana e dispersando-a em 25ml de uma solução aquosa de ácido acético a 0,5% (v/v) sob

agitação constante durante uma noite. Em um gral de vidro com o auxílio de um pistilo incorporou-se 50 mg da DOX e 69,5 mg de NaCl em 10 g do gel usando-se uma quantidade mínima de propilenoglicol como agente de levigação.

4.2.3 Estudo de liberação da DOX a partir das formulações desenvolvidas

Para se testar a influência dos diferentes tipos de formulações na liberação da DOX, ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando-se células de difusão vertical tipo “Franz” e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (Figura 21).

Figura 21: Célula de difusão vertical tipo “Franz”.

A membrana foi colocada horizontalmente entre o compartimento doador e receptor da célula (área 1,3 cm²). A solução receptora (5,5 mL) presente no compartimento inferior da célula foi uma solução tampão HEPES isotonicada com NaCl, pH 7,4. Esta perfundiu o compartimento receptor num fluxo de ~ 1 mL/ min durante 12 horas. No compartimento doador, na metade superior da célula, foi adicionado 1 g das formulações descritas no item 4.2.2.

A solução receptora foi mantida a 37°C e agitada a 300 rpm. As amostras foram coletadas de tempo em tempo em um coletor de fração pré-programado. As concentrações de fármaco liberadas foram determinadas por CLAE (item 4.2.1).

4.2.3.1 Determinação da quantidade de DOX liberada – cálculos para correção da diluição

Devido ao fluxo contínuo da solução receptora através da célula de difusão e retirada da amostra para análise a cada hora, fez-se necessária a correção dessa diluição no cálculo da quantidade liberada acumulada de DOX ao longo das 12 h de experimento. Sendo assim, a quantidade real liberada acumulada do ativo foi calculada de acordo com a equação III.

$$Q_{real,t} = C_{medida,t} \cdot V_r + \sum C_c \cdot V_c \quad (\text{Equação III})$$

Onde:

$Q_{real,t}$ = quantidade permeada no tempo t;

$C_{medida,t}$ = concentração medida no tempo t;

V_r = volume do receptor (5,5 mL)

C_c = concentração da amostra coletada;

V_c = volume de amostra coletada (0,84 mL)

Só então a quantidade real liberada em cada tempo foi dividida pela área da membrana em contato com a formulação (1,3 cm²) para se determinar o perfil de liberação da DOX em função do tempo.

4.2.3.2 Determinação da cinética de liberação da DOX a partir das formulações estudadas

Através da construção de modelo gráficos relacionando a quantidade real acumulada de ativo dividida pela área da membrana em contato com as diferentes formulações estudadas e o tempo de experimento, pôde-se determinar o perfil de liberação do ativo a partir das formulações. Para isso, foram construídos três gráficos para cada formulação :

- a) Quantidade real liberada acumulada (ng/cm^2) *versus* tempo (horas): Modelo Cinético de Ordem Zero
- b) Quantidade real liberada acumulada (ng/cm^2) *versus* $\sqrt{\text{tempo}}$ (horas): Modelo Cinético de Higuchi
- c) Log da quantidade real liberada acumulada (ng/cm^2) *versus* tempo (horas): Modelo Cinético de Primeira Ordem.

A análise dos dados foi obtida pelo método de regressão linear do mínimos quadrados e o gráfico que apresentou maior coeficiente de correlação linear (r) definiu a cinética de liberação. Com a cinética de liberação definida, a velocidade de liberação (K) da DOX das formulações foi calculada a partir da inclinação da curva correspondente.

4.2.4 Estudo de penetração cutânea da DOX

Estes estudos foram realizados in vitro utilizando-se células de difusão descritas por Glikfield et al. (1988). Estas células (Figura 22) diferem das células utilizadas nos estudos de liberação (item 4.2.3) na sua metade superior, a qual é dividida em dois compartimentos e estes compartimentos são separados por um pequeno espaço entre

eles (terceiro compartimento). Este espaço permite nos estudos de iontoforese que as partes da pele em contato com os eletrodos fiquem física e eletricamente isoladas entre si.

Figura 22: (A) Célula de difusão iontoforética, (B) Vista superior do compartimento doador.

4.2.4.1 Estudo de permeação cutânea passiva da DOX

O estudo de permeação passiva foi realizado utilizando-se células de difusão descritas por Glikfield (Figura 22) com pele dermatomizada de orelha de porco como membrana. A pele foi colocada entre as duas metades da célula, com a epiderme (área de $1,3 \text{ cm}^2$) voltada para o compartimento doador. A solução receptora (5,5 mL) de tampão HEPES pH 7,4 isotonicado com NaCl foi colocada na parte inferior da célula e, apesar de neste compartimento existirem “portas para perfusão” (que permitem que o fluido seja coletado continuamente - fluxo contínuo) estas foram fechadas. Sendo assim, esses experimentos foram conduzidos com fluxo estático e as amostras foram coletadas

apenas no final do experimento. Nos compartimentos doadores foram adicionados 1g das formulações descritas no item 4.2.2.

A solução receptora foi mantida a 37° C e agitada a 300 rpm durante todo o tempo do estudo. Após 6 horas, a quantidade de DOX presente na solução receptora foi analisada por CLAE (item 4.2.1).

4.2.4.2 Estudo da permeação iontoforética da DOX

O estudo da permeação iontoforética da DOX também foi realizado nas células de difusão descritas por Glikfield et al (1988), com pele de orelha de porco dermatomizada como membrana. Os eletrodos utilizados nos experimentos com aplicação de corrente elétrica foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl), obtidos segundo Lopez (2000). Para obtenção do eletrodo negativo, utilizou-se um bico de Bunsen, e um cadinho de porcelana onde foi fundida uma quantidade de cloreto de prata (AgCl) suficiente para mergulhar um pequeno fio de prata com a ponta dobrada. Após a imersão do fio de prata (99,9% de pureza), este foi retirado com a extremidade dobrada completamente recoberta com cloreto de prata solidificado e então parte de sua haste foi encapada com um plástico isolante (Figura 23).

Figura 23: Procedimento para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Um pedaço de fio de prata foi dobrado (A) e mergulhado em um cadinho com cloreto de prata fundido. Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (B) o eletrodo foi encapado com plástico isolante (C) estando pronto para o uso.

Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), foi preparado um circuito elétrico em série com os eletrodos de AgCl e fios de platina imersos em uma solução salina de NaCl. O terminal positivo do gerador foi conectado ao pedaço de fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo de AgCl (Figura 24), o qual foi reduzido a Ag através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6 mA por 8 horas.

Figura 24: Representação esquemática do circuito elétrico em série para o preparo do eletrodo positivo (ânodo) através da passagem de uma corrente elétrica de 0,6 mA por 8 horas.

A célula de difusão foi montada com a pele da orelha de porco dermatomizada separando os compartimentos doadores (dos eletrodos) do compartimento receptor. Este último foi perfundido com a solução receptora (tampão HEPES, pH 7,4, isotonicado com NaCl) por um período de equilíbrio de 1 h. Os compartimentos dos eletrodos, na metade superior da célula, foram adicionados de 1 g das formulações descritas no item 4.2.2 no ânodo (eletrodo positivo) e 1 mL de solução tampão HEPES isotonicado, pH 7,4 no cátodo (eletrodo negativo). Sobre as câmaras doadoras (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 destes 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 de 0,4 mA, mantida constante e contínua por 6 h. A densidade da corrente, em função da área exposta, foi de 0,5 mA/cm². 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 estática, a 37°C e agitada a 300 rpm por 6 h. Após este período, a quantidade de DOX que permeou a pele, presente na solução receptora, foi quantificada por CLAE como descrito no item 4.2.1.

4.2.4.2.1 Estudos de estabilidade do fármaco frente a corrente elétrica

Antes de se realizarem os experimentos de iontoforese, foi verificado se não haveria algum tipo de degradação ou reação do fármaco na presença da corrente elétrica. Para isso, géis de HEC e de quitosana contendo DOX (item 4.2.2) foram analisados em triplicata antes e depois de serem colocados em contato com uma corrente elétrica de 0,4 mA por 6 horas. Para a análise, os géis foram convenientemente diluídos em água. Seu pH também foi analisado antes e após a passagem da corrente elétrica.

4.2.4.3 Estudos de retenção da DOX na pele

Após o término dos experimentos de permeação cutânea (passiva e iontoforética), a pele foi retirada da célula de difusão, o excesso de formulação

removido com água destilada, e a pele presa a uma superfície lisa com o estrato córneo voltado para cima. A região da pele em contato com a solução de DOX foi submetida à técnica de “*tape stripping*”. Nessa técnica, o estrato córneo foi retirado utilizando-se 15 fitas adesivas. A remoção mais ou menos completa do estrato córneo foi indicada pelo “brilho” da face exposta da pele (epiderme viável). As 15 fitas adesivas, contendo partes do estrato córneo removido, foram colocadas em um tubo, e o fármaco aí contido foi extraído segundo método padronizado por Herai (2004) com 5 mL de metanol/água (1:1) sob agitação em mixer por 3 min. Após esse período, a solução foi filtrada e analisada por CLAE para determinação da concentração de DOX presente no estrato córneo (EC).

A pele remanescente (epiderme sem EC + derme) foi picotada, colocada em um tubo, e a quantidade de fármaco aí presente foi extraída com 5 mL de metanol/água (1:1), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos por 3 min, e após com um sonificador, por 30 min, para romper a membrana das células (Herai, 2004). Após centrifugação e filtração a solução foi analisada por CLAE para a determinação da quantidade de fármaco presente na “epiderme viável” (epiderme sem EC + derme). Todas as amostras foram deproteinizadas como descrito anteriormente e analisadas por CLAE (item 4.2.1).

4.2.4.4 Microscopia de Fluorescência

Como a DOX emite fluorescência, foram realizados estudos de microscopia de fluorescência para elucidar sua localização na pele, na presença e na ausência de corrente elétrica, adaptando-se o método proposto por Jezek et al. (2003). Sendo

assim, após os experimentos de penetração cutânea *in vitro* da DOX, a pele dermatomizada de orelha de porco foi congelada em uma solução de Tissue Tek[®] (O. C. T.), em um banho de gelo seco e acetona, para preservação da fluorescência da DOX, bem como para facilitar o seu corte. Desta forma, foram feitos cortes transversais do tecido congelado (numa espessura de aproximadamente 20 µm) em criostato. Os cortes de tecido foram incluídos em lâminas extra-brancas gelatinizadas, para evitar que estes se descolassem da lâmina durante o processo de coloração. Foi utilizado para corar as lâminas 200 µL de uma solução de DAPI (diamidinofenilindol) (solução concentrada de 1 µg/mL – diluída 1:9 em uma mistura de glicerol e água 1:1) por 5 minutos. Os cortes foram lavados com tampão fosfato pH 7,4 e a lamínula foi colocada com a adição de 1 gota de glicerol. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica, utilizando as objetivas de 40x e filtro de comprimento de onda de excitação adequado para a DOX (450 a 555 nm).

4.2.5 Estudos *in vitro* em cultura de células

4.2.5.1 Soluções e reagentes

MTT

Foram dissolvidos em água Milli Q50 mg do reagente colorimétrico MTT, num balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma solução a 5 mg/mL. Esta solução foi esterilizada por meio de filtração em membrana de 0,22 µm em capela de fluxo laminar. Posteriormente foi aliquoteada em eppendorfs estéreis de 1 mL e estocada a temperatura de -6 °C (freezer).

Tripsina

A tripsina adquirida comercialmente foi colocada em vários eppendorfs estéreis de 1mL e estocada a temperatura de -6 ° C (freezer).

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

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

Solução de Turk

Foram dissolvidos em água Milli Q 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de violeta de genciana (2%), num balão volumétrico de 500 mL. Esta solução foi utilizada para a contagem de células na proporção de 1:20 amostra / solução de Turk.

4.2.5.2 Meio de cultura de celular

Para manutenção das linhagens dos tumores e realização dos ensaios de atividade antitumoral, foi utilizado o meio de cultura Dulbecco's (pH 7,2 - 7,4), suplementado com 7,5% de soro bovino fetal, 10.000 U/mL penicilina G, 10.000 µg/mL estreptomicina, 1,5 g/L bicarbonato de sódio. Este meio foi preparado e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm em capela com fluxo laminar.

Inativação do Soro Bovino Fetal (SBV)

Para utilização do SBF no meio de cultura foi necessário 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.

4.2.5.3 Linhagens de tumores

Foram utilizadas linhagens de tumores de rato - B16F10 (melanoma maligno). As linhagens tumorais foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Esta linhagem é mantida em criopreservação em nitrogênio líquido em solução de congelamento com 10 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90 % de SBV inativado.

Para o estudo *in vitro* desta linhagem as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, em meio Dulbecco's completo (como descrito no item 4.2.5.2), à temperatura de 37° C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

4.2.5.4 Ensaio de atividade antitumoral – Teste do MTT

Para realização deste ensaio, as células tumorais em crescimento foram removidas dos frascos de cultura celular pela adição de uma solução de Tripsina a 0,5% em tampão fosfato. Os frascos foram então mantidos em agitação manual por aproximadamente 60 segundos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio Dulbecco's completo para neutralizar a tripsina. As células foram então transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 1000 rpm, à 10° C por 15 minutos. Foi feita a contagem delas em Câmara de Neubauer, seguida de ressuspensão das mesmas em meio Dulbecco's e plaqueamento na densidade de 1×10^5 células em 200 µL de meio por poço. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37° C, em estufa com atmosfera umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após a incubação, trocou-se o meio de cultura da placa, retirando-se os 200 µL de meio dos poços e colocando-se 100 µL de

meio novo. Várias concentrações das formulações testes (item 4.2.5.4.1) foram colocadas nos poços com as células e depois completou-se com meio novo o volume do poço para 200 μ L. Foi feita nova incubação por mais 24 horas. Após este período o meio de cultura foi renovado pela segunda vez, e adicionado, em cada poço, 10 μ L do reagente MTT na concentração de 5mg/mL. A placa foi então incubada por mais 3 horas a 37° C em estufa com atmosfera umidificada. A cada poço adicionou-se então 50 μ L de uma solução de dodecilsulfato de sódio a 10% em HCl 0,01M para dissolver os sais de formazan (formados após redução do MTT que reagiu com as células viáveis). A quantidade de azul de formazan foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro (ELISA) a 570 nm, após manter a placa por uma noite no escuro a temperatura ambiente. A porcentagem de citotoxicidade das formulações em estudo foi determinada conforme descrito na equação IV.

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{(1 - \text{absorbância dos poços tratados})}{(\text{absorbância dos poços controles})} \times 100\% \quad (\text{Equação IV})$$

4.2.5.4.1 Formulações testados nos estudo de citotoxicidade

Formulações preliminares

Formulações contendo DOX em diferentes concentrações foram adicionadas nos poços das microplacas para se obter concentrações finais do fármaco que variaram de 0,5 ng/mL a 1000 ng/mL.

As formulações estudadas contendo DOX foram as seguintes :

- Solução aquosa contendo 119 mM de NaCl
- Gel de HEC a 0,5% contendo 119 mM de NaCl

- Gel de quitosana a 1% contendo 119 mM de NaCl
- Dispersão de monoleína a 5% em propilenoglicol

Com este estudo selecionou-se a faixa de concentração de DOX que deveria estar presente no meio de cultura.

Formulações testadas

As mesmas formulações contendo 0,1% de DOX, descritas no item anterior foram preparadas. Porém, a concentração final de DOX nos poços das microplacas variou de 10 a 50 ng/mL. Estas concentrações foram obtidas adicionando-se de 2 a 20 µL das formulações preparadas contendo DOX nos poços (200 µL).

Para se determinar a influência de cada componente das formulações na citotoxicidade das células de melanoma, diferentes formulações na ausência de DOX foram estudadas, são elas:

- Gel de HEC a 0,5% e a 0,05%
- Gel de quitosana a 1%, 0,5% e a 0,05%
- Géis de quitosana 1% e de HEC 0,5% contendo ou não 5% de propilenoglicol
- Dispersão de monoleína a 5% e a 0,05% em propilenoglicol
- Solução de propilenoglicol em água (1% a 100% de propilenoglicol)
- Dispersão de monoleína em água (1:1)
- Dispersão de monoleína a 5%, 0,5%, 0,05% e a 0,005% em água na presença de um agente dispersor (poloxamer a 0,5%)
- Poloxamer a 0,5%, 0,05%, 0,005% e a 0,0005% em água

4.2.5.5 Ensaio de atividade antitumoral com aplicação de corrente elétrica

Para a realização dos testes com aplicação da corrente elétrica, foi necessária a confecção prévia dos eletrodos e das pontes salina, as quais conduzem a corrente elétrica para dentro dos poços das placas de cultura, evitando o contato direto dos eletrodos com as células.

Eletrodos

Os eletrodos foram preparados como descritos no item 4.2.4.2.

Ponte salina – 10% e 0,9%

Foram pesados 0,3 g de ágar e 2 g (10%) ou 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 25).

Figura 25: 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.

Montagem do circuito elétrico

Para aplicação da corrente elétrica, em placas de 6 ou 24 poços, os eletrodos positivo (Ag) e negativo (AgCl) foram colocados em recipientes plásticos separados contendo uma solução saturada de NaCl. O circuito elétrico destes com o meio de cultura presente nas placas foi completado com o auxílio das pontes salinas, como ilustrado na Figura 26.

Figura 26: 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.

Os eletrodos foram conectados a uma fonte de energia (Figura 27), onde foram programadas as intensidades de corrente e o tempo de aplicação dos experimentos.

Figura 27: Phoresor® - Fonte de energia utilizada nos experimentos em cultura de células.

4.2.5.5.1 Viabilidade das células frente a corrente elétrica

A viabilidade das células de melanoma frente a intensidade de corrente elétrica foi avaliada em placas de 6 poços com $9,5 \text{ cm}^2$ de área cada, contendo 5×10^5 células e 8 mL de meio de cultura por poço. A densidade de corrente elétrica aplicada variou de 0,07 a $0,4 \text{ mA/cm}^2$, com duração de 10 minutos. As pontes salinas utilizadas para ligar os eletrodos ao meio de cultura continham 10% de NaCl. A viabilidade das células foi avaliada imediatamente após os 10 minutos de tratamento, pelo método Azul de Tripan (item 4.2.5.5.2).

As placas de 24 poços com $1,9 \text{ cm}^2$ de área cada, contendo 2×10^5 células e 2 mL de meio de cultura também foram submetidas a diferentes densidades de corrente elétrica ($0,05$ a $0,5 \text{ mA/cm}^2$) por 10 minutos, através da utilização de eletrodos de Ag/AgCl e ponte salina com 10% de NaCl e avaliadas imediatamente após o tratamento pelo método Azul de Tripan e após incubação pelo método do MTT (item 4.2.5.5.3).

A viabilidade das células nas placas de 24 poços após aplicação de 10 minutos de corrente elétrica ($0,05$ a $0,5 \text{ mA/cm}^2$) também foi avaliada utilizando-se ponte salina com 0,9% de NaCl, variando-se a quantidade inicial de células por poço (2×10^5 , 6×10^5 e 8×10^5). Nestes casos a viabilidade celular foi avaliada apenas pelo método do MTT (item 4.2.5.5.3).

4.2.5.5.2 Método do Azul de Tripan

Imediatamente após a aplicação da corrente elétrica, o meio de cultura celular presente nos poços das placas foi substituído por 1 mL de corante Azul de Tripan para

observação em microscópio invertido. Foram contadas 100 células entre vivas e mortas para o cálculo da citotoxicidade frente a corrente elétrica.

4.2.5.5.3 Método do MTT

Após aplicação da corrente elétrica as células foram incubadas por 25 horas a 37°C em estufa com atmosfera umidificada contendo 95 % O₂ e 5% de CO₂. O meio de cultura foi então renovado e adicionado 100 µL do reagente MTT. A placa foi incubada novamente por mais 3 horas e, em seguida, adicionou-se 500 µL da solução de SDS em cada poço. A placa foi mantida por uma noite ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após este período, o conteúdo dos poços (totalizando 2 mL) foi transferido para placa de 96 poços, pipetando-se 200 µL deste conteúdo em triplicata. Foi determinada a citotoxicidade da corrente elétrica no leitor de ELISA.

4.2.5.5.4 Citotoxicidade da DOX frente a corrente elétrica

Estes estudos foram feitos em placas de 24 poços (1,9 cm² cada), contendo 6 x 10⁵ células e 2 mL de meio de cultura por poço. As formulações (item 4.2.5.5.4.1) foram aplicadas nas placas nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos de citotoxicidade na ausência de corrente elétrica. Um circuito elétrico foi montado utilizando os eletrodos de Ag/AgCl e pontes salinas contendo 0,9% de NaCl (Figura 26). A corrente elétrica (0,5 mA/cm²) foi aplicada por 10, 20 e 60 minutos. Após este período as placas foram incubadas por 24 horas e a viabilidade das células submetidas a corrente elétrica e a presença de DOX foi avaliada pelo teste do MTT (item 4.2.5.5.3).

4.2.5.5.4.1 Formulações submetidas a corrente elétrica

Apenas a dispersão de monoleína a 5% em propilenoglicol não foi utilizada neste estudo por não conduzir corrente elétrica.

A solução aquosa, o gel de HEC a 0,5% e o gel de quitosana a 1%, todos contendo 0,1% de DOX, foram pipetados (20 a 100 μ L) nos poços das placas e submetidos a corrente elétrica (item 4.2.5.5.4). A concentração final de DOX em cada poço variou de 10 a 50 ng/mL.

5.Resultados e Discussão

Os resultados e a discussão serão disponibilizados após a publicação do trabalho.

6. Conclusão

A conclusão será disponibilizada após a publicação do trabalho.

7.Referências Bibliográficas

ABRAHAM, B.W. The factors that influence skin penetration of solutes. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 47, p. 8-16, 1994.

ACKERMAN, A. B.. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. **Arch. Dermatol.**, v.139, p.1216 ,2003

ACTON, R. T., BARSTAD, P. A., ZWEWNER, R. K. Propagation and scalling-up of suspensions culture. **Methods Enz.**, v.50, p.211-221 , 1979.

ALAM, M., RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v.344, n.13, p.975-983, 2001.

ALLEY, M. C., SCUDIERO, D. A. MONKS, A., CZERWINSKI, M. J., SHOEMAKER, R. H., BOYD, M. R. Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to asses growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v.27, p.389, 1986.

ALVARES-CEDRON,L., SAYALERO, M. L., LANA O, J. M. High-performace liquid chromatographic validated assay of doxoribicin in rat plasma and tissues. **J. of Chromatography**, v.721, p.271-278, 1999.

ANVISA, Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Poder Executiva, Brasília, DF, 02 janeiro de 2003.

ARNOLD, R. D., SLACK, J. E., STRAUBINGER, R. M. Quantification of doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue sample by liquid chromatography / electrospray tandem mass spectroscopy. **J. of chromatography**, v.808, p.142-152, 2004.

ASPEREN J.; TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.H. Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 7, n. 712, p. 129-143, 1998.

ASSEFAA, Z., LAETHEMB, A. V., GARMYNC, M., AGOSTINISB, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes : on the role of cytosolic factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1755, p.90- 106, 2005.

BANGA, A. K., CHIEN Y. W. Iontophoretic Delivery of drugs : Fundamentals, developments and biomedical applications. *J. of Cont. Release*, v.7, p.1-24, 1988.

BARRY, B. W. Drug delivery rates in skin : a novel approach. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.54, p.S31-S40, 2001.

BATES, C. J., LEVENE, C. I. Growth and macromolecular synthesis in the 3T6 mouse fibroblast II. The role of serum. **J. Cell Sci.**, v.7, p.683-693, 1970.

BATISTA, U., MIKLAVCIC, D., SERSA, G. Low level direct current – cell culture fibroblast model. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.35, p.99-101, 1994.

Bergh, B. A. I V., Swartzendruber, D. C., Geest, A. B., Hoogstraate, J. J., Schrijvers, A. H. G. J., Boddé, H. E., Junginger, H. E. e Bouwstra, J. A. Development of an optimal

protocol for ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. **J. Microscopy**, v.187, p.125-133, 1997.

BODDÉ, H. E., ROEMELÉ, P. E. H., STAR, W. M. Quantification of topically delivery 5-aminolevulinic acid by iontophoresis across ex vivo human stratum corneum. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, p.418-423, 2002.

BORENFREUD, E., BABICH, H. AND MARTIN-AGUACIL, N. Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT test. **Toxic. In Vitro**, v.2:1, 1988.

BOSE, S.; RAVIS, W.R.; LIN, Y.J.; ZHANG, L.; HOFMANN, G.A.; BANGA, A.K. Electrically-assisted transdermal delivery of buprenorphine. **J. Control. Release**, v.73, n.2-3, p.197-203, 2001.

BOUWSTRA, J. A., NGUYEN, P.L. H. Skin structure and mode of action of vesicles. **Ad Drug Deliv. Rev.**, v.54, p-S41-S55, 2002.

BOYD, AS, SHYR, Y, KING, LE JR. Basal cell carcinoma in young women: an evaluation of the association of tanning bed use and smoking. **J Am Acad Dermatol**, v.46, p.706, 2002.

BRUCE, A., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER. **Molecular Biology of the cell**. Fourth Edition. New York and London, Garland Science, c2002.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.68, p.283-291, 2005.

CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W.G., GAZDAR, A.F., MINNA, J.D. AND MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, v.47, p.936, 1987.

CARNEY, D. N., BURN, P. A., GAZDAR, A. F., PAGAN, J. A., MINNA, J. D. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. **Proc Natl Acad Sci.**, v.78, p.3185-3189, 1981.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion, **J. Chromatography B.**, v.689, p.175-180, 1997.

CERCHIARA, T., LUPPI, B., BIGUCCI, F., ORIENTI, I., ZECCHI, V. Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. *J. pharm. Pharmacol.*, v.54, n.11, p. 1453-1459, 2002.

CHANG, B. K., GUTHRIE, T. H. A pilot study of iontophoretic cisplatin chemotherapy of basal and squamous cell carcinomas of the skin. **Arch Dermatol.**, v.129, p. 425-427, 1993.

CHANG, D.C., "Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid -freezing electron microscopy", **Guide to Electroporation and Electrofusion**, Academic Press, San Diego-California, 1992.

CHESNOY, S.; DURAND, D.; DOUCET, J.; COURRAZE, G. Structural parameters involved in the permeation of propranolol HCl by iontophoresis and enhancers. **J Control Release**, v.58, p.163-175, 1999.

CHIEN, C. M., FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.21, p.75-84,1999.

CHIEN, W.Y. Novel drug delivery systems, 2. ed. New York: M Dekker, (Drugs **and the pharmaceutical sciences**, v. 50), 1992.

CLINICAL PRACTICE GUIDELINES IN ONCOLOGY. National comprehensive cancer network, Melanoma. v-2,2006.

CORNWELL, P.A. AND BARRY, B.W., 1994. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.46, p.261-269, 1994.

CURDY, C., KALIA, Y. N., FALSON-RIEG F., GUY R. H., 2000. Recovery of human skin impedance in vivo after iontophoresis : effect of metal ions. AAPS Pharm Sci. 2:E23.

Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v.89, p.271, 1986.

DEVITA, V.T. Cancer: principles and practice of oncology. 6th ed.,2005.

DODANE, V., KHAN, M.A., MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **Int. J. of Pharmaceutics**, v.182, n. 1, p.21-32, 1999.

DOROSHOW JH. ANTHRACYCLINES AND ANTHRACENEDIONES. In: Chabner BA, Longo DL, eds. Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.500, 2001.

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

DREHER, M. R., RAUCHER, D., BALU, N., COLVIN, O. M., LUDEMAN, S. M., CHILDOTI, A. Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy. **J of Control release**, v.91, p.31-43,2003.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p. 501-504,1955.

EISEN, M. M. Risk assessment and early detection of skin cancers. **Seminars in Oncology Nursing**, v.19, p.43-51,2003.

FANG, J. Y., SUNG, K. C., WANG, J. J., CHU, C. C., CHEN, K. T. The effects of iontophoresis and electroporation on transdermal delivery of buprenorphine from solutions and hydrogels, **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, p.1329-1337, 2002.

FDA, Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. Center of Drug Evaluation and Research, 2001. Disponível em www.fda.gov.

FERRARI, M., FORNASIERO, M. C., ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J of Immunol Methods**, v.131, p.165-172, 1990.

FREITAG, L., ERNST, A., THOMAS, M., PRENZEL, R., WAHLERS, B., MACHA, H. N. Sequential photodynamic therapy (PDT) and high dose brachytherapy for endobronchial tumor control in patients with limited bronchogenic carcinoma. **Thorax**, v.59, n.9, p.790-793, 2004.

FRESHNEY, R. I. Cultue of animal cells – A manual of basic technique. Third edition. Wiley-liss, New York, 1994.

FRESHNEY, R. I., SHERRY, A., HASSANZADH, M., FRESHNEY, M., CRILLY, P., MORGAN, D. Control of cell proliferation in human by glucocorticoids. **Br J Cancer**, v.41, n.6, p. 857-866, 1980.

GABER, M, H., GHANNAM, M. M., ALI, S. A., KHALIL, W. A., 1998. Interaction of Doxorubicin with a phospholipid monolayer and liposomes. **Biophysical chemistry**, v.70, p. 233-229,1998.

GAILANI, MR, LEFFELL, DJ, ZIEGLER, A, ET AL. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst.**, v.88, p.349,1996.

GALE, J. S., PROULX, A. A., GONDER, J. R., MAO, A. J., HUTNIK, C. M. L. Comparison of the In Vitro Toxicity of Indocyanine Green to That of Trypan Blue in Human Retinal Pigment

Epithelium Cell Cultures. **American Journal of Ophthalmology**, v.138, p.64-69, 2004.

GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta Physiol Scand.**, v.177, p.437-447, 2003.

GILCHREST, B. A., ELLER, M. S., GELLER, A. C., YAAR, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **The new England Journal of Medicine**, v.340, n.17, p.1341-1348, 1999.

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.

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

GOULET, F., POITRAS, A., ROUABHIA, M., GERMAIN, L., AUGER, F. A. Stimulation of human keratinocyte proliferation through grow factor exchanges with dermal fibroblast in vitro. **Burns**, v.22, n.1, p.107-112,1996.

GREEN, A., BATTISTUTTA, D, H, V. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. The Nambour Study Group. **Am. J. Epidemiol.**, v.144, p.1034, 1996.

GUTHERIE, T. H. Sucessful systemic chemotherapy of advanced squamous and basal cell carcinoma of the skin with cis-diamminedichloraplatium III and doxorubicin. **Laryngoscope**, v.G2, p.1298-1299, 1982.

HABERMANN, E., MULLER, B. Oxoferin and sodium chlorite, a comparison. **Klin Wochenschr**, v.67, n.1, p.20-25, 1989.

HADGRAFT, J. E LANE, M. E. Skin permeation : the years of enlightenment. **Int. J. Pharmaceutics**, v.305, p.2-12, 2005.

HALUSKA, F. G., HODI, F. S. Molecular Genetics of Familial Cutaneous Melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.16, p.670-682, 1998

HAN, I., KIM. M., KIM, J. Enhanced transfollicular delivery of andramycin with a liposome and iontophoresis. **Experimental Dermatology**, v.13, p.86-92, 2004

HEO, D. S., PARK, J. G., HATA, K., DAY, R., HERBERMAN, R. B., WHITESIDE, T. L. Evaluation of tetrazoliu-based semiautomatica colorimetrica assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. **Cancer Research**, v.50, p.3681-3690, 1990.

HERAI, H. Liberação da doxorubicina para a utilização quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção. Ribeirão Preto, Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 165 p.: il., 2004.

HERAI, H. ; GRATIERI, T. ; THOMAZINE, J. A. ; BENTLEY, M. V. L. B. ; LOPEZ, R. F. V. . Doxorubicin release from monoolein-containing propylene glycol formulations and skin penetration in topical tumor therapy. **Int. J. of Pharm.**, v.329, n. 1-2, p.88-93, 2006.

HEYWANG, C., CHAZALET, M. S., MASSON, M., BOLARD, J. Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance raman scattering study. **Biophysical Journal**, v.75, p.2368-2381, 1998.

HIRVONEN, J., GUY R. H. Transdermal iontophoresis : modulation of electrosmosis by polypeptides. **J. of Control. Release**, v.50, p.283-289, 1998.

HUNTER, F. R., BANFIELD, W. G. The effect of swelling on the respiration of erythrocytes. The Journal of general physiology. **Volume change and respiration**, v.297, p.302, 1940.

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

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

JADOUL, A., BOUWSTRA, J., PRÉAT, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.35, p.89-105, 1999.

JO, J. Y., MEJIA, E. G., LILA, M. A. Cytotoxicity of bioactive polymeric fractions from grape cell cultura on human hepatocellular carcinoma, murine leucemia and non-cancerous PK 15 kidney cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.44, n.10, p.1458-1767, 2006.

KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.56, p.619-58, 2004.

KATSUTA, H., TAKAOKA, T., HOSAKA, S., HIBINO, M., OTSUKI, I., HATTORI, K., SUZIKI, S., MITAMURA, K. **Jap. J. Exp. Med.**, v.29, p.45, 1959.

KINOSITA, K.JR. E TSONG, T.Y., Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane, **Nature**, v.268, p.438-441, 1977

KÜMMERLE, A., KRUEGER, T., DUSMET, M., VALLET, C., PAN, Y., RIS, H. B., DESCOSTERD, L. A. A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model : matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements. **J. of Pharm. and Biom. Analysis.**, v.33, p.475-494, 2003.

KYRIAKIDES , T. R. CHEUNG , C. Y.,. MURTHY N., BORNSTEIN P., STAYTON P. S,. HOFFMAN, A. S. pH-Sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. **J. of Control Release**, v.78, p.295–303, 2002.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Fundação caloouste gulbenkian, Lisboa, 2001.

Lattin, G. A., Bernsteins, K. J., 1998. US Patent 5,843,014.

LIU, X.; CHEN, Z.; CHUA, C.C.; MAY, S.; YOUNGBERG, G.A.; HANDY, R.; CHUA, B.H. Melatonin as a effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, p. 254-263, 2002.

LOADMAN, P. M., CALABRESE, C. R. Separation methods for anthraquinone related anti-cancer drugs. **J. of Chromatography B.**, v.764, p.193-206, 2001.

LOCKE, J., KARIMPOUR, S., YOUNG., G., LOCKETT, M. A. Radiotherapy for epithelial skin cancer. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v.51, n.3, p.748–755, 2001.

LOO, D. T., RILLEMA, J. R. Measurement of cell death. **Methods Cell Biol.**, v.57, p.251-264, 1998.

LOPES, L. B. Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação e moléculas carreadoras. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado), 2005.

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

LOPEZ, R. F. V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.56, p.77– 94, 2004

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

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

MAEHARA, Y., ANAI, H., TAMADA, R., SUGIMACHI, K. The ATP assay is more sensitive than succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v.23, p.276, 1986.

MARIKAINEN, P., NYMAN, K., NEVALAINEN, T. J. Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases a2 on mcf-7 cells in culture. **Toxicol.**, v.31, v.7, p.835-843, 1993.

MARKS, R, RENNIE, G, SELWOOD, TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. **Lancet.**, v.1, p.795, 1988.

MARRO, D., DELGADO-CHARRO, M. B., GUY, R. H. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. **J. Control. Release**, v.70, p. 213-217, 2001.

MERINO, V., KALIA, Y.N., GUY, R.H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends Biotechnol.**, v.15, n.8, p.288-290, 1997.

MILLOT, P., 2000. US Patent 6,167,302.

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

Moore, G. E., Gerner, R. E., Franklin, H. A. J. **Ann. Med. Ass.**, v.199, p.87, 1967

MORTENSEN, B. T., BOJSEN, J. Evidence for growth inhibition by platinum electrodes at low current levels. **Journal of Biomedical Engineering**, v.4, p.103-106, 1982.

MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A.M KALIA, Y. N., GUY, R H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.52, p.103-112, 2001.

MOSMANN, T. A., FONG, T. A.T. Specific assays for cytokine production by T cells. **J of Immunol. Methods.**, v. 116, p.151-158, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. of Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUDRY, B., GUY, R. H., DELGADO-CHARRO, M. B. Prediction of iontophoretic transport across the skin. **J. of Control. Release**, v. 111, p.362-367, 2006.

MURTHY, N., ROBICHAUD, J. R., TIRRELL, D. A., STAYTON, P. S., HOFFMAN, A. S.,. The desing and synthesis of polymers for euryotic membrane disruption. **J. of Control Release**, v.61, p.137-143, 1999.

NAVSARIA, H. A., MYERS, S. R., LEIGH, I. M., MCKAY, I. A. Culturing skin in vitro for wound therapy. **Tib. Tech.**, v.13, p.91-100, 1995.

NEUMANN, E. E ROSENHECK,K., Permeability changes induced by impulses in vesicular membranes, **J. Memb. Biol.**, v.10279, p.290 , 1972.

OLIVERIAM A. S., GUARATINI, M. I., CASTRO, C. E. S. Fundamentação teórica para iontoforese. **Rev. Bras. Fisioter.**, v.9, p.1-7, 2005.

ORR, H. C., BAKER, J., CHEESMAN, J. Survival of animal tissue cells in primary culture in the absence of serum. **Applied. Microbiology**, v.25, n.1, p.49-54, 1973.

OTA, Y., HAMADA, A., NAKANO, M., SAITO, H., 2003. Evaluation of percutaneous absorption of midazolam by terpenes. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, v.18, n.4, p.261-266.

PANCHAGNULA, R., NAIR, V. Phisicochemical considerations in the iontophoretic delivery of a small peptide : *in vitro* studies using arginine vasopressin as a model peptide. **Pharmacological Research.**, v.42, p.175-182, 2003.

PELCZAR, M. J., CHARN, E. C., KRIEG, N. R. Microbiologia : conceitos e aplicações. 2.ed., São Paulo, **Makron Books**, 1997.

PEREIRA-SMITH, O. M., SMITH, J. R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementations groups. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.85, n.16, p.6042-6046, 1988.

PERES, C. M., CURI, R. Como cultivar células. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

PHIPPS, J. B., PADMANABHAN, R. V., LATTIN, G. A. Transport of ionic species through skin. **Solid State Ionics**, v.28-30, p.1778-1783, 1988.

PIKAL, M. J. The role of eletrosmotic flow in transdermal iontophoresis. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.46, p.281-305, 2001

PIZZOFERRATO, A., CIAPETTI, G., STEA, S., CENNI, E., ARCIOLA, C. R. A., GRANCHI, D., SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical Materials**, v.15, p.173-190, 1994.

PODDEVIN, B., ORLOWSKI, S., BELEHRADEK, J., MIR, L. M. Very High cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. **Biochemical Pharmacology**, v.42, p. S67-S75, 1991.

REIN, H. Experimental studies on electrosmosis in surviving human skin. **Z. Biol.** V.81, p.125-140, 1924.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed.) Martindale: the extra pharmacopoeia. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.

RIZZO, E., TUCHIYA, H. H., MARINEZ, C. H. Técnicas básicas de cultura celular. Instituto Butantan, Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1983.

ROBERT J. ANTHRACYCLINES. IN: GROCHOW LB, AMES MM, EDS. A clinician's guide to chemotherapy pharmacokinetics and pharmacodynamics, 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998:93.

ROSENBERG, B., CAMP, L. V., GRIMLEY, E. B., THOMSON, A. J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *The Journal of biological chemistry*. 242(6):1347-1352,1967.

RUBIN, A. I., CHEN, E. H., RATNER, D. Basal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v.353, p. 2262-2269, 2005.

SANTI, P., GUY, R. H. Reverse iontophoresis – parameters determining electro-osmotic flow II. Eletrode chamber formulation. **J. of Control. Release**, v.42, p.29-36, 1996.

Scudiero, D. a., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniffm D., Boyd, M. R. Evaluation fo a soluble tetrazolim/Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v.48, p.4827-4833, 1988.

SEPET, E., BILIR, A., AKÇIN, O., AYTEPE, Z. The effects of a caries-removing gel (carisolv) on FM3A cell-line in vitro. **Journal of Dentistry**, v.32, p.213-218, 2004.

SHIMIZU, S.; KATAYAMA, K.; MATSUKAWA,H.; GOTOH, H.; MATSUMOTO, A.; YOKOYAMA, H.; SUDA, T.; ARITA, M.; JOJIMA, T. Clinical evaluation of adriamycin ointment in advanced or local recurrent breast cancer. **Gan to Kagaku Ryoho.**, v. 13, p. 590-592, 1986.

SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara. 4.^a edição, p. 1153-1159, 1994.

SINGH, P., MAIBACH, H. I. Iontophoresis : an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.18, p.379-394, 1996.

SINTOV, A. C., BRANDYS-SITTON, R. Facilitated skin penetration of lidocaine : combination of a short-term iontophoresis and microemulsions formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.316, p.58-67, 2006.

SOMA, C. E., DUBERNET, C., BENTOLILA, D., BENITA, S., COURVREUR, P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nonoparticles. **Biomaterial**, v. 21, p.1-7, 2000.

STANWELL, C., GESCHAR, A., WATTERS, D. Cytostatic and cytotoxic properties of the marine product bistratene A and analysis of the role of protein kinase C in its mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v.45, n.9, p. 1753-1761, 1993.

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

STOVER, T. C., SHARMA, A., ROBERSTON, G. P., KESTER, M. Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n.9, p.3465-3474, 2005.

SUBRAMONY, J. A., SHARMA, A., PHIPPS, A. S. Microprocessor controlled transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p. 1-6, 2006.

TADA, H., SHIBO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J. Immunol. Methods**, v. 93, p.157, 1986.

TAPPER, R., 1989. US Patent 4,822,334.

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

THANOU, M., VERHOEF, J.C., JUNGINGER, H.E. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.50, p.S91-S101, 2001.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Microbiologia. 6. ed., Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 2000.

TRAMONTINA, F., KARL, J., GOTTFRIED, C., MENDEZ, A., GONÇALVES, D., PORTELA, L. V., GONÇALVES, C. A. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. **Brain Research Protocols.**, v.6, p. 86-90, 2000.

ULIASZ, T. F., HEWETT, S. J. A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture. **Journal of Neuroscience Methods**, v.100, p.157-163, 2000.

VAN DAM, RM, HUANG, Z, RIMM, EB, ET AL. Risk factors for basal cell carcinoma of the skin in men: results from the health professionals follow-up study. **Am. J. Epidemiol.**, v.150, p.459, 1999,

VANDENBULCKE, K., HORVAT, L., DE MIL, M., SLEGERS, G., BEELE, H. Evaluation of the antibacterial activity and toxicity of 2 new hydrogels : a pilot study. **Lower Extremity Wounds**, v.5, n.2, p.109-114, 2006.

VIVIER A. D., MCKEE, P. H. Atlas de dermatologia clinica. 2ª edição, 2000. p. 9.23-9.34.

WALLIS, C., VER, B., MELNICK. J. L. The role of serum and fetuin in the growth of monkey kidney cells in culture. **Exp. Cell Res.**, v.58, p.271-282, 1969.

WANG, D., CHRISTOPHER, G., WILLIAMS, C. G., LI, Q., SHARMA, B., ELISSEFF, J. H. Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel. **Biomaterials**, v.24, p.3969-3980, 2003.

WEAVER JC. 1995. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. Electroporation Protocols for Microorganisms. Totowa, New Jersey: Humana Press. p 1-26.

WEISS, B., SCHAEFER, U. F., ZAPP, J., LAMPRECHT, A., STALLMACH, A., LEHR, C. M. Nanoparticles made of fluorescence-labelled poly(L-lactide-co-glycolide): preparation, stability, and biocompatibility. **J. Nanosci Nanotechnol**, v.6, n.9-10, p.3048-3056, 2006.

WILLIAMS, A.C. AND BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.56, p.603-618, 2004.

WISBURG, J. H., WEISSMAN, D. B., SEDAGHAT, T., BABICH, H. In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v.95, n.4, p.191-200, 2004.

YAMASHITA , F., HASHIDA, M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.55, p. 1185–1199, 2003.

YAN, G., LI, S. K., HIGUCHI, W. I. Evaluation of constant current alternating current iontophoresis for transdermal drug delivery. **J. of Control. Release**, v.110, p. 141-150, 2005.

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

ZHANG, J. F., LIU, J. J., LIU, P.Q., LIN, D. J., LI, X. D., CHEN, G. H. Oridonin inhibits cell growth by induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells. **Hepatology Research**, v.35, n.2, p. 104-110, 2006.