UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de dendrímeros e da iontoforese na penetração da
protoporfirina IX em tumores cutâneos**

Laura Freire Cardoso Pimenta

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de dendrímeros e da iontoforese na penetração da
protoporfirina IX em tumores cutâneos**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Laura Freire Cardoso
Pimenta

Orientador(a): Profa. Dra. Renata
Fonseca Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2013

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.

Freire Cardoso Pimenta, Laura

Influência de dendrímeros e da iontoforese na penetração da protoporfirina IX em tumores cutâneos. Ribeirão Preto, 2013. 85 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Fonseca Vianna Lopez, Renata.

1. Protoporfirina. 2. Dendrímero. 3. Terapia Fotodinâmica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laura Freire Cardoso Pimenta

Influência de dendrímeros e da iontoforese na penetração da protoporfirina IX em tumores cutâneos

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ao meu eterno amor, meu querido marido Gustavo, sempre incentivador e paciente, sem reclamar do tempo que deixei de passar ao seu lado para me dedicar a este trabalho.

Agradecimento

A DEUS por me presentear com tão rica oportunidade de crescimento intelectual.

A meus pais, Nilza e Ricardo, por estarem sempre ao meu lado torcendo e me incentivando a buscar novos desafios.

Aos meus queridos irmãos, Ju e Du, pelas palavras de incentivo e amizade.

A minha mestre e orientadora que, sem me conhecer, acreditou na minha capacidade e me recebeu em seu laboratório, me instruindo com paciência e sabedoria. Este trabalho só foi possível porque *"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes, Issac Newton"*.

A Ana Carolina Roselino, que me incentivou tanto a começar este trabalho.

Aos amigos Karina e Joel, pela amizade e infinita disponibilidade em me auxiliar na técnica ou nas discussões intelectuais.

A querida Paty, nossa técnica, sempre pronta a nos auxiliar com muita dedicação.

Aos amigos do laboratório, Camila, Dani, Dani, Estael, Lucas, Tati, Renê, Silas, pela contribuição intelectual e boas risadas que faziam nossos dias parecerem mais leves.

Aos professores Roberto Santana e Sofia Nikolau, e seus técnicos Junior e Juliana, por disponibilizarem o laboratório para o desenvolvimento de alguns experimentos.

As técnicas, Elizabete Rosa e Roberta Ribeiro Costa, da FMRP, por me auxiliarem nos experimentos com o microscópio confocal.

A aluna Débora e técnica Mirian, do laboratório da Profa. Glória Petto, que me auxiliaram na venopunção dos animais.

Aos animais, os camundongos, criados para contribuir com a ciência, e que tornaram possível o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao apoio financeiro da FAPESP, processo nº 2011/14940 – 0 que viabilizou a dedicação integral a este trabalho.

Ao apoio financeiro da CAPESP, CNPQ.

A FCFRP, Departamento de Ciências Farmacêuticas e Seção de pós-graduação, pela oportunidade.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

PIMENTA, L. F. C. **Influência de dendrímeros e da iontoforese na penetração da protoporfirina IX em tumores cutâneos**. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A terapia fotodinâmica (TFD) associada à administração tópica de agentes fotossensibilizantes é uma terapia promissora para o tratamento tópico do câncer de pele. A protoporfirina IX (PpIX) é uma substância fotodinamicamente ativa usada na TFD, entretanto, devido a sua alta lipofilia ela forma agregados em meio aquoso, o que diminui sua atividade fotodinâmica e dificulta sua administração na pele. Assim, sistemas de liberação nanoparticulados vêm sendo investigados para melhorar a distribuição da PpIX na pele e facilitar sua penetração até as células tumorais. Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) representam uma nova geração de nanosistemas que tem despertado grande interesse nos últimos anos. Eles são uma classe especial de polímeros que apresentam estrutura muito ramificada e regular e que interagem com a PpIX formando complexos (nanopartículas dendriméricas de PpIX-PAMAM). A aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, conhecida como iontoforese, pode influenciar na penetração cutânea dessas nanopartículas, direcionando-as para o interior das células. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da iontoforese e de nanopartículas de PAMAM de geração 4 hidroxilado (PAMAM G4-OH) com a PpIX na localização subcelular e penetração deste agente fotossensibilizante em tumores cutâneos. Assim foram preparados complexos de PpIX-PAMAM, os quais foram caracterizados em função do tamanho de partículas e potencial zeta. A localização subcelular da PpIX a partir dos complexos foi investigada em carcinoma de células escamosas. A influência dos complexos na geração de oxigênio singleto quando a PpIX sofre irradiação também foi avaliada. Por fim, a penetração da PpIX a partir dos complexos PpIX-PAMAM foi avaliada, *in vivo*, em pele sadia e em tumores induzidos em camundongos Nude BalbC, com e sem aplicação da iontoforese. O tamanho médio das nanopartículas dendriméricas contendo a PpIX dispersas em meio aquoso foi de aproximadamente 220 nm. Quando avaliadas em função do tempo, este tamanho sofreu um aumento de apenas 5% depois de 24 h, permanecendo constante por 7 dias. O potencial zeta das dispersões foi de 10 mV, em pH 7, e de 30 mV, em pH 5,5, possibilitando a contribuição da eletromigração durante a iontoforese. Nos estudos em cultura de células tumorais observou-se que a complexação com o PAMAM aumentou 30 vezes a localização da PpIX na mitocôndria quando comparada a PpIX livre. Além disso, a quantidade de oxigênio singleto gerada foi semelhante para a PpIX livre não agregada e complexada, $4,3 \times 10^{-3}$ e $4,6 \times 10^{-3}$, respectivamente, sugerindo que o PAMAM manteve a atividade fotodinâmica da PpIX. Nos experimentos *in vivo*, em pele sadia, verificou-se que a PpIX administrada a partir do complexo com o PAMAM se distribuiu homogeneamente pela pele, enquanto que a PpIX livre apresentou uma fluorescência localizada em apenas algumas áreas da superfície da pele. A iontoforese facilitou a penetração da PpIX para as camadas mais profundas da pele. Finalmente, no tratamento dos tumores cutâneos, a administração tópica dos complexos por apenas 30 min possibilitou a penetração da PpIX até os tumores localizados abaixo da pele, em concentrações semelhantes para a aplicação passiva e iontoforética. Portanto, a complexação da PpIX com o PAMAM é um sistema de liberação nanoparticulado promissor para o tratamento tópico de tumores cutâneos por TFD.

Palavras-chave: dendrímero, PAMAM, protoporfirina IX, iontoforese, câncer de pele, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

PIMENTA, L. F. C. **Influence of dendrimers and iontophoresis in protoporphyrin IX penetration into skin tumors.** 2013. 85f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Science of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Photodynamic therapy (PDT) associated with topical administration of photosensitizer agents is a promising therapy for topical treatment of skin cancer. Protoporphyrin IX (PpIX) is a photosensitizer commonly used in PDT; however, due to its high lipophilicity it aggregates in aqueous medium, which decreases its photodynamic activity and hinders its penetration through the skin. In this way, nanoparticles have been designed to improve the distribution of PpIX in the skin and enhance its tumor cell penetration. The polyamidoamine dendrimers (PAMAM) represent a new generation of nanosystems that has aroused great interest in recent years. They are hyperbranched polymers capable to form complexes with PpIX (PpIX-PAMAM), increasing PpIX aqueous solubility. The application of a low intensity electrical current, known as iontophoresis, may influence the nanoparticles skin penetration, directing them to the tumor cells. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of iontophoresis and PpIX-PAMAM G4-OH complexes in PpIX subcellular localization and penetration into skin tumors. The complexes were prepared and characterized as a function of particle size and zeta potential. The subcellular localization of PpIX from the complexes was investigated in squamous cell carcinoma. The influence of PpIX-PAMAM on the generation of singlet oxygen after irradiation was also evaluated. Finally, the penetration of PpIX from the PpIX-PAMAM complexes was evaluated *in vivo* in healthy skin and in tumors induced in BalbC nude mice with and without application of iontophoresis. The average size of PpIX-PAMAM nanoparticles dispersed in aqueous medium was approximately 220 nm. When evaluated as a function of time, this size was increased only 5% after 24 h and remained constant for 7 days. The zeta potential of the dispersions was 10 mV at pH 7 and 30 mV at pH 5.5, allowing the contribution of electromigration during iontophoresis. In studies in culture tumor cells it was observed that complexation with PAMAM increased 30 times the localization of PpIX in the mitochondria compared to free PpIX. Furthermore, the amount of singlet oxygen generated when PpIX-PAMAM was irradiated was similar to that generated by the irradiation of the non-aggregated free PpIX, 4.6×10^{-3} and 4.3×10^{-3} , respectively, suggesting that PAMAM did not modify the photodynamic activity of PpIX. *In vivo* experiments on healthy skin have shown that PpIX from the PpIX-PAMAM was homogeneously distributed throughout the skin, whereas free PpIX fluorescence was visualized only in some restricted areas of the skin surface. Iontophoresis facilitated PpIX diffusion to deep layers of the skin. Finally, the treatment of skin tumors have shown that the topical administration of the PpIX-PAMAM for only 30 min, passively or by iontophoresis, allowed the penetration of PpIX into the tumors located below the skin. Therefore, the PpIX complexation with PAMAM is a promising nanoparticle delivery system for the topical treatment of skin tumors by PDT.

Keywords: dendrimer, PAMAM, protoporphyrin IX, iontophorese, skin cancer, photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das estruturas da pele. (A) Estrato córneo com espessura convencional, (B) Estrato córneo hiperqueratinizado (1 – hiperqueratinização, 2 – células atípicas, 3 – células de Langerhans).....	1
Figura 2	Estágios de desenvolvimento do câncer de pele não-melanoma...	2
Figura 3	Estimativas da ocorrência de novos casos de câncer de pele não-melanoma no Brasil.....	3
Figura 4	Esquema ilustrativo da TFD conforme diagrama de Jablonski.....	5
Figura 5	(A) Estrutura química da PpIX, Fórmula molecular: $C_{34}H_{34}N_4O_4$, Peso Molecular: 562.65816g.....	6
Figura 6	Representação esquemática de um dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) de quarta geração.....	9
Figura 7	Representação esquemática do tamanho do dendrímero em cada geração: do núcleo inicializador até a geração 7.....	10
Figura 8	Esquema representativo do tamanho de um dendrímero PAMAM comparado a importantes proteínas humanas.....	11
Figura 9	Esquema do fluxo eletrosmótico (A) e eletrorrepulsivo (B).....	15

Figura 10	Aplicação de iontoforese em camundongos Nude Balb C. Eletrodo de prata em contato com a dispersão de PpIX livre ou complexada ao PAMAM (contida em um suporte plástico sobre a pele do animal) e um contra eletrodo adesivo na cauda do animal, ambos conectados a uma fonte de energia.....	27
Figura 11	Representação esquemática da indução tumoral (A431) em camundongos.....	28
Figura 12	Espectro de emissão da PpIX em tampão fosfato de sódio 100 mM pH7,0 + CPC 0,45mM.....	31
Figura 13	Curva analítica da PpIX em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH7,0 e CPC 0,45 mM. Equação da reta: $y = 0,1224x + 7,2849$, $r = 0,99$	32
Figura 14	Intensidade de fluorescência da PpIX em função de sua concentração e tempo após a adição do tensoativo CPC na dispersão aquosa contendo PpIX.....	34
Figura 15	Tamanho das partículas de PpIX-PAMAM em função do pH.....	38
Figura 16	Potencial zeta (mV) das dispersões de PAMAM G4 OH – PpIX em função do pH do meio.....	39

- Figura 17** Imagens de CLSM de células A431 incubadas por 4 h com a PpIX livre ou PpIX-PAMAM G4 OH, na concentração de 20 µg/mL de PpIX. Vermelho: PpIX. Verde: MTG. Aumento 63x Excitação/emissão 405/ 600 -700 nm para a PpIX e excitação/ emissão 488/ 515-555 nm para o MTG..... 40
- Figura 18** Colocalização (pontos brancos) da PpIX livre e complexada ao PAMAM ao MTG em análise feita pelo software Image J usando o a função *plugin colocalization finder* (<http://imagej.nih.gov/ij/plugins>). Coeficiente de colocalização da PpIX livre = 0,05%, coeficiente de colocalização da PpIX-PAMAM = 1,42%..... 41
- Figura 19** Decaimento da absorbância do DPBF em solução com PpIX livre (gráfico 1) ou PpIX-PAMAM (gráfico 2) em diferentes tempos de irradiação. Irradiação com laser a 660 nm, potência 36 mV a 10 cm da incidência da fenda, a cada 2 min..... 43
- Figura 20** Porcentagem de absorbância das amostras contendo PpIX e DPBF em 416 nm em função do tempo de irradiação com laser em 660 nm. A absorbância das amostras que continham PpIX e DPBF foi corrigida subtraindo-se a absorbância da amostra pela absorbância da PpIX (que não alterou em função da irradiação)..... 44

Figura 21	CLSM de corte transversal da pele de camundongo sem pelo. Projeção máxima dos canais de fluorescência obtidos após 30 minutos de aplicação de iontoforese ($0,5 \text{ mA/cm}^2$), <i>in vivo</i> , através de solução aquosa de PpIX livre e complexada (PpIX-PAMAM). Aumento 40x.....	45
Figura 22	Quantidade de PpIX extraída da pele após 30 min de tratamento passivo e iontoforético com PpIX-PAMAM G4 OH, a 1 mg/mL de PpIX ($n = 4$).....	46
Figura 23	CLSM de corte perpendicular a superfície da pele. Imagem obtida após 30 minutos de aplicação (A) passiva e (B) iontofoerética do complexo PpIX-PAMAM. (C) perfil de fluorescência da PpIX ao longo da epiderme, dado a partir do software Image J (*sem unidade para os valores de distância).....	47
Figura 24	PpIX extraída da pele e do tumor após 30 minutos de aplicação passiva ou iontoforética ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) da dispersão de PpIX-PAMAM ($n: 4-5$). (*) Apresentaram diferença estatística.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tratamento estatístico dos dados obtidos no parâmetro de precisão do método para determinação da PpIX.....	32
Tabela 2	Tamanho médio de partículas, medido por intensidade, presentes nas dispersões aquosas de PpIX-PAMAM em diferentes concentrações de PpIX.....	35
Tabela 3	Tamanho médio de partículas presentes na dispersão aquosa de PpIX-PAMAM a 50 µg/mL em função do tempo (medidas de intensidade).....	36
Tabela 4	Ensaio de recuperação da PpIX no plasma sanguíneo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA: Instituto Nacional do Câncer;

TFD: Terapia Fotodinâmica;

FS: Agente Fotossensibilizante;

EROS: Espécies de Oxigênio Altamente Reativas;

*O₂: Oxigênio Singlete;

ALA: ácido 5-aminolevulínico

PpIX: protoporfirina IX;

PAMAM: dendrímeros de poliamidoamina;

PAMAM G4 OH: poliamidoamina de geração 4 hidroxilado, com 96 grupos –OH – hidroxila – em sua superfície;

pH: potencial hidrogeniônico;

pKa: potencial de dissociação;

CLSM: microscópio confocal de escaneamento a laser;

A431: carcinoma de células escamosas;

PpIX – PAMAM: complexo de protoporfirina – dendrímero de poliamidoamina;

CPC: Cloreto de cetilpiridínio;

DPBF: 1,3 Difenilisobenzofurano;

DMF: Dimetilformamida;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

MTG: Mitotracker Green;

SBF: Soro Bovino Fetal;

rpm: rotações por minuto;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação;

SPF: *Specific Pathogen Free*;

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1	CÂNCER DE PELE	1
1.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	3
1.2.1	MECANISMO FOTOFÍSICO DA TFD	4
1.3	PROTOPORFIRINA	5
1.4	DENDRÍMEROS	8
1.5	IONTOFORESE	13
2	<u>OBJETIVOS</u>	15
2.1	ETAPAS	15
3	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	AGENTE FOTOSSENSIBILIZANTE	16
3.1.2	REAGENTES	16
3.1.3	EQUIPAMENTOS	17
3.1.4	SOLUÇÕES	18
3.2	MÉTODOS	19
3.2.1	OBTENÇÃO DO COMPLEXO PPIX – PAMAM G4 OH	19
3.2.2	VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DA PPIX NOS DENDRÍMEROS DISPERSOS EM ÁGUA	20
3.2.3	INFLUÊNCIA DO TEMPO NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX APÓS SUA DISPERSÃO EM ÁGUA	22
3.2.4	DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS DISPERSÕES AQUOSAS DO COMPLEXO PPIX – PAMAM G4 OH EM FUNÇÃO DO TEMPO E DO PH	22
3.2.5	CULTURA DE CÉLULAS	23
3.2.6	DETERMINAÇÃO INDIRETA DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETO	24
3.2.7	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	25
3.2.8	ANÁLISE DE DADOS	30
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	30
4.1	OBTENÇÃO DO COMPLEXO	30
4.2	VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA PPIX EM SOLUÇÃO AQUOSA	31
4.2.1	ESPECIFICIDADE	31
4.2.2	CURVA ANALÍTICA/ LINEARIDADE	31
4.2.3	PRECISÃO	32
4.2.4	INFLUÊNCIA DO TEMPO NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX EM DISPERSÃO AQUOSA CONTENDO CCP	33
4.3	DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E POTENCIAL ZETA DAS DISPERSÕES DE PPIX-PAMAM	34

4.4	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PPIX A PARTIR DOS COMPLEXOS PPIX-PAMAM	39
4.5	DETERMINAÇÃO INDIRETA DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETO	42
4.6	PERMEAÇÃO DA PPIX LIVRE E PPIX-PAMAM NA PELE SADIA	44
4.7	PENETRAÇÃO TUMORAL DA PPIX A PARTIR DO COMPLEXO PPIX-PAMAM	47
4.7.1	PADRONIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA PPIX DO PLASMA SANGUÍNEO	47
4.7.2	PENETRAÇÃO NO TUMOR.....	49
5	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>52</u>
6	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>52</u>

1 Introdução

1.1 Câncer de pele

O câncer é uma doença causada pelo crescimento desordenado de células que sofreram mutações genéticas em seu DNA padrão. No câncer de pele as mutações ocorrem, principalmente, devido à exposição exagerada à irradiação ultravioleta (UV) proveniente da luz solar. Neste caso, as células que sofrem mutação podem invadir outras regiões do corpo, no caso de tumores malignos como o melanoma, ou ficarem localizadas em uma região específica, no caso do câncer de pele não melanoma. Na maioria das vezes, o estrato córneo, tecido mais externo da pele que recobre os tumores cutâneos, apresenta-se hiperqueratinizado. Esta hiperqueratinização é um fator que dificulta a difusão e a partilha de substâncias administradas topicamente até o tumor (Figura 1) (TAVEIRA e LOPEZ, 2011, CHOUDHARY, S. et al, 2011).

Figura 1: Representação esquemática das estruturas da pele. (A) Estrato córneo com espessura convencional, (B) Estrato córneo hiperqueratinizado (1 – hiperqueratinização, 2 – células atípicas, 3 – células de Langerhans) – Adaptado de TAVEIRA e LOPEZ, 2011.

O câncer de pele não-melanoma é uma doença comum que acomete principalmente a população de pele clara e que vivem próximas aos trópicos, onde a incidência da luz solar é maior. Estudos revelaram que mais de 80% das áreas do

corpo em que ocorre este tipo de câncer localizam-se em regiões expostas como cabeça, pescoço e mãos (KENNEASTER, 2005 e TAVEIRA e LOPEZ, 2011). É uma doença que, se tratada, possui uma boa porcentagem de cura e sua letalidade é baixa. Mas se não tratada, pode levar a sérias deformidades no paciente (INCA, 2012) (Figura 2).

Figura 2: Estágios de desenvolvimento do câncer de pele não-melanoma (Adaptado de FERREIRA, 2003)

No Brasil, como em todo o mundo, o câncer de pele não-melanoma possui uma alta incidência. É considerado o câncer de maior índice em ambos os sexos, com risco de 65 e 71 novos casos em cada grupo de 100 mil homens e mulheres respectivamente. Para 2012 o INCA (INCA, 2012) estimou 62.680 novos casos, um aumento de 60% em um período de 10 anos, comparado às estimativas publicadas em 2003 (Figura 3). Ainda, as autoridades consideram esses dados subestimados devido a um sub-registro que é consequência de um subdiagnóstico da doença (INCA, 2012). Portanto, novas e eficientes terapias com razoável relação custo e benefício são um desafio para pesquisadores que buscam alternativas para o tratamento de uma doença com índices tão altos.

Ano	Número de casos	Casos por 100 000 pessoas/sexo
2003	39 000	44 / homens
		43 / mulheres
2012	62 680	65 / homens
		71 / mulheres
%*	60	

* Percentual de aumento de 2003 – 2012

Figura 3: Estimativas da ocorrência de novos casos de câncer de pele não-melanoma no Brasil (INCA, 2013 e INCA, 2003).

1.2 Terapia Fotodinâmica

Desde o início das civilizações o homem encontrou na luz solar uma fonte energética para o tratamento de diversas doenças, como deficiências vitamínicas, raquitismo e doenças de pele como psoríase e vitiligo. Mesmo não sabendo qual era, exatamente, o mecanismo de cura, os estudiosos sabiam dos benefícios da exposição moderada aos raios UV do sol. Mas, somente no século XX, quando pesquisadores observaram que haviam provocado a morte de células de protozoários após tratá-las com uma droga “ativada” pela exposição à luz, que o termo “photo dynamic action” foi utilizado pela primeira vez (DAI, et. al, 2012). Desta forma, ainda no século XX, surgiu a Terapia Fotodinâmica (TFD) para o tratamento do câncer, especialmente o câncer de pele, devido a fácil acessibilidade deste órgão a exposição à luz. A TFD tópica ganhou força com a descoberta de que fármacos utilizados como fotossensibilizante (FS) possuem afinidade pelas células tumorais (DAI, et. al, 2012 e ZHAO and HE, 2010).

Assim, foi estabelecida a TFD tópica entre as modalidades terapêuticas para o tratamento do câncer de pele. Outras modalidades terapêuticas já bem estabelecidas, como a curetagem, a remoção cirúrgica, a crioterapia e a quimioterapia causam inflamações severas, dor e cicatrizes (TAVEIRA e LOPEZ, 2011). Portanto, a TFD tópica surgiu como uma terapia inovadora, pois é uma técnica não invasiva, com baixa morbidade, mínimos distúrbios funcionais, melhor eficácia cosmética com boa tolerância e possibilidade de realização de várias aplicações em um mesmo sítio tumoral (FANG et. al, 2008).

A TFD ocorre pela combinação de três elementos essenciais que combinados causam dano celular, mas isolados não provocam efeito algum a célula. Esses elementos são: agente fotossensibilizante (FS), luz e oxigênio. Basicamente, a TFD ocorre quando o FS absorve a luz emitida no comprimento de onda adequado, passando para um estado energético excitado. Neste estágio, o FS desencadeia uma série de reações fotoquímicas que levam a produção do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e espécies de oxigênio altamente reativas (EROS). O $^1\text{O}_2$ produzido reage em meio biológico com as moléculas ao seu redor, desencadeando o dano que irá provocar a morte celular por necrose ou apoptose. Portanto, o $^1\text{O}_2$ é considerado o principal agente citotóxico da TFD (ROBERTS e CAIRNDUFF, 1995; JICHLINSKI et al., 1995; VAN DEN BERGH, 1998).

1.2.1 Mecanismo Fotofísico da TFD

Após a administração do fármaco ao paciente pela pele e sua permeação até as células tumorais, a pele é exposta à luz. A luz deve ter o comprimento de onda de máxima absorção do FS, além de ser capaz de alcançar tecidos mais profundos, onde está localizado o tumor. Entre os tipos de laser disponíveis para a TFD, os de comprimento de onda (λ) entre 600 e 800 nm são os mais desejáveis. Nesta faixa de λ , conhecida como “janela terapêutica”, a absorção de energia dos componentes da pele é mínima, sendo praticamente toda a energia disponível absorvida pelo FS (DAI, et al, 2012). Além disso, neste λ o laser é capaz de atingir profundamente a pele e alcançar a derme, onde está localizado o tumor.

Após absorver fótons de energia, o FS passa de um estado energético fundamental para um estado excitado de maior energia, instável e com curto tempo de vida, estado singleto (Figura 4). Por cruzamento intersistema, ocorre a inversão de spin dos elétrons excitados do estado singleto para o estado tripleto. Neste estado, ele pode voltar ao estado fundamental de duas formas: emitindo fosforescência ou reagindo com as moléculas do meio biológico de duas maneiras, conhecidas como: reações do tipo I, formando EROS, ou reações do tipo II, que ocorrem com o oxigênio molecular presente no meio, formando $^1\text{O}_2$. O $^1\text{O}_2$ é muito reativo em meio biológico e é considerado o principal responsável pela morte celular na TFD. Sua ação é considerada localizada devido a sua capacidade de difusão

reduzida (menos do que $0,02 \mu\text{m}$) e ao seu tempo de vida muito curto ($\tau < 40 \text{ ns}$) (ZHAO e HE, 2010 e DAI et. al, 2012).

Figura 4: Esquema ilustrativo da TFD conforme diagrama de Jablonski – Adaptado de DAI, et al, 2012.

1.3 Protoporfirina

O FS mais estudado para emprego em TFD tópica é o ácido 5-aminolevulínico (ALA). O ALA não é em si um FS, mas é o precursor da protoporfirina IX (PpIX) (Figura 5), esta sim fotossensível. A PpIX é uma molécula endógena que conjuga ao ferro (Fe^{2+}) na última etapa de produção do grupo heme ($\text{PpIX} + \text{Fe}^{2+} = \text{heme}$). Controlado por enzimas, o processo de formação do grupo heme ocorre na mitocôndria e faz parte de mecanismos vitais das células, como a respiração (YANOVA, et al., 2011, LIU et al, 2008, DIETEL, et al, 1996). Em condições normais, sua biossíntese é controlada pela produção da PpIX que, geralmente, não sofre acúmulo. No entanto, seu metabolismo sofre uma diminuição em células cancerígenas, levando ao acúmulo deste FS (PpIX). A PpIX quando irradiada em λ adequado, causa a formação de $^*\text{O}_2$, matando as células mais próximas (YANOVA, et al., 2011, LIU et al, 2008).

Figura 5: (A) Estrutura química da PpIX, Fórmula molecular: $C_{34}H_{34}N_4O_4$, Peso Molecular: 562.65816g (PUBCHEM, 2013).

Assim, a PpIX e seus derivados constituem o grupo de fotossensibilizadores de primeira geração. São moléculas formadas por um macrociclo tetrapirrólico (Figura 5). Esse anéis pirrólicos ligados por pontes etilênicas possuem elétrons π que são fortemente excitados após absorverem fótons de energia na faixa de λ em torno de 400 nm, chamada banda de Soret, e em uma faixa de λ mais alto, entre 600 – 700 nm, chamada de banda Q. Apesar da menor absortividade molar da banda Q, ela é a banda adequada para a TFD pois, na faixa de λ em que ela se encontra, é capaz de penetrar mais profundamente na pele, comparado a banda Soret, além de situar-se dentro da “janela terapêutica” (YANOA, et al., 2011 e LIU et al, 2008).

No entanto, muitas são as variáveis que interferem na biodisponibilidade adequada desta porfirina no tecido tumoral quando administrada através do seu precursor (ALA). Entre elas, as mais importantes são (i) a penetração cutânea irregular do ALA, dependendo da espessura e tipo de tumor, devido principalmente a alta polaridade deste fármaco, (ii) a conversão do ALA em PpIX, a qual depende da quantidade de ALA que atravessa a membrana celular e do metabolismo no local, além da (iii) heterogeneidade na distribuição da PpIX induzida pelo ALA no tumor (GELFUSO, et. al., 2011).

Com o crescente emprego da TFD, muitos estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a biodisponibilidade da PpIX induzida pelo ALA. FANG e colaboradores (FANG et al, 2008) encapsularam ALA em lipossomas e ethosomas (um tipo de lipossoma com uma concentração de etanol relativamente alta) e verificou que estes sistemas de liberação eram capazes de aumentar a capacidade de penetração do ALA através do estrato córneo comparado ao ALA em solução aquosa. VENOSA e colaboradores (VENOSA et al, 2009) desenvolveram formulações lipossômicas com um derivado lipofílico do ALA, o undecanoato de ALA (Und-ALA), e verificaram que a formulação melhorou a propriedade de difusão do Und-ALA através do estrato córneo. No entanto, não aumentou a biodisponibilidade de PpIX, pois a PpIX foi formada em maior quantidade no meio extracelular. ZHANG e colaboradores (ZHANG et al, 2011) prepararam emulsões com partículas nanometricas O/A e A/O contendo ALA ou seu derivado metil ALA (mALA). Mostraram que as nanoemulsões O/A promoveram a maior taxa de permeação, comparado a A/O que não permeou mais que o controle do experimento. E ainda por CLSM a emulsão O/A com mALA permeou nas camadas mais profundas da pele. Além disso, verificaram também que ambas, ALA e mALA, foram seguras para administração tópica.

No entanto, devido as variáveis que afetam a biodisponibilidade local da PpIX induzida pelo ALA é intuitivo pensar que a administração direta da PpIX eliminaria ao menos o passo de conversão do ALA em PpIX, possibilitando uma terapia mais controlada. Além disso, o custo de produção da PpIX é duas vezes menor comparado ao do ALA, conforme catálogo do fabricante Sigma Aldrich consultado em novembro/2012, e a concentração de ALA administrada é normalmente alta (20%) para garantir a disponibilidade de pró-fármaco para conversão em PpIX no local de ação.

A PpIX não é, no entanto, administrada topicamente devido a vários fatores característicos de sua estrutura molecular. Ela é uma molécula altamente lipofílica e que forma grandes agregados em soluções aquosas e em meio fisiológico (RICCHELLI, 1995). Quando esses agregados se formam a massa molecular e consequentemente, sua lipofilicidade aumentam, o que dificulta sua difusão através

das células, comparada a sua forma monomérica, além de aumentar sua afinidade pelo estrato córneo, dificultando sua difusão para as camadas mais profundas da pele onde se encontram as células tumorais. Além disso, a produção de *O_2 (ϕ) é diminuída de 0,7 – 0,9, valores da PpIX monomérica, para 0,3 (RICCHELLI et al, 1998). Outra barreira encontrada para o uso direto da PpIX foi relatado em estudos realizados em cultura de células (JI et al, 2006, BRONSHTEIN et al., 2006 e WANG, et al; 2010). Nesses estudos foi observado que a PpIX administrada exogenamente tem uma localização difusa no citoplasma e na membrana plasmática, diferentemente da PpIX induzida pelo ALA, a qual apresenta localização subcelular nas mitocôndrias e uma maior efetividade da TFD.

Para contornar os problemas característicos da molécula de PpIX e administrá-la diretamente, alguns estudos tem sido desenvolvidos. NAWALANY e colaboradores (NAWALANY et al; 2012) funcionalizaram com polietilenoglicol (PEG) um derivado da porfirina, o 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin (p-THPP), formando p-THPP-PEG, com diferentes pesos moleculares p-THPP-PEG₃₅₀, p-THPP-PEG₂₀₀₀ e p-THPP-PEG₅₀₀₀, e avaliaram a influencia deste complexo na toxicidade e localização subcelular da p-THPP livre ou funcionalizada com PEG, em duas linhagens de células de câncer humano. Eles observaram que a fototoxicidade da p-THPP é dependente do tamanho da cadeia do PEG e a maior toxicidade foi verificada para p-THPP-PEG₂₀₀₀ em ambas as linhagens celulares. Sendo este mesmo o que apresentou uma localização subcelular característica nos lisossomos, diferentes dos outros padrões encontrados. Em outro estudo, a PpIX foi encapsulada em nanopartículas de sílica, o que aumentou a formação de *O_2 em cultura de células comparado a PpIX livre (ROSSI, et al, 2008 e SIMOM et al, 2010). Ainda, PpIX conjugada a nanopartículas de ouro mataram mais células de câncer de mama humano, em cultura, do que a PpIX livre (KHAING OO et al, 2012). Resumidamente, ao menos em cultura de células, a incorporação da PpIX em sistemas de liberação nanoparticulados parece aumentar a eficiência da PpIX na TFD

1.4 Dendrímeros

Os dendrímeros representam uma nova geração de nanosistemas que tem despertado grande interesse nos últimos anos (VANDAMME; BROBECK, 2005). São polímeros sintéticos grandes e complexos com estrutura química muito bem definida. Possuem três componentes estruturais distintos: (a) núcleo, (b) camadas ou gerações, compostas por unidades repetidas e radialmente ligadas ao núcleo inicializador e (c) grupos terminais funcionalizados (Figura 6) (NANJWADE et al., 2009).

Figura 6: Representação esquemática de um dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) de quarta geração (Adaptado de KAROLCZAK et al, 2012) e as partes que o compõe.

A derivação do nome dendrímero está na raiz da palavra: em que “dendro” significa árvore e “meros” parte. Outros termos também são atribuídos, como “moléculas em cascata” ou “arbols” devido ao grande número de ramificações na molécula, característica responsável pela funcionalidade dos dendrímeros. Desta forma, ele é capaz de se ligar a várias outras moléculas através de seus grupos periféricos. A quantidade de grupos terminais, tamanho e peso molecular do

dendrímtero estão ligados a sua geração. Cada nova ramificação adicionada caracteriza mais uma geração do dendrímtero, que tem seu diâmetro aumentado linearmente (aproximadamente 1 nm, a cada geração) e seus grupos superficiais exponencialmente (SVENSON e TOMALIA, 2005) (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática do tamanho do dendrímtero em cada geração: do núcleo inicializador até a geração 7 (SVENSON e TOMALIA, 2005)

Os dendrímeros apresentam algumas características especiais como: forma esférica bem definida, tamanho nanométrico, além de uma baixa polidispersividade (DUNCAN e IZZO, 2005). Eles também são conhecidos como “proteína sintética”, pois são muito semelhantes a importantes proteínas do nosso organismo, como a insulina, hemoglobina, citocromo C, entre outras (Figura 8). Sua importância como sistema de liberação de fármacos se deve, além das características mencionadas, ao fato de se apresentarem inertes para o organismo humano, exibindo baixa toxicidade e imunogenicidade (DUNCAN e IZZO, 2005, ESFAND e TOMALIA, 2001). Na literatura podem-se encontrar alguns estudos em que a atividade biológica de princípios ativos foi potencializada ou modificada quando complexados aos dendrímeros. (TOMALIA, 1995; VANDAMME e BROBECK, 2005, CHAUHAN, et al., 2003). No entanto, é recente as pesquisas com a administração tópica de complexos fármacos-dendrímtero (CHAUHAN et al., 2003).

Figura 8: Esquema representativo do tamanho de um dendrímero PAMAM comparado a importantes proteínas humanas (ESFAND e TOMALIA, 2001).

Os dendrímeros mais estudados como sistemas de liberação de fármacos são os de poliamidoamina (PAMAM), sintetizados por Tomalia e colaboradores nos anos 80, devido aos métodos de síntese bem estabelecidos, disponibilidade e baixa toxicidade (ESFAND e TOMALIA, 2001). Em função do grande número de grupos superficiais, os dendrímeros PAMAM podem se ligar a várias moléculas. Estas ligações podem ser covalentes com os grupos superficiais do dendrímero ou interações intermoleculares nas suas ramificações ou no seu núcleo. O tipo de ligação depende das características físico-químicas do fármaco e dos grupamentos funcionais presentes no dendrímero. Moléculas hidrofóbicas, por exemplo, podem se ligar ao núcleo ou ramificações do PAMAM, facilitando seu transporte, pelo dendrímero, através dos tecidos e células biológicas (LIU e FRÉCHET, 1999). A liberação do fármaco do PAMAM também pode ser direcionada para determinado sítio. Por exemplo, em um estudo de dinâmica molecular do dendrímero com grupamento amino terminal foi verificado que sua conformação pode ser alterada de

globular para estendida em função do pH do meio. Mais especificamente, em pH fisiológico o PAMAM-NH₂ apresenta uma estrutura globular, pois somente as aminas dos grupamentos terminais, com pKa $\approx$ 9-11, estão protonadas. Em pH ácido, no entanto, como aquele do interior do endossoma celular (pH $\approx$ 5), as aminas que estão no interior do dendrímero ficam protonadas, pois possuem pKa $\approx$ 5. Neste pH ácido, as aminas protonadas no interior e na superfície do PAMAM se repelem e o dendrímero adquire uma conformação estendida, rompendo o endossoma e liberando o fármaco (MINTZER e GRINSTAFF, 2011). Devido a sua multivalência, os PAMAMs também podem aumentar a solubilidade aquosa de moléculas hidrofóbicas, pois uma molécula de dendrímero pode “hospedar” em seu interior várias moléculas do fármaco. Alguns estudos mostraram que esta interação parece favorecer a penetração transdérmica de fármacos hidrofóbicos por mecanismos ainda não esclarecidos, mas semelhantes aos apresentados pelos complexos de inclusão com ciclodextrinas (CHAUHAN, et al., 2003, ARAÚJO, 2010). Por exemplo, foi verificado que alguns PAMAMs são capazes de desorganizar o estrato córneo, funcionando como promotores de absorção, e assim aumentar a penetração cutânea de fármacos (VENUGANTI e PERUMAL, 2008). Também foi observado que PAMAMs de baixa geração (G2 - NH₂ > G4 - NH₂ > G6 - NH₂) parecem até mesmo atravessar o estrato córneo e penetrar a pele em pequenas concentrações e ainda a iontoforese pode favorecer a permeação de dendrímeros catiônicos e neutros através da pele (VENUGANTI et al., 2011). Em nosso grupo, ARAÚJO, 2010 verificou que o PAMAM G4 OH (poliamidoamina de geração 4 hidroxilado, com 96 grupos -OH em sua superfície) aumentou a penetração da PpIX, *in vitro*, através da pele sadia e também aumentou a atividade fototóxica da PpIX em cultura de células.

Para a aplicação tópica de dendrímeros carreadores de PpIX visando o tratamento de tumores cutâneos, no entanto, é necessário que a PpIX atravesse o estrato córneo e chegue no tumor em altas concentrações. Além disso, o dendrímero não deve interferir na geração de oxigênio singlete e deve direcionar a PpIX para a mitocôndria das células tumorais para que a TFD seja efetiva. A aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, conhecida como iontoforese, pode facilitar a penetração da PpIX a partir dos dendrímeros e até mesmo possibilitar a entrada na pele do próprio complexo dendrímero-PpIX.

1.5 Iontoforese

A iontoforese é a aplicação de uma corrente elétrica constante de baixa densidade em uma formulação aquosa usada para aumentar a penetração de fármacos contidos nesta formulação através de vários epitélios, como mucosa (MURTHY et al., 1973), pele (LOPEZ et al., 2003; LOPEZ et al., 2004), unhas (DUTET e DELGADO-CHARRO, 2009; NAIR et al., 2009) e olhos (CHURCH et al., 1992; YASUKAWA et al., 2004; GRATIERI et al., 2010).

Na pele, a aplicação da iontoforese facilita a permeação de moléculas polares ou macromoléculas através da complexa barreira lipídica conferida pelo estrato córneo. Além disso, pode-se ter um controle preciso da dose de fármaco aplicado através da pele controlando-se a corrente elétrica, sem que ocorram variações entre os indivíduos (GRATIERI et al., 2008). Durante a iontoforese, a corrente elétrica atravessa a formulação e a pele, carregando os íons presentes no sistema. A passagem da corrente elétrica depende dos íons que compõem a formulação, pois a corrente elétrica é por eles carregada (GRATIERI et al., 2008). Desta forma, a formulação na qual a iontoforese é aplicada também pode ser modificada para carrear o fármaco para determinado local da pele (GELFUSO et al., 2013).

Um dispositivo iontoforético é composto por uma fonte de energia ou bateria, para fornecer a corrente elétrica, e por dois eletrodos, um positivo (ânodo) e um negativo (cátodo), que a conduzem por uma solução eletrolítica ou formulação. Esta solução eletrolítica que contém o fármaco segue para a pele e vai para o sistema circulatório. O fármaco deve ser resistente a corrente elétrica e não sofrer degradação. Os eletrodos podem ser inertes (por exemplo, de platina), no entanto, não utilizados por provocarem a hidrólise da água e alterar o pH da solução eletrolítica. Ou eletrodos reversíveis de Ag/ AgCl, são os mais utilizados, por apresentarem potencial de oxi-redução menor do que o da água e, assim, não alteram o pH da solução eletrolítica enquanto ocorrem as reações eletroquímicas (GRATIERI et al., 2008, GELFUSO, et al., 2011).

Os principais mecanismos envolvidos no transporte iontoforético de fármacos através da pele são a eletromigração e a eletrosmose. A *eletromigração* se refere ao movimento ordenado de íons para o eletrodo de carga oposta, do cátodo para ânodo ou do ânodo para cátodo. Ela é influenciada pela mobilidade elétrica do fármaco e pela concentração deste na solução eletrolítica. De maneira geral, o fármaco que possui uma carga residual negativa na formulação é colocado no compartimento que tem o eletrodo de mesma carga, o cátodo. Assim, quando aplicada a corrente elétrica o fármaco é repelido no eletrodo e migra em direção ao ânodo, a fim de equilibrar a carga residual do sistema, promovendo desta maneira um fluxo eletromigratório no sentido do ânodo (Figura 9). A *eletrosmose* refere-se ao fluxo de um volume de solvente e a movimentação de cargas quando aplicada uma diferença de potencial elétrico. Assim o que ocorre é que em pH fisiológico a pele apresenta-se carregada negativamente e, portanto, o transporte dos íons que se encontram na pele é favorecido no sentido do ânodo para o cátodo. Assim, os cátions presentes na formulação se movimentam para neutralizar as cargas negativas da pele e carregam consigo um volume de solvente. O solvente, por sua vez, arrasta as moléculas neutras que se encontram na formulação em contato com o eletrodo positivo (ânodo). Portanto, fármacos com carga neutra tem sua penetração cutânea facilitada pelo fluxo eletrosmótico quando a iontoforese é aplicada. Em pH fisiológico este fluxo é maior no sentido do ânodo para o cátodo devido a permesseletividade da pele aos cátions (Figura 9) (GELFUSO et al, 2008, GRATIERI et al., 2008). Sendo assim, espera-se que a aplicação da iontoforese em formulações que contém o complexo dendrímero-PpIX possa potencializar a penetração do complexo no tumor cutâneo e, assim, a concentração da PpIX penetrada alcance níveis terapêuticos adequados para a TFD, ocasionando a morte do tumor.

Figura 9: Esquema do fluxo eletrosmótico (A) e eletrorrepulsivo (B) (GRATIERI et al, 2008).

2 Objetivos

Avaliar a influência da iontoforese e dos dendrímeros na localização subcelular e penetração da PpIX em tumores cutâneos.

2.1 Etapas

- Obter o complexo PpIX – PAMAM G4 OH e quantificar a PpIX no complexo;
- Analisar a distribuição de tamanho e o potencial zeta das dispersões do complexo PpIX-PAMAM em função do tempo e do pH.;
- Avaliar por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) a localização subcelular da PpIX complexada ao PAMAM em carcinoma de células escamosas (A431);
- Determinar a eficiência de produção de oxigênio singlete do complexo PpIX – PAMAM;

- Avaliar a influência da iontoforese na penetração da PpIX, a partir do complexo PpIX-PAMAM, na pele sadia de camundongos Nude BalbC, *in vivo*;
- Em tumores induzidos em camundongos Nude BalbC, *in vivo*, quantificar a PpIX no tumor e pele após aplicação passiva e com iontoforese na dispersão de PpIX-PAMAM.

3 Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Agente Fotossensibilizante

- Protoporfirina (PpIX): Fabricante: Sigma Aldrich, Fórmula Molecular: $C_{34}H_{34}N_4O_4$, massa molecular: 562,7g.

3.1.2 Reagentes

- Água purificada;
- Cloreto de cetilpiridínio (CPC): Distribuidor/ Fabricante: Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA/ Schutz &Co;
- Dendrímero PAMAM –OH geração 4, solução 10% em MeOH: Fabricante: Sigma Aldrich; Fórmula Molecular: $[NH_2(CH_2)_2NH_2]:(G=4)$; dendri PAMAM($NHCH_2CH_2OH$)₆₄; Massa Molar: 14277,19;
- 1,3 Difenilisobenzofuro (DPBF): Fabricante: Sigma Aldrich;
- Dimetilformamida (DMF): Fabricante: JTBaker;
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Fabricante: Synth;

- Dimetilsulfóxido Anidro: Fabricante: Sigma Aldrich;
- Dulbelcco: Fabricante: Life Technologies™;
- Fluoromount: Fabricante: Sigma Aldrich;
- Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado: Fabricante: Synth;
- Fosfato de sódio monobásico anidro: Fabricante: Synth;
- Metanol: Fabricante: J.T. Baker;
- Mitotracker Green (MTG): Fabricante: Life Technologies™;
- RPMI: Fabricante: Life Technologies™;
- Tripsina: Fabricante: Life Technologies™;
- Tissue Tek®: Fabricante: Sakura Finetek, USA;
- Solução Isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Salina): Fabricante: Eurofarma – Segmenta.

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético: Mag Multi, Marte®;
- Balança Analítica: AY 220, Shimadzu;
- Balança Analítica: AS 2000 C, Marte®,
- Centrífuga: Megafuge 16R, Thermo Scientific;

- Espectrofluorímetro: RF – 5301 PC, Shimadzu;
- Espectrofotômetro: U- 3501, Hitachi;
- Fonte de Energia: APH 500 DM, Kepco Power Supply;
- Liofilizador: KT05, Liotop;
- Light Scatering Zetasizer Nano ZS90; Malvern;
- Medidor de potência de laser/energia FieldMastII-TOP (Coherent®)
- Microscópio Confocal (CLSM), Modelo TCS SP5, Leica, Alemanha;
- Purificador de água: Direct-Q® 3UV With pump; Millipore;
- Phmetro: DM – 20, Digimed.
- Potência de luz em 660 nm, Colibri, QuantumTech®);
- Ultra Turrax, T25 basic, IKA®.

3.1.4 Soluções

- Cloreto de Cetilpiridínio (CPC) 4,5 mM: 40,25 mg de CPC foram dissolvidos em quantidade suficiente para 25 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0;
- Tampão fosfato de sódio 100 mM pH:7,0: 1,52 g de fosfato de sódio bibásico dodecahidratado e 5,54 g de fosfato de sódio monobásico anidro foram dissolvidos em água purificada e o pH ajustado para 7 com solução

concentrada de hidróxido de sódio. O volume foi ajustado com água purificada em q.s.p. 500 mL.

- Dulbecco (pH 7,2 – 7,4): Foram adicionados 13,4 g do meio Dulbecco e 3,7 g de bicarbonato de sódio em 1 L de água Mili-Q. Em seguida, o meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 0,5% de penicilina G e 0,5% de estreptomicina (10.000 U/mL e 10.000 µg/mL). Este meio foi preparado e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm em fluxo laminar;
- Soro Bovino Fetal (SBF) inativado: o soro foi descongelado em temperatura ambiente e seu frasco completamente submerso em banho-maria, por uma hora, à temperatura de 56 °C.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do complexo PpIX – PAMAM G4 OH

O complexo foi preparado conforme descrito por ARAÚJO, 2010 (patente depositada BR 102012002494-2). Desta forma, 100 mg da PpIX foram solubilizadas em 50 mL de DMF contendo 0,2% do dendrímero PAMAM G4 OH. Esta solução permaneceu sob agitação a 300 rpm, por uma noite. Em seguida, o solvente orgânico foi totalmente evaporado a temperatura ambiente, com auxílio de ar comprimido. Após a evaporação, o complexo PpIX-PAMAM foi recuperado com água e agitado a 300 rpm, novamente, por uma noite. Após este período, a dispersão resultante foi centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante, com o complexo PAMAM-PpIX solúvel, foi filtrado em membrana PVDF 0,45 µm, para separar do excesso de PpIX livre insolúvel, e então congelado para ser liofilizado. O congelamento foi realizado de duas maneiras, em gelo seco e em freezer variando assim a taxa de congelamento em °C/min. Todo o processo de obtenção do complexo foi realizado ao abrigo da luz e seguiu protocolo proposto por ARAÚJO, 2010.

A quantidade de PpIX obtida no complexo PAMAM G4 – OH liofilizado foi verificada por espectrofluorimetria. Resumidamente, 10 mg do complexo foi diluído em tampão fosfato de sódio 100 mM para se obter uma dispersão de concentração 1×10^{-6} g/ mL de PAMAM – PpIX, contendo 0,45 mM de CPC. Em seguida, no espectrofotômetro, a intensidade de fluorescência emitida pela dispersão foi medida em $\lambda = 400/635$ nm excitação e emissão, respectivamente, fenda (3:3) e velocidade FASTER (ARAÚJO, 2010). O valor encontrado foi aplicado em uma curva analítica da concentração de PpIX pela intensidade de fluorescência fornecendo assim a concentração de PpIX na dispersão analisada.

3.2.2 Validação parcial da metodologia de quantificação da PpIX nos dendrímeros dispersos em água

Esta metodologia foi descrita anteriormente por ARAÚJO, 2010, mas devido a alterações no equipamento e condições de análise, alguns parâmetros foram revalidados conforme especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2008. Esses parâmetros foram: especificidade, linearidade e precisão e serão descritos a seguir.

3.2.2.1 Especificidade

PpIX 2000 ng/mL em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 contendo 0,45 mM de CPC foi analisada em espectrofluorímetro para verificar a intensidade de fluorescência da dispersão. No intuito de verificar se os componentes desta dispersão influenciavam na intensidade de fluorescência da PpIX, cada um deles (solução de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 contendo 0,45 mM de CPC e solução aquosa de 0,2 % de dendrímero PAMAM G4 – OH) foram analisados separadamente no espectrofluorímetro nas mesmas condições de análise da dispersão de PpIX.

3.2.2.2 Curva analítica/ Linearidade

A curva analítica foi obtida partir de seis soluções, em triplicata, de concentrações de PpIX em ng/mL, de 160, 320, 480, 640, 800, 960, em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 contendo 0,45 mM de CPC, preparadas a partir de

uma solução estoque de PpIX em MeOH:DMF – 1:1 (4,4 µg/mL). Essas soluções foram analisadas por espectrofluorimetria em comprimento de onda de excitação e emissão de 400 e 635 nm respectivamente, fenda (3:3) e velocidade FASTER, como descrito anteriormente. A curva analítica foi construída relacionando-se a intensidade de fluorescência (eixo das ordenadas) com suas respectivas concentrações (eixo abcissas).

A análise estatística dos dados foi feita 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 utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r) como o critério mínimo aceitável de $(r) = 0,99$ (ANVISA, 2008).

3.2.2.3 Precisão

Soluções de PpIX a 240, 560 e 800 ng/ mL foram preparadas em 4 replicatas para cada concentração, a partir de uma solução estoque de PpIX em MeOH:DMF – 1:1 (4,4 µg/mL), em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 contendo 0,45 mM de CPC, contemplando o intervalo linear do método. Essas soluções foram analisadas em espectrofluorímetro nas condições descritas no item 3.2.2.2. As intensidades de fluorescência obtidas para cada uma das soluções, foram analisadas com base em uma curva analítica preparada com soluções de PpIX na faixa de concentrações de 160 a 800 ng/mL, em duplicata para cada concentração. A precisão do método foi expressa matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), calculado segundo a equação I.

$$CV\% = \frac{Desv.Pad. \times 100}{[] média} \quad \text{(Equação I)}$$

Onde, o *Desv. Pad.*: é a estimativa do desvio padrão e *[] média*: é a média das concentrações obtidas para cada concentração analisada.

3.2.3 Influência do tempo na intensidade de fluorescência da PpIX após sua dispersão em água

Para análise das dispersões de PpIX em tampão fosfato foi adicionado CPC para manter as moléculas de PpIX na forma de monômeros e possibilitar sua quantificação, como padronizado anteriormente por ARAÚJO, 2010. Para se verificar a estabilidade das dispersões de PpIX após a adição de CPC em função do tempo foram preparadas soluções de PpIX nas concentrações de 182,4, 364,8 e 547,2 ng/mL, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH7,0. Em seguida, foi adicionado 1 mL de CPC 4,5 mM em 10 mL de cada uma das dispersões. As dispersões foram analisadas no espectrofluorímetro após 10, 30, 60 e 80 minutos da adição do CPC. As condições de análise seguiram os mesmos padrões estabelecidos no item 3.2.2.2. Os resultados de intensidade de fluorescência em função do tempo foram analisados estatisticamente usando o teste One Way ANOVA, com análise de variância e o teste de TURKEY como pós-teste. Os cálculos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0, apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.2.4 Distribuição do tamanho e potencial zeta das dispersões aquosas do complexo PpIX – PAMAM G4 OH em função do tempo e do pH

Primeiramente, o tamanho médio de partícula do complexo PpIX-PAMAM G4-OH foi avaliado com o uso do Light Scattering Zetasizer Nano ZS90 – Malvern em função da concentração de PpIX. Assim foram preparadas dispersões aquosas do complexo nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As dispersões contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de PpIX foram analisadas em função do tempo (imediatamente após o preparo e depois de 1, 2, 4, 24, 36 e 168 horas).

Em uma segunda etapa do experimento, o tamanho das partículas e o potencial zeta das dispersões foi analisado em função do pH do meio com o auxílio de um titulador automático. Nas soluções titulantes foram colocadas NaOH 0,25 M e HCl 0,25 M. Foi preparada uma dispersão do complexo PAMAM G4 OH – PpIX na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em KCl 1 mM. Durante o experimento as amostras foram mantidas sob agitação e o pH modificado de 6,4 a 4,2. O tamanho médio das

nanopartículas dendrímeras e o potencial zeta do meio foi avaliado nos valores de pH 6,4, 6,1, 5,5, 4,9, 4,5 e 4,2. As amostras foram preparadas em triplicata.

3.2.5 Cultura de células

Carcinoma de células escamosas (A431) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro BCRJ (Associação Técnico Científico Paul Ehrlich – APABCAM, Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina – HUCFF – UFRJ, INMETRO – Pólo Tecnológico), lote: 000287. As células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em soro fetal bovino/DMSO 95%/5% (solução filtrada em filtro estéril). Para a realização dos experimentos as células foram expandidas em meio Dulbecco's (pH 7,2 – 7,4) com 10% de soro bovino fetal à 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, até crescimento exponencial em um frasco de cultura celular. Quando as células alcançaram uma confluência de cerca de 80% elas foram removidas com auxílio de uma solução de tripsina (item 3.2.5.1) e então utilizadas nos experimentos.

3.2.5.1 Tripsinização

A tripsinização é o processo de retirada das células do frasco de cultura. Assim primeiramente, em fluxo laminar, e com todos os materiais estéreis, o meio Dulbecco's (pH 7,2 – 7,4) com 10% de soro bovino fetal, utilizado para o crescimento das células, foi retirado. Em seguida foram adicionados 20 mL de solução salina para “lavar” as células e aumentar a ação da tripsina. A solução salina foi retirada e acrescentados 3 mL de solução de tripsina em 7 mL de solução salina. O frasco foi mantido por 10 minutos em estufa a 37°C, com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após 5 minutos do período de incubação o frasco foi retirado e agitado para que as células se soltassem da parede do frasco, retornando para a estufa até completar o período onde, novamente, foi agitado para garantir a máxima remoção de células. Para neutralizar a ação da tripsina e evitar a morte celular, 20 mL do meio Dulbecco's (pH 7,2 – 7,4) com 10% de soro bovino fetal foi adicionado e o frasco homogeneizado. Então o conteúdo do frasco de cultura foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e centrifugado a 10°C por 10 minutos a 1500 rpm. Após centrifugação o “pellet” de células formado foi retirado e diluído no meio de cultura celular. Foi realizada a contagem das células com auxílio da Câmara de Neubauer.

3.2.5.2 Localização subcelular da PpIX livre ou complexada ao PAMAM

As células foram diluídas em meio de cultura para a concentração de 2×10^6 /400 μ L e cultivadas em lamínulas dentro de placas com 6 poços por 24 horas. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com solução salina e o meio foi renovado com RPMI sem soro bovino fetal. Em seguida foram adicionados em cada um destes poços soluções de PpIX livre e complexadas com o dendrímero na concentração de 20 μ g/mL de PpIX. As lamínulas foram incubadas nos poços por um período de 4 horas. Ainda, nos últimos 15 minutos de incubação foram adicionados 200 nM de Mitotracker Green (MTG), um marcador fluorescente para a mitocôndria. Após o término do período de incubação, o meio foi retirado. Cada poço foi lavado com solução salina, duas vezes. As lamínulas foram retiradas e colocadas sobre lâminas com Fluoromount. As imagens foram obtidas em microscópio confocal de varredura a laser (CLSM, Modelo TCS SP5, Leica, Alemanha, Software LAS. AF). Foi realizada uma aquisição sequencial em XYZ em resolução de 1024x1024 e objetiva de imersão a óleo de 63x. Foi utilizado laser de argônio com comprimento de onda de excitação 405 e emissão de 600 -700 nm para a PpIX e excitação 488 nm e emissão 515-555 para o MTG. As imagens foram ainda analisadas com o auxílio do software ImageJ com o *plugin colocalization finder* (<http://imagej.nih.gov/ij/plugins>).

3.2.6 Determinação indireta da eficiência de produção do oxigênio singlete

A determinação da quantidade de *O_2 gerada após a irradiação das dispersões de PpIX foi feita indiretamente através da reação do DPBF com o *O_2 gerado. O DPBF sofre fotobleaching quando reage com o *O_2 , reação que ocorre irreversivelmente. Portanto ao reagir com o *O_2 a intensidade da banda de absorção do DPBF em ≈ 400 nm decresce até que todo o *O_2 gerado seja consumido. É através do decaimento da banda de absorção do DPBF que foi determinado a quantidade de *O_2 gerado.

Para realizar este experimento foram preparadas soluções de PpIX livre ou complexada ao PAMAM G4 OH com concentrações equivalentes a 4 μ g/mL de PpIX em DMSO. A 2 mL de cada uma dessas soluções foram adicionados 10 μ L de DPBF na concentração de 2 mg/mL. Essas soluções foram analisadas por

espectrofotometria antes (T0) e após irradiação com laser a 660 nm, potência 36 mV a 10 cm da incidência da fenda por 2 minutos durante 18 minutos. Mais especificamente, a solução era irradiada por 2 min, analisada no espectrofotômetro, irradiada por mais 2 min, novamente analisada e assim sucessivamente num total de 18 min de irradiação. Uma varredura de cada uma das soluções de fármaco na ausência de DPBF bem como da solução de DPBF sem o fármaco foi realizada como controle (ROSSI, et. al., 2008 and TADA, et. al., 2007).

Para determinar a quantidade de *O_2 gerada (ϕ) foi utilizada a equação II (ROSSI, et. al., 2008 and TADA, et. al., 2007):

$$\phi = \frac{(\Delta Abs) \times (\text{volume irradiado}) \times (n^\circ \text{ de avogadro})}{(L) \times (\Delta \epsilon) \times (1 - 10^{-Abs \text{ média}}) \times (I_o) \times (t)} \quad (\text{Equação II})$$

Onde:

- ΔAbs : variação na absorbância da amostra monitorada (diferença entre absorbância inicial e final);
- n° de avogadro: $6,02 \times 10^{23}$, número de moléculas por mol da substância;
- L: caminho óptico, cm.
- $\Delta \epsilon$: coeficiente de absorvidade molar do DPBF em DMSO, mol/L/cm;
- I_o : intensidade de irradiação;
- t: tempo de irradiação em cada ciclo.

3.2.7 Experimentos *in vivo*

Os experimentos foram realizados conforme metodologia padronizada em nosso laboratório (SOUZA, 2010). Camundongos Nude BalbC imunossuprimidos,

fêmeas de 12 a 16 semanas (20-25g de massa corpórea em média) foram adquiridos do Biotério de criação do IPEN/CNEN/SP, autarquia associada à Universidade de São Paulo, sendo criados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de experimentação (protocolo nº 12.1.694.53.7). Os animais foram mantidos em ambiente SPF (*Specific Pathogen Free*), em cama de maravalha trocada 2 vezes por semana. Houve controle de temperatura local, mantida entre 20 e 24°C, iluminação artificial (12 h claro/12 h escuro), umidade natural, densidade populacional de 2 animais/454 cm² (dimensões da caixa = 27,5 (L1) x 16,5 (L2) x 12,5 cm (A)) e utilização de exaustor com 20 trocas de ar por hora, água filtrada e ração à vontade.

Antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina e ketamina, dose de 10 e 75 mg/Kg, respectivamente, em relação a massa corpórea do camundongo.

3.2.7.1 Iontoforese da dispersão de PpIX livre ou complexada ao PAMAM G4 OH em pele sadia

Com o auxílio de um suporte plástico (Figura 10), 1 mL da dispersão aquosa contendo 1 mg/mL de PpIX livre ou complexada com o PAMAM (0,11 mg PpIX/mg de complexo) foi aplicado topicamente em 1,2 cm² da pele sadia do camundongo. Este suporte foi fixado na pele adicionando-se graxa de silicone em suas bordas. Em contato com as dispersões foi colocado um eletrodo de Ag (iontoforese anódica) a uma distância mínima de 5 mm da superfície da pele do animal. Um contra-eletrodo adesivo (Iomed Inc., Salt lake City, EUA) foi colocado na cauda do animal e uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm² foi aplicada por 30 minutos. As mesmas dispersões foram avaliadas em outro grupo de animais passivamente, ou seja, sem a aplicação de corrente elétrica (Figura 10). Os experimentos passivos e de iontoforese foram feitos em 4 replicatas cada.

Figura 10: Aplicação de iontoforese em camundongos Nude BalbC. Eletrodo de prata em contato com a dispersão de PpIX livre ou complexada ao PAMAM (contida em um suporte plástico sobre a pele do animal) e um contra eletrodo adesivo na cauda do animal, ambos conectados a uma fonte de energia.

Após os experimentos, a pele foi dissecada e analisada quantitativamente, por espectrofluorimetria, e qualitativamente, por CLSM. Para análise quantitativa, a PpIX foi extraída da pele como padronizado por ARAÚJO, 2010. Resumidamente, após a dissecação, a pele foi colocada em um tubo falcon. 5 mL de DMSO foi adicionado ao tubo e pele+DMSO foram agitados em turrax por 1 minuto a 17500 rpm seguido de 30 min em banho de ultrassom. As amostras foram então centrifugadas a 6000 rpm, por 15 min, e o sobrenadante filtrado em filtro de PVDF 0,45 μm . A intensidade de fluorescência do filtrado foi medida por espectrofluorímetro no comprimento de onda de excitação de 400 nm e de emissão de 635 nm.

Para a análise qualitativa, a pele foi dissecada e montada sobre uma lâmina coberta com lamínula, sendo o Fluoromount o meio de montagem para os cortes transversais. Já para os cortes verticais a pele foi congelada em uma base de Tissue Tek[®] em gelo seco e cortada em um criostato com 30 μm de espessura. As imagens fluorescentes de cada lâmina foram obtidas em comprimento de onda de excitação de 405 nm (laser argônio) e emissão de 600-700 nm, aquisição no eixo xyz, resolução de 1024x1024 a cada 2 μm e objetiva 40x imersão a óleo.

3.2.7.2 Penetração tumoral das dispersões de PpIX - PAMAM

3.2.7.2.1 Indução tumoral

O tumor foi induzido através de injeção subcutânea de 2×10^6 células A431 na região dorsal de camundongos Nude BalbC imunossuprimidos, como padronizado anteriormente em nosso laboratório. O crescimento do tumor foi acompanhado a cada 2 dias com medidas de tamanho com o auxílio de um paquímetro. O tratamento foi realizado quando o tumor atingiu entre 6 e 8 mm (SOUZA et al, 2011) (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática da indução tumoral (A431) em camundongos

3.2.7.2.2 Ensaio de recuperação da PpIX do plasma sanguíneo

Para verificar se na complexa matriz do plasma sanguíneo havia quantidade significativa de PpIX ou interferentes que poderiam comprometer a quantificação da PpIX utilizando a mesma técnica de extração padronizada para as análises na pele foi realizado um ensaio de recuperação da PpIX do plasma sanguíneo. Assim, o sangue de animais que não receberam tratamento com PpIX foi retirado e

centrifugado para obtenção do plasma. Doze tubos falcon foram contaminados com 5, 7,5 15 e 30 μL de PpIX a 0,02 mg/mL, em DMSO. O DMSO foi evaporado restando apenas PpIX em cada tubo. A estes tubos contendo apenas PpIX foram adicionados 250 μL de plasma sanguíneo e o tubo agitado em vórtex por 1 min. Em seguida, a cada tubo, foi acrescentado 2250 μL de DMSO para extração da PpIX, totalizando um volume de 2,5 mL. Os tubos (com PpIX+ plasma+ DMSO) foram agitados em vórtex por 1 min seguido de 30 min de banho de ultrassom. Foram então centrifugados e o sobrenadante filtrado em filtro de PVDF 0,45 μm . A intensidade de fluorescência da PpIX foi quantificada em espectrofluorímetro. Uma curva analítica de PpIX em DMSO sem a presença do plasma, na mesma concentração do estudo de recuperação foi feita como controle, bem como a leitura de um branco (plasma/DMSO) para verificar possíveis interferentes fluorescentes no plasma sanguíneo.

3.2.7.2.3 Aplicação das dispersões de PpIX - PAMAM nos tumores cutâneos

As dispersões contendo PpIX – PAMAM a 1 mg/mL de PpIX (0,4 mg PpIX/mg complexo) foram aplicadas topicamente sobre o tumor com o auxílio do suporte plástico, como feito no experimento em pele sadia. Para o grupo que recebeu o tratamento passivamente, a dispersão permaneceu em contato com o tumor por 30 min. Para o grupo em que foi aplicada a iontoforese, o eletrodo de Ag foi colocado em contato com as formulações e o contra-eletrodo na cauda do animal, como descrito no item 3.2.7.1. Uma corrente elétrica de 0,5 mA/cm² foi aplicada por 30 minutos com o uso de uma fonte de energia (Kepco Power Supply Modelo APH 500DM). Ao final do experimento foi realizada uma punção cardíaca no animal para retirada do sangue, o que provocou o sacrifício do animal por choque hipovolêmico. O tumor foi dissecado com o auxílio de um bisturi e uma tesoura cirúrgica.

O sangue retirado foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4⁰C. Após a centrifugação o sobrenadante (plasma) foi retirado e deste extraída a PpIX com DMSO para análise no espectrofluorímetro. Nos tumores, a pele que o recobria foi primeiramente separada, e a PpIX foi quantificada na pele e no tumor separadamente. Um *n* de 5 animais foi utilizado para cada grupo.

3.2.8 Análise de dados

A análise estatística dos dados obtidos nos experimentos de permeação foi feita com o teste One Way ANOVA, com análise de variância e post test – TURKEY ($p < 0,05$). Os dados semiquantitativos das medidas de intensidade de fluorescência e coeficientes de colocalização foram realizadas pelo software ImageJ.

4 Resultados e Discussão

4.1 Obtenção do complexo

O complexo PpIX-PAMAM G4-OH foi preparado conforme descrito por ARAÚJO, 2010. No entanto, na etapa de obtenção dos complexos sólidos dois métodos de congelamento foram analisados para se verificar a influência da velocidade de congelamento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) nas características de redispersão do complexo PpIX-PAMAM em água. Sendo assim, após obtenção do complexo em solução as amostras foram congeladas lentamente, em freezer, e rapidamente, em gelo seco.

O congelamento é um importante passo que ocorre na etapa prévia da liofilização; ele determina a morfologia e a distribuição de tamanho dos cristais de gelo, além de influenciar em vários parâmetros críticos, como, por exemplo, no modo de agregação das moléculas, na cristalinidade e na área superficial do liofilizado (SEARLES, et al., 2001). De fato, nós observamos que o congelamento rápido, em gelo seco, resultou em um pó com estrutura mais compacta, difícil de ser solubilizada em solução aquosa, enquanto o congelamento lento no freezer resultou em um pó mais grosseiro, bastante poroso e facilmente redisperso em água. Isto porque a taxa de congelamento lenta leva a formação de cristais de gelo maiores, que ao sublimarem levam a formação de poros na matriz do soluto de tamanho relacionado ao do cristal de gelo que ocupava seu lugar, determinando a textura e porosidade da amostra liofilizada (SEARLES, et al., 2001, KASPER e FRIESS, 2011). Já a amostra congelada a uma velocidade rápida possui, provavelmente, cristais de gelo diminutos em sua matriz, que quando sublimados no processo de liofilização deram origem a um pó compacto, pouco poroso e de difícil ressuspensão em água. Desta forma, o método escolhido para a etapa de congelamento dos complexos, foi o de congelamento lento, em freezer, devido à facilidade de

dispersão do complexo sólido em meio aquoso para o tratamento de tumores cutâneos.

Obteve-se lotes de complexos contendo 0,11 mg PpIX/mg PAMAM e lotes de complexos contendo 0,4 mg PpIX/mg PAMAM.

4.2 Validação parcial da metodologia analítica para quantificação da PpIX em solução aquosa

4.2.1 Especificidade

As soluções de tampão fosfato + CPC ou de PAMAM G4 OH em água não apresentaram sinais de emissão na região de emissão da PpIX, não interferindo, portanto, no seu espectro (Figura 12), confirmando os resultados obtidos por ARAÚJO, 2010.

Figura 12: Espectro de emissão da PpIX em tampão fosfato de sódio 100 mM pH7,0 + CPC 0,45mM

4.2.2 Curva analítica/ Linearidade

A Figura 13 mostra a curva analítica da intensidade de fluorescência da PpIX em função de sua concentração. A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados foi possível obter a equação da reta $y = 0,1224x + 7,2849$, linear para quantificação da PpIX no intervalo de concentração de 160 a 960 ng/mL, com coeficiente de correlação linear adequado ($r = 0,99$).

Figura 13: Curva analítica da PpIX em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH7,0 e CPC 0,45 mM. Equação da reta: $y = 0,1224x + 7,2849$, $r = 0,99$

Conclui-se, assim que metodologia analítica é linear no intervalo de concentração estudado, e, portanto, adequada para a quantificação da PpIX no complexo PpIX – PAMAM G4 OH obtido.

4.2.3 Precisão

Os dados adquiridos foram tratados estatisticamente (Tabela 1) apresentando o coeficiente de variação (CV) e porcentagem de erro relativo dentro do valor aceitável para a ANVISA ($\leq 5\%$).

Tabela 1. Tratamento estatístico dos dados obtidos no parâmetro de precisão do método para determinação da PpIX

[] PpIX ng/mL - T* (n=4)	Média, [] PpIX ng/mL - O**	CV% ($\leq 5\%$)	E% ($\leq 5\%$)
259,68	258,62	3,04	-0,41
605,92	628,40	1,21	3,71
865,60	859,23	0,42	-0,74

[] = Concentração, T* = Teórico, O** = obtido, CV = coeficiente de variação ($CV\% = (\text{desv pad} / [] \text{ média}) \times 100$), E = exatidão ($E\% = ([] \text{ obtida} - [] \text{ teórica} / [] \text{ teórica}) \times 100$).

4.2.4 Influência do tempo na intensidade de fluorescência da PpIX em dispersão aquosa contendo CPC

É sabido que a PpIX agrega em meio aquoso e não emite fluorescência quando na forma agregada (RICCHELLI, et al., 1998. RICCHELLI, 1995). Portanto, para evitar esta agregação e quantificar a PpIX em solução aquosa, foi adicionado CPC às amostras antes da análise espectrofluorimétrica, como já padronizado por ARAÚJO, 2010. Na concentração utilizada, 0,45 mM, o CPC impede a agregação das moléculas de PpIX, pois ocorre uma interação eletrostática dos grupos carboxílicos (COO^-) da PpIX com as cargas positivas do CPC dissociado em meio aquoso (SIVASH et al., 1991). Assim, o espectro de absorção e emissão da PpIX em meio aquoso contendo CPC assemelha-se àquele da PpIX em metanol, meio em que a PpIX não agrega (RICCHELLI, et al, 1998).

No entanto, como a interação eletrostática entre PpIX e o CPC é dinâmica, ela pode demorar um tempo para entrar em equilíbrio. A solução de PpIX pode também perder a fluorescência em relação ao tempo se não muito bem protegida da luz. Desta forma a intensidade de fluorescência da PpIX foi avaliada em função do tempo e da concentração da PpIX após a adição de CPC na amostra (Figura 14).

Figura 14: Intensidade de fluorescência da PpIX em função de sua concentração e tempo após a adição do tensoativo CPC na dispersão aquosa contendo PpIX.

Nenhuma diferença estatística foi encontrada em cada uma das concentrações em função do tempo, portanto, é seguro analisar a amostra em até 80 minutos após a adição do CCP.

4.3 Distribuição de tamanho e potencial zeta das dispersões de PpIX-PAMAM

A formulação selecionada para os estudos *in vivo* foi uma simples dispersão aquosa do complexo PpIX-PAMAM contendo 1 mg/ml de PpIX. Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório foi verificado que nesta concentração o complexo PpIX-PAMAM promoveu a melhor permeação cutânea, *in vitro*, da PpIX (ARAÚJO, 2010). A solubilidade da PpIX livre em água é de apenas 6 µg/ml. . A complexação com o PAMAM permitiu que 1 mg/mL de PpIX fosse solubilizado em meio aquoso, uma aumento de quase 200 vezes na solubilidade do fármaco. É sabido que soluções com altas concentrações de PpIX levam a um deslocamento do equilíbrio de estruturas monômero-dímero da PpIX, aumentando o número de dímeros em solução (KARNS et al., 1979). BROWN et al., 1976, sugeriu até a formação de micelas de PpIX quando esta está presente em altas concentrações em soluções aquosas, baseado na observação de mudanças súbitas na posição dos

picos de absorção da banda Soret. Os agregados das porfirinas assumem estruturas que podem ser classificadas como tipo J- ou H-, de acordo com a orientação induzida pelas transições dipolo dos constituintes da molécula, podendo ser “cabeça-cauda” (tipo J-) ou “cabeça-cabeça” (tipo H-) (KUBAT et al., 2005; AKINS et al., 2006). A incorporação de altas concentrações de PpIX nos dendrímeros seguida de sua dispersão em água pode afetar não só a formação dos tipos de agregados conhecidos da PpIX como também levar a formação de outros tipos de agregados da PpIX com o dendrímero. Como estes agregados podem afetar a penetração da PpIX no tumor, decidiu-se estudar a distribuição do tamanho das nanopartículas dendriméricas contendo PpIX em função do tempo para avaliar as características dinâmicas do complexo PpIX-PAMAM em água.

Para ajustar as condições do equipamento (Light Scattering Zetasizer Nano ZS90 – Malvern) para a leitura correta das dispersões foram preparadas dispersões de PpIX-PAMAM em diferentes concentrações de PpIX e o tamanho médio das partículas analisado em função da intensidade dos picos (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho médio de partículas, medido por intensidade, presentes nas dispersões aquosas de PpIX-PAMAM em diferentes concentrações de PpIX

Concentração de PpIX (µg/mL)	Tamanho médio (nm)	Pdl
6,25	271 (100%)	0,34
12,50	270 (100%)	0,29
25,00	238 (100%)	0,34
50,00	261 (92%)	0,25
100,00	237 (84%)	0,44

Pode-se observar na Tabela 2 que nas concentrações de 6,25 a 25 µg/mL obteve-se uma única população de partículas com um tamanho médio de 260 nm. As dispersões mais concentradas apresentaram uma alta porcentagem de partículas nesta faixa de tamanho (acima de 90% nas dispersões a 50 µg/mL), mas com uma polidispersão (Pdl) semelhante a obtida em concentrações mais baixas. Já nas análises feitas com 100 µg/mL de PpIX, o Pdl foi maior, assim como a porcentagem da população com esta faixa de tamanho diminuiu, sugerindo uma provável

interferência de alguns agregados. Sabe-se que a determinação por DLS possui um fator limitante, a concentração das dispersões. Em altas concentrações pode ocorrer um espalhamento múltiplo da luz, que é quando a luz que alcança uma partícula se espalha para outra partícula antes de alcançar o detector, levando a erros na determinação (KASZUBA, et al, 2004). Apesar desta interferência optou-se por fazer o estudo de estabilidade do tamanho das partículas em função do tempo em dispersões contendo 50 µg/mL de PpIX. Isto porque em várias das análises feitas em concentrações menores do que esta o aparelho sinalizava erro na leitura devido a baixa concentração de partículas dispersas no meio. Desta forma, apesar das leituras feitas a 50 µg/mL de PpIX apresentarem uma segunda população, indicando que podem estar um pouco acima da concentração ideal para não se ter interferência do espalhamento múltiplo da luz, as leituras feitas pelo equipamento eram seguras (não indicavam erros).

A Tabela 3 mostra o tamanho médio das partículas presentes na dispersão aquosa de PpIX-PAMAM a 50 µg/mL em função do tempo.

Tabela 3. Tamanho médio de partículas presentes na dispersão aquosa de PpIX-PAMAM a 50 µg/mL em função do tempo (medidas de intensidade)

Tempo (h)	Tamanho médio (nm)	Pdl
0	213	0,38
1	214	0,39
2	217	0,41
4	215	0,44
24	213	0,39
36	226	0,43
168	229	0,29

O PAMAM G4 OH quando disperso em solução metanólica apresenta diâmetro médio de 3,1 nm. Quando submetido às condições da complexação usadas neste trabalho seu diâmetro médio aumenta para 38 nm, sugerindo modificações na conformação do dendrímero durante o processo, mesmo na ausência de PpIX. Pode-se observar na Tabela 3 que após a complexação do dendrímero com a PpIX, as partículas com 38 nm desapareceram e uma nova população de nanopartículas surge, com ~215 nm. Este aumento do tamanho das partículas na presença da PpIX

sugere a incorporação da PpIX no dendrímero. Esta incorporação pode ocorrer não apenas nos espaços internos do dendrímero, mas também a partir da interação da PpIX com os grupos superficiais do PAMAM G4 OH. Conforme descrito por ARAÚJO, 2010, no pH das dispersões (pH=7), entre as aminas terciárias no interior do dendrímero ocorrem interações do tipo hidrofóbica e ligação de hidrogênio e com as hidroxilas terminais, ligações do tipo dipolo-dipolo.

Com relação ao tamanho médio das nanopartículas em função do tempo, pode-se observar na Tabela 3 que ele permaneceu sem grandes variações até 24 h após o preparo das dispersões. A partir daí um ligeiro aumento, de 5%, foi observado, mas o mesmo permaneceu constante durante os 7 dias de experimento. Levando em consideração o Pdl alto das dispersões nas condições em que foram avaliadas, e a via tópica de administração das mesmas, esta variação pode ser considerada não significativa. Mais especificamente, vários artigos descrevem que nanopartículas não atravessam o estrato córneo passivamente (CAMPBELL et al., 2012, PROW, et al., 2011, LOPEZ et al., 2010). O complexo obtido a partir da complexação da PpIX com o PAMAM tende a ficar, portanto, na superfície da pele, funcionando como um doador de PpIX, ao menos quando aplicada de forma passiva, ou seja, na ausência de métodos físicos.

O pH da dispersão pode influenciar na liberação da PpIX dos dendrímeros e sua permeação na pele. Como as dispersões apresentam um pH de 7,2 e o pH da superfície da pele e das células tumorais é em torno de 5,0 (TAVEIRA e LOPEZ, 2011), esta diferença de pH entre a pele e a formulação poderia afetar a conformação do dendrímero, alterando o tamanho dos agregados e a liberação do fármaco. Assim o tamanho das partículas foi avaliado em função da variação do pH da dispersão (Figura 15).

Figura 15: Tamanho das partículas de PpIX-PAMAM em função do pH

A análise da Figura 15 sugere que não houve alteração significativa no tamanho das partículas entre os pHs 5,5 e 6,5. Em pHs abaixo de 5,0, no entanto, o tamanho das partículas aumentou, assim como o desvio padrão. Sabe-se que em pH abaixo de 5,0 as aminas presentes no interior do dendrímero estão todas protonadas (SHCHARBIN et al., 2005). O tamanho das partículas aumentado em pHs ácidos sugere que a protonação das aminas tenha alterado sua conformação, talvez para uma forma mais estendida, aumentando seu tamanho e liberando moléculas de PpIX que porventura estivessem em seu interior. A liberação da PpIX, no entanto, pode levar a formação de agregados entre as próprias moléculas de PpIX. Esses agregados também podem ter sido os responsáveis pelo aumento do tamanho das partículas e pela grande variação de tamanho (alto desvio padrão) observado nas análises das dispersões ácidas.

O potencial zeta das dispersões foi de 10,4 mV ($\pm 1,4$) em pH 7,2, mas conforme o pH da dispersão diminuiu, o potencial zeta aumentou (Figura 16), provavelmente devido a protonação das aminas que compõem o dendrímero. Em pH 5,5, próximo ao pH da pele, o potencial zeta foi de +30,4 mV ($\pm 0,5$). Este potencial zeta positivo é interessante por conferir maior estabilidade a dispersão (MULLER, et

al, 2000), mas também por contribuir com a eletromigração quando a iontoforese for aplicada. Assim, em contato com o estrato córneo (pH 5,5), as nanopartículas dendriméricas devem apresentar carga positiva e penetrar na pele por eletromigração quando colocadas em contato com o eletrodo positivo (ânodo) e na presença da corrente elétrica (iontoforese).

Figura 16: Potencial zeta (mV) das dispersões de PAMAM G4 OH – PpIX em função do pH do meio.

4.4 Localização subcelular da PpIX a partir dos complexos PpIX-PAMAM

Estudos indicam que a atividade fotodinâmica das substâncias fotossensíveis está relacionada com sua localização intracelular e intratumoral. Isto porque o tempo de vida (0,05 μ s) e o coeficiente de difusão (0,02 μ m) do oxigênio singleto, gerado a partir da foto-excitação da PpIX, e principal produto citotóxico formado na TFD, são curtos, direcionando sua ação para o local onde é formado (MOAN e BERG, 1991, JI et al., 2006). Parece que quando a PpIX se localiza na mitocôndria, a TFD é mais efetiva do que quando o FS fica difuso no citoplasma das células (JI et al., 2006). Isto acontece porque a morte celular é causada por um processo apoptótico, o qual é desencadeado quando a mitocôndria libera o citocromo c no citoplasma da célula. Acredita-se que durante a TFD, os radicais livres formados na mitocôndria causam uma despolarização da membrana mitocondrial, alterando sua permeabilidade e promovendo a liberação do citocromo c para o citoplasma (WU e XING, 2012 e LAM

et al, 2001). Desta forma, quando o FS já está na mitocôndria das células quando a luz é aplicada, a TFD é mais efetiva.

Comparando a localização da PpIX induzida pelo ALA (PpIX endógena) com a PpIX administrada diretamente (PpIX exógena), já foi demonstrado em células de carcinoma do esôfago humano (KYSE-450, KYSE-70) que a PpIX endógena, mais efetiva para a TFD, se localiza mais nas mitocôndrias do que a exógena, menos efetiva (JI et al., 2006). Para verificar se a complexação da PpIX com o dendrímero altera a distribuição subcelular da PpIX nas células de carcinoma escamosas (A431), essas células foram incubadas com o complexo PpIX-PAMAM e a distribuição da PpIX comparada com a PpIX administrada na forma livre, não complexada (Figura 17). Um marcador específico para a mitocôndria (MTG) foi utilizado para determinar, por CLSM, se a fluorescência característica da PpIX (vermelha) se apresentava co-localizada a do MTG (verde).

Figura 17: Imagens de CLSM de células A431 incubadas por 4 h com a PpIX livre ou PpIX-PAMAM G4 OH, na concentração de 20 µg/mL de PpIX. Vermelho: PpIX. Verde: MTG. Aumento 63x. Excitação/ emissão 405/ 600 -700 nm para a PpIX e excitação/ emissão 488/ 515-555 nm para o MTG.

De maneira geral, observa-se na Figura 17 que a cultura de células tratada com PpIX livre apresentou uma fluorescência difusa, que não coincide com a fluorescência verde do MTG, marcador da mitocôndria. Já quando as células foram tratadas com o PpIX-PAMAM percebe-se claramente uma colocalização, evidenciada na Figura 17 por uma cor amarelada, resultante da sobreposição dos canais verde e vermelho.

Para confirmar essa colocalização, as imagens foram analisadas com o auxílio do *software* “Image J”. Este programa aponta os pontos colocalizados como pontos brancos e ainda estima um valor numérico para esta colocalização (Figura 18). Quando administrada na forma complexada com o PAMAM, a PpIX apresentou um valor de colocalização com o MTG quase 30 vezes maior do que o da PpIX administrada na forma livre, sendo 1,42% e 0,05% para PpIX-PAMAM e PpIX livre, respectivamente.

Figura 18: Colocalização (pontos brancos) da PpIX livre e complexada ao PAMAM ao MTG em análise feita pelo *software* Image J usando o a função *plugin colocalization finder* (<http://imagej.nih.gov/ij/plugins>). Coeficiente de colocalização da PpIX livre = 0,05%, coeficiente de colocalização da PpIX-PAMAM = 1,42%.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (ARAÚJO, 2009) observou-se que a fototoxicidade de 2 $\mu\text{g/mL}$ de PpIX foi de 60% para as células A431, enquanto que, na mesma concentração, o complexo PpIX-PAMAM G4 OH apresentou fototoxicidade de mais de 90%. A maior captação da PpIX pelas células quando complexada com o dendrímero pode estar relacionada a esta maior fotocitotoxicidade assim como ao direcionamento do fármaco para a mitocôndria. O

alto *uptake* celular de complexos dendriméricos já foi demonstrado na literatura para outros fármacos (NAJLAH e D'EMANUELE, 2006), (SVENSON, 2009) (VENUNGANTI e PERUMAL, 2009). Acredita-se que o mecanismo de *uptake* celular dos dendrímeros é realizado por meio de um transporte ativo, dependente de energia, mas o caminho percorrido pela vesícula endocitótica até seu alvo é diferente em cada tipo de célula e depende da carga superficial do dendrímero (ALBERTAZZI et al, 2010, SAOVAPAKHIRAN et al, 2009, PERUMAL et al, 2008). A maioria dos trabalhos sugere que os dendrímeros PAMAM se localizam nos lisossomos e que, neste ambiente ácido, sofrem modificações estruturais e liberam o fármaco. No caso do complexo desenvolvido neste trabalho, é provável que, como discutido anteriormente (item 4.3), o PpIX-PAMAM tenha as aminas terciárias do interior do dendrímero protonadas desestabilizando a vesícula lisossômica e liberando a PpIX. A maior localização da PpIX na mitocôndria quando a mesma é administrada na forma complexada pode estar relacionada, portanto, a maior concentração de PpIX dentro das células e não a um direcionamento específico causado pelo dendrímero.

4.5 Determinação indireta da eficiência de produção do oxigênio singlete

O *O_2 é produzido a partir de uma série de reações fotoquímicas que ocorrem quando o FS absorve fótons de luz, passando então de um estado fundamental para um estado energético excitado, após ser irradiado por laser no comprimento de onda de absorção do FS (ZHAO and HE, 2010). Assim dispersões do FS em estudo (PpIX livre ou complexada com o PAMAM) foram irradiadas e a produção do *O_2 avaliada indiretamente pelo decréscimo na absorção do DPBF (ver item 3.2.6). (Figura 19).

Figura 19: Decaimento da absorbância do DPBF em solução com PpIX livre (gráfico 1) ou PpIX-PAMAM (gráfico 2) em diferentes tempos de irradiação. Irradiação com laser a 660 nm, potência 36 mV a 10 cm da incidência da fenda , a cada 2 min.

Pode-se observar na Figura 19 que a PpIX e o DPBF apresentam absorção máxima em regiões próximas do espectro (em ≈ 400 nm). Portanto quando juntos, em uma mesma solução, seus espectros se sobrepõem. No entanto, o decaimento no espectro de absorção na presença de *O_2 ocorre apenas para o DPBF e a absorbância da PpIX não sofre variações. Assim o valor de absorbância do DPBF após cada tempo de irradiação considerado para os cálculos de produção de *O_2 foi a diferença entre a absorbância da amostra irradiada (PpIX+DPBF) e a absorbância constante da PpIX (Figura 20). Além disso, foi verificado que a solução de DPBF na ausência de PpIX (controle) não sofreu variação no espectro de absorção quando irradiado, comprovando que a variação no espectro desta substância observada quando a PpIX estava presente correspondia a interação do DPBF com o *O_2 produzido apenas na presença da PpIX e da luz.

Figura 20: Porcentagem de absorbância das amostras contendo PpIX e DPBF em 416 nm em função do tempo de irradiação com laser em 660 nm. A absorbância das amostras que continham PpIX e DPBF foi corrigida subtraindo-se a absorbância da amostra pela absorbância da PpIX (que não alterou em função da irradiação).

A quantidade de *O_2 gerada calculada de acordo com a Equação II foi de $4,3 \times 10^{-3}$ para a PpIX livre e de $4,6 \times 10^{-3}$ para o complexo PpIX-PAMAM. Desta forma, pode-se afirmar que a complexação com o dendrímero não modificou a capacidade fotoquímica da PpIX em gerar oxigênio singlete.

Pode-se observar na Figura 20 que a curva de decaimento da absorbância da PpIX livre apresenta uma queda um pouco mais acentuada comparada a curva de decaimento do complexo PpIX-PAMAM. Este resultado sugere que o complexo sustenta por um pouco mais de tempo a geração do *O_2 , o que pode aumentar a eficiência da TFD.

4.6 Permeação da PpIX livre e PpIX-PAMAM na pele sadia

O maior *uptake* celular da PpIX conferido pelo dendrímero é vantajoso numa administração tópica se o complexo PpIX-PAMAM conseguir entrar na pele e alcançar as células tumorais. Essa penetração depende de interações do complexo com a pele, as quais podem alterar a distribuição de tamanho, potencial zeta e

conformação do dendrímero. Para verificar se a complexação com o dendrímero altera as características fotoquímicas da PpIX quando em contato com a pele experimentos *in vivo* foram realizados na presença da iontoforese. A iontoforese foi aplicada na tentativa de “forçar” a penetração dos complexos já que se sabe que nanopartículas em geral não atravessam o estrato córneo passivamente (PROW, et al., 2011).

A Figura 21 mostra um corte transversal da pele observada por CLSM após 30 minutos de iontoforese da PpIX livre e da PpIX-PAMAM na mesma concentração de PpIX. A fluorescência vermelha é característica da PpIX, uma vez que a já bem baixa autofluorescência da pele na faixa de 600-700 nm, onde a PpIX emite, foi completamente eliminada com ajustes nos parâmetros do equipamento.

Figura 21: CLSM de corte transversal da pele de camundongo sem pelo. Projeção máxima dos canais de fluorescência obtidos após 30 minutos de aplicação de iontoforese ($0,5 \text{ mA/cm}^2$), *in vivo*, através de solução aquosa de PpIX livre e complexada (PpIX-PAMAM). Aumento 40x.

Pode-se observar na Figura 21 que a intensidade de fluorescência da pele após tratamento com o complexo PpIX-PAMAM foi muito maior e mais homogeneamente distribuída do que após o tratamento com a PpIX livre. Este resultado indica que as moléculas de PpIX livres agregam na pele, diminuindo sua fluorescência. O espectro de absorção da PpIX apresenta-se deslocado quando as moléculas estão agregadas, o que diminui sua foto-excitação bem como seu tempo de vida no estado triplete, diminuindo consequentemente sua capacidade de gerar *O_2 , o principal agente citotóxico da TFD (RICCHELLI et. al., 1998 e LIU et. al., 2008). Sendo assim, mesmo que a PpIX livre penetre a pele em maiores

concentrações do que a PpIX complexada, o que é bastante provável pois o fármaco livre apresenta tamanho muito menor do que o complexo, sua atividade fotodinâmica estará diminuída devido a sua agregação.

Devido a melhor distribuição e alta intensidade de fluorescência do PpIX-PAMAM na pele em relação a PpIX livre os estudos subsequentes foram realizados com o PpIX-PAMAM na presença e ausência da iontoforese.

A Figura 22 mostra a quantidade de PpIX recuperada da pele após 30 minutos de tratamento passivo e iontoforético com o PpIX-PAMAM. Pode-se observar que não há diferença estatística significativa da concentração de PpIX total extraída após os dois tratamentos.

Figura 22: Quantidade de PpIX extraída da pele após 30 min de tratamento passivo e iontoforético com PpIX-PAMAM G4 OH, a 1 mg/mL de PpIX (n = 4).

A Figura 23 mostra cortes perpendiculares à superfície da pele após 30 minutos de tratamento passivo e iontoforético com o PpIX-PAMAM. Pode-se observar que a PpIX se distribui por toda a epiderme, não ficando apenas retida no estrato córneo, em ambos tratamentos. Entretanto, a análise da fluorescência ao longo das camadas da pele (Figura 23-C) mostra que ela é mais intensa nas camadas mais profundas da epiderme quando a iontoforese é aplicada. Esta análise foi feita em vários cortes e este perfil se repetiu em todos eles.

Figura 23: CLSM de corte perpendicular a superfície da pele. Imagem obtida após 30 minutos de aplicação (A) passiva e (B) iontofoerética do complexo PpIX-PAMAM. (C) perfil de fluorescência da PpIX ao longo da epiderme, dado a partir do software Image J (*sem unidade para os valores de distância).

Analisados em conjunto, esses resultados indicam que a PpIX penetra a pele quando administrada a partir do complexo PpIX-PAMAM mesmo após administração passiva. A iontoforese parece facilitar sua penetração para as camadas mais profundas, o que pode favorecer sua entrada nas células tumorais localizadas nessas regiões. No entanto, não é possível inferir, a partir dessas análises, sobre a penetração do PAMAM. Pode-se apenas afirmar que ele não impede a penetração da PpIX e que a distribuição da fluorescência deste fotossensibilizador é mais intensa e melhor distribuída do que quando a PpIX é administrada na forma livre.

4.7 Penetração tumoral da PpIX a partir do complexo PpIX-PAMAM

4.7.1 Padronização da recuperação da PpIX do plasma sanguíneo

Para a análise da PplX no plasma foi realizado inicialmente um estudo de recuperação da PplX contaminando-se amostras de sangue com concentrações conhecidas do fármaco e realizando a sua extração como descrito no item 3.2.7.2.2. A Tabela 4 mostra a porcentagem de PplX recuperada para concentrações de 40 a 240 ng/mL de fármaco. Pode-se observar que foi possível recuperar de 83 a 105% de PplX dependendo da concentração inicial. A contaminação com a concentração mais alta, de 240 ng/mL foi a que levou a menor recuperação. Com a concentração mais baixa, a recuperação foi a mais alta, de 105%, indicando que todo o fármaco foi recuperado. Esta variação de 5% a mais de recuperação em relação a quantidade adicionada está dentro do erro do método analítico e do procedimento de contaminação do sangue com o fármaco. Isto é, para contaminar o sangue com 40 ng/mL de PplX apenas 5 uL da solução mãe de fármaco foi pipetada, para depois ter apenas parte extraída (item 3.2.7.2.2), levando a erros maiores do que quando se trabalha com concentrações mais altas. O processo de extração da PplX do plasma foi considerado, portanto, satisfatório na faixa de concentração avaliada.

Tabela 4. Ensaio de recuperação da PplX no plasma sanguíneo

Amostra (n=3)	[]Téorica de PplX (ng/mL)	[]Obtida de PplX (ng/mL)	Média	DP	%Recup
A	40	41,519	42,301	1,024	105,754
B	60	60,707	56,814	7,175	94,689
C	120	121,577	112,272	8,306	93,560
D	240	189,954	199,094	7,954	82,956

^{II}Concentração; DP: desvio padrão das amostras; %Recup: porcentagem de recuperação das amostras ((Valor observado/valor esperado)*100).

Como a PplX é uma substância endógena, pequenas concentrações da mesma também podem ser encontradas no plasma de animais não submetidos ao tratamento tópico com a PplX. A variação na quantidade de PplX recuperada pode ter relação com alguma concentração de PplX presente no plasma e essa concentração pode variar de animal para animal. Desta forma, o plasma de 2 animais não contaminado com PplX também foi avaliado. Em um deles 11,42 ng/mL de PplX foi encontrado e no outro, 95,97 ng/mL. Como altas concentrações foram observadas no plasma de um dos animais, apenas valores maiores do que 100 ng/mL foram considerados nos estudos subsequentes.

4.7.2 Penetração no tumor

Sabe-se que em tumores cutâneos o estrato córneo, camada mais externa da pele, pode sofrer uma hiperqueratinização, dificultando ainda mais a penetração de fármacos através dele e, conseqüentemente, sua chegada ao tumor (TAVEIRA e LOPEZ, 2011). Em estudo *in vitro* realizado anteriormente em nosso laboratório com pele de orelha de porco foi verificado que a PpIX administrada topicamente a partir da dispersão contendo PpIX-PAMAM G4 OH alcançou camadas mais profundas, sendo inclusive quantificada no receptor da células de difusão (ARAÚJO, 2010). Verificou-se também, no presente trabalho, que, em pele sadia de camundongo, *in vivo*, a PpIX administrada a partir deste mesmo complexo é capaz de permear e atingir camadas mais profundas da pele após aplicação de iontoforese (Figura 23). Neste experimento em tumor pretende-se verificar se a PpIX é capaz de atingir o tumor considerando que, diferente da pele sadia, a pele que recobre o tumor encontra-se, na maioria das vezes, hiperqueratinizada. Os tumores que se desenvolveram no dorso dos animais foram tratados com dispersão aquosa de PpIX-PAMAM a 1 mg/mL de PpIX de forma passiva ou com aplicação de iontoforese (0,5 mA/cm²) por 30 minutos, n= 4-5. Após a permeação, a pele foi separada do tumor e a PpIX foi quantificada na pele, tumor e plasma de cada animal tratado, separadamente (Figura 24).

Figura 24: PpIX extraída da pele e do tumor após 30 minutos de aplicação passiva ou iontoforética ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) da dispersão de PpIX-PAMAM (n: 4-5). (*) Apresentaram diferença estatística

Pode-se observar na Figura 24 que apenas 30 min de tratamento, tanto passivo como iontoforético, foram suficientes para permitir a difusão e quantificação da PpIX não só na pele, mas também no tumor. A quantidade de PpIX encontrada no plasma foi abaixo do limite de quantificação do método. Apenas um dos experimentos com iontoforese apresentou 80 ng/mL de PpIX no plasma, mas este valor não foi levado em consideração devido aos estudos preliminares de quantificação de PpIX no plasma de animais não tratados, onde um deles apresentou em torno de 90 ng/mL de PpIX (ver item 4.7.1).

A iontoforese não aumentou a penetração da PpIX na pele, como também observado por ARAUJO, 2010 em estudos *in vitro* de permeação. No tumor, a quantidade de PpIX recuperada após a iontoforese também não foi maior do que a recuperada após a permeação passiva. Os estudos em pele sadia também não mostraram influência da iontoforese na quantidade total de PpIX permeada (Figura 22), mas mostraram uma tendência do fármaco em atingir camadas mais profundas da pele mais rapidamente quando a iontoforese foi aplicada (Figura 22). Desta forma, é possível que os 30 min de aplicação da iontoforese na pele doente tenham levado o fármaco para além do tumor, caindo na corrente sanguínea em maiores concentrações do que a administração passiva. Como a concentração penetrada é

pequena em relação ao volume do plasma, não foi possível quantificar esta diferença.

De qualquer forma, a influência da iontoforese na penetração da PpIX não foi significativa. Este fato pode estar relacionada ao alto coeficiente de partilha óleo/água da PpIX ($\log P = 3,61$, calculado usando *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02* pelo *SciFinder*), responsável pela sua rápida entrada e partilha no estrato córneo. A aplicação da iontoforese não alterou, portanto, essa já facilitada penetração passiva do fármaco. Não se sabe, no entanto, como já mencionado anteriormente, se a iontoforese facilitou a entrada do PAMAM na pele, uma vez que ele não é quantificado pelos métodos analíticos padronizados neste trabalho. A entrada de PAMAM junto com a PpIX pode alterar a distribuição da PpIX nas células e aumentar a eficiência da TFD, mas apenas o tratamento dos tumores pode comprovar esta hipótese.

Fica claro, no entanto, que a complexação da PpIX com o dendrímero não impediu a penetração do fármaco. Ainda, a PpIX foi capaz de atingir seu alvo, o tumor em apenas 30 min de tratamento. É interessante mencionar, no entanto, que maiores proporções de dendrímero no complexo parecem diminuir a penetração da PpIX. Os experimentos em pele sadia, por exemplo, foram realizados com 1 parte de PpIX para 9 partes de dendrímero (0,11 mg PpIX/mg complexo), enquanto os realizados no tumor foram feitos com 1 parte de PpIX para 2,5 partes de PAMAM (0,4 mg PpIX/mg complexo). Comparando-se a quantidade de PpIX recuperada da pele sadia (Figura 22) e da pele que recobria o tumor (Figura 24), percebe-se que aproximadamente 3,5 vezes mais PpIX foi recuperada da pele que recobria o tumor e que a mesma foi tratada com um complexo que tinha aproximadamente 3,5 vezes menos dendrímero em sua composição. Este resultado está de acordo com o observado por VENUGANTI & PERUMAL (2009) que observaram uma menor retenção na pele do 5-fluoracil quando concentrações maiores de dendrímero eram utilizadas. Esses autores sugerem que o excesso de dendrímero pode saturar os sítios de ligação da pele dificultando a entrada de maiores concentrações de fármaco (VENUGANTI & PERUMAL, 2009).

5 Conclusão

O complexo PpIX-PAMAM sólido obtido após congelamento em freezer e liofilização apresentou fácil redispersão em água e alta solubilidade. O tamanho médio das nanopartículas dispersas, de aproximadamente 220 nm, manteve-se constante por 7 dias. O potencial zeta das dispersões foi de 10 mV, em pH 7 e de 30 mV em pH 5,5, possibilitando a contribuição da eletromigração durante a iontoforese na pele. Nos experimentos realizados em carcinoma de células escamosas observou-se que a complexação com o PAMAM aumentou a localização da PpIX na mitocôndria quando comparada a PpIX livre. Além disso, a complexação não alterou a produção de *O_2 da PpIX quando irradiada. Nos experimentos *in vivo*, em pele sadia verificou-se que a pele tratada com o complexo PpIX-PAMAM apresentou fluorescência característica da PpIX homoganeamente distribuída, enquanto que a administração da PpIX livre levou à fluorescência localizada em apenas algumas área da superfície da pele. A administração passiva e iontoforética do complexo PpIX-PAMAM possibilitou a penetração cutânea da PpIX. No entanto, a iontoforese desses complexos facilitou a penetração da PpIX para as camadas mais profundas da pele. Finalmente, a administração tópica dos complexos nos tumores cutâneos por apenas 30 min possibilitou a penetração da PpIX até os tumores localizados abaixo da pele, em concentrações semelhantes para a aplicação passiva e iontoforética. Conclui-se, portanto, que a complexação da PpIX com o PAMAM é um sistema de liberação promissor para o tratamento tópico de tumores cutâneos.

6 Referências Bibliográficas

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - (ANVISA). **RE nº 899**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 29 maio 2003.
- AKINS, D. L., ZHU, H., AND GUA, C. Aggregation of Tetraaryl-substituted Porphyrins in Homogeneous Solution. **J. Phys. Chem.** p 5420-5425. 2006

ALBERTAZZI, L., SERRESI, M., ALBANESE, A., BELTRAM, F. Dendrimer Internalization and Intracellular Trafficking in Living Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 3, p. 680-688, 2010.

ALVAREZ-ROMAM, R., NAIK, A., KALIA, Y. N., FESSI, H., GUY, R. H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58, p. 301-316, 2004.

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Ribeirão Preto – SP). Araújo, L.M.P.C.; Taveira, S.F.; Santana, D.C.A.S.; Emery, F.S., Lopez, R.F.V. **Complexo Dendrímico – Substância Fotossensibilizante, Composição Compreendendo o Referido Complexo, Uso do Complexo e Kit**, BR 10 2012 002494 2, 6 dez. 2012.

ARAÚJO, L. M. P. C. **Dendrímeros como Carreadores da PpIX para a Terapia do Câncer de Pele**. 2010. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

ARAÚJO, L. M. P. C., TAVEIRA, S. F. and LPOEZ, R. F. V. **Antitumoral photocytotoxic activity of Polyamidoamine dendrimers/ Protoporphyrin IX complexes**, Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, v. 36, 2009

ARAÚJO, L.M.P.C.; LOPEZ, R.F.V. Effect of polyamidoamine dendrimer in solubility of protoporphyrin IX for topical photodynamic therapy. In: **Perspectives in Percutaneous Permeation Conference, La Grande Motte. Eleventh International Perspectives in Percutaneous Permeation Conference**, v. 11, 2008.

BRONSHTEIN I, AULOVA S, JUZENIENE A, IANI V, MA LW, SMITH KM, MALIK Z, MOAN J, EHRENBURG B. In Vitro and In Vivo Photosensitization by

Protoporphyrins Possessing Different Lipophilicities and Vertical Localization in the Membrane. **Photochem Photobiol.**, 2006, in press.

BROWN S.B., SHILLCOCK M. and JONES P. Equilibrium and Kinetic Studies of the Aggregation of Porphyrins in Aqueous Solution. **Biochem J** 153: pp 279-285, 1976.

CAMPBELL, C. S.J.; CONTRERAS-ROJAS, L. R.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. **Journal of Controlled Release**, 162, p. 201–207, 2012.

CASAS, A., BATTAH, S., DI VENOSA, G., DOBBIN, P., RODRIGUEZ, L., FUKUDA, H., BATLLE, A., MACROBERT, A. J. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, 135, p. 136–143, 2009.

CAMPOS, L.M.P.; LOPEZ, R.F.V. Topical delivery of 5-ALA for photodynamic therapy (PDT) using microemulsion delivery system. In Proceed. AAPS, 2006.

CATERINA AM LA PORTA. Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy. In: TAVEIRA, S. F. AND LOPEZ, R. F. V. (Org.) **Topical Administration of Anticancer Drugs for Skin Cancer Treatment**. Croatia. Ed. 1, 2011, p. 247-27.

CEVC, G., VIER, U Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, 141, p. 277–299, 2010.

CHAUHAN, A.S., et al., Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. **J. Controll.Release**. v. 90, p. 335-343, 2003

CHOUDHARY, S., TANG, J., ELSAIE, M. L., NOURI, K. Lasers in the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. **Dermatologic Surgery**. v. 37, p. 409–425, 2011.

CHURCH, A.L.; BARZA, M.; BAUM, J. An improved apparatus for transscleral iontophoresis of gentamicin. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 33(13), p. 3543-5, 1992.

DAI, T.; FUCHS, B.B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C; DENIS, T. G. S.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R., TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in microbiology**. V. 3, 120, p. 1-16, april 2012.

DE ROSA, F.S.; MARCHETTIA, J.M.; THOMAZINIB, J.A., TEDESCOC, A.C.; BENTLEYA, M.V.L.B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **Journal of Controlled Release**, v.65, p. 359–366, 2000.

DE ROSA, F.S; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J.M.; ROTTA, J.C.G.; BENTLEY, M.V.L.B. In vitro skin permeation and retention of 5- 17 aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **J. Control. Release**, v.89, p.261-269, 2003.

DI VENOSA, G.; HERMIDA, L.; FUKUDA, H.; DEFAIN, M. V.; RODRIGUEZ, L.; MAMONEA, L.; MACROBERT, A.; CASAS, A.; BATLLE, A. Comparation of liposomal formulations of ALA Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 96, p. 152–158, 2009.

DIETEL, W.; BOLSEN, K.; DICKSON, E.; FRITSCH, C.; POTTIER, R.; WENDENBURG, R. Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology** v. 33, p. 225-231, 1996.

DONNELLY, R.F.; MA, L-W.; JUSENAS, P.; IANI, V.; MCCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; MOAN J. Topical Bioadhesive Patch Systems Enhance

Selectivity of Protoporphyrin IX Accumulation. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p. 670-675, 2006.

DOUGHERTY T.J., KAUFMAN J. E., GOLDFARB A., WEISHAUP T. K. R., BOYLE D. and MITTLEMAN A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Res** 38: pp 2628-2635, 1978

DUCAN, R.; IZZO, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, p. 2215– 2237, 2005

DUTET, J.; DELGADO-CHARRO, M. B. In vivo transungual iontophoresis: Effect of DC current application on ionic transport and on transonychial water loss. **Journal of Controlled Release**, 140, p. 117–125, 2009.

ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discov. Today** . v.6 , p. 427–436, 2001.

FANG, Y.P., HUANG, Y.B., CHU WUA, P.C., TSAI, Y.H. Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 73, p. 391–398, 2009.

FANG, Y.P.; TSAI, Y.H.; WU P.CH.; HUANG, Y.B. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 144–152, 2008.

FDA, Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2011.

FELICIO LBA, FERREIRA J, BENTLEY MVB, BAGNATO VS, TEDESCO AC, SOUZA CS. A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulinico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. **An Bras Dermatol.**, v.83, n. 4, p. 309-316, 2008.

FERREIRA, J. Análise da **Necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica – estudo in vivo** 2003, 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

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

GELFUSO, G. M.; FIGUEIREDO, F. V.; GRATIERI, T. ; LOPEZ, R. F. V. The effects of pH and ionic strenght on topical delivery of a negatively charged porphyrin (TPPS4). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 4249-4257, 2008.

GRATIERI, T., GELFUSO, G. M., LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética in vitro e in vivo**. 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Portal do INCA, 2012. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 12 mar. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer**. Portal do INCA, 2003. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em 27 ag. 2013.

IINUMA, S.; FARSHI, S.S.; ORTEL, B.; HASAN, T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. **Br. J. Cancer**, v. 70, p. 21-28, 1994.

JICHLINSKI P.; MIZERET J.; FORRER M.; WAGNIÈRE G.; VAN DEN BERGH H.; SCHMIDLIN F.; GRABER P.; LEISINGER H.J. Superficial bladder tumors. Pathological and clinical review and presentation of a new diagnostic method: fluorescence photodetection of transitional epithelial carcinomas based on protoporphyrin IX induction with delta-aminolevulinic acid (5-ALA). **Rev Med Suisse Romande**. 115, (3):233-7, 1995.

JI, Z.; YANG, G.; VASOVIC, V.; CUNDERLIKOVA, B.; SUO, Z.; NESLAND, J. M.; PENG, Q. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 84, p. 213-220, 2006

JI, Z., et al., Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 84, p. 213-220, 2006.

KARNS G.A., CALLAGHER W. A. and ELLIOT W. B. Dimerization Constants of Water-Soluble Porphyrins in Aqueous Alkali. **Bioorg Chem** 8: pp 69-81, 1979.

KAROLCZAK, K.; ROZALSKA, S.; WIECZOREK, M.; LABIENIEC-WATALA, M.; WATALA, C. Poly(amido)amine dendrimers generation 4.0 (PAMAM G4) reduce blood hyperglycaemia and restore impaired blood–brain barrier permeability in

streptozotocin diabetes in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, 436, p. 508– 518, 2012.

KASPER, J. C. and FRIESS, W., The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 78, p. 248–263, 2011.

KASZUBA, M.; CONNAH, M.; MATTISON, K. High concentration particle size measurements using dynamic light scattering. **Mattison LabPlus international**, sept 2004.

KENNEASTE, D. G. Introduction to Skin Cancer. **Oral Maxillofacial Surg Clin** 17, p. 133-142, 2005.

KHAING OO, M. K.; YANG, Y.; HU, Y; GOMEZ, M.; DU, H.; WANG, H. Gold Nanoparticle-Enhanced and Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species from Protoporphyrin IX. **ACS**. vol. 6, n. 3, p. 1939–1947, 2012.

KITCHENS, K. et al., Transepithelial and endothelial transport of poly(amidoamine) dendrimers. **Adv. Drug Del. Rev.** v. 57, p. 2163-2176, 2005.

KUBAT P., LANG K., JANDA P. and ANZENBACHER P., JR. Interaction of Porphyrins With a Dendrimer Template: Self-Aggregation Controlled by PH. **Langmuir** 21: pp 9714-9720, 2005.

LAM, M., OLEINICK, N. L., NIEMINEN, A-L. Photodynamic Therapy-induced Apoptosis in Epidermoid Carcinoma Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47379–47386, 2001.

LANGA, K.; BOLSENA, K.; STAHLB, W.; RUZICKAA, T.; SIESB, P.L.; FRITSCH, C. The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and

malignant cells of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 65, p. 29-34, 2001.

LIU, M., FRÉCHET, J. M. J. Designing dendrimers for drug delivery. **PSTT** v. 2, n. 10 p. 393-401, oct 1999.

LIU, Y.; CHEN, W.; WANG, S.; JOLY, A. G. Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. **Appl. Phys. Lett.** 92, 043901, 2008.

LOPEZ, R. F. V. ; BENTLEY, M. V. L. B. ; DELGADOCHARRO, M. B. ; SALOMON, D. ; BERGH, H Van Den ; LANGE, N. ; GUY, R. H. . Enhanced delivery of 5-Aminolevulinic Acid Esters by iontophoresis in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 3, p. 304-308, 2003a.

LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADOCHARRO, M. B. ; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 18, n. 3, p. 311-315, 2001.

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

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

MELO T.B. and REISAETER G. The Physicochemical State of Protoporphyrin IX in Aqueous Solution Investigated by Fluorescence and Light Scattering. **Biophys Chem** 25: pp 99-104, 1986.

MINTZER, M. A.; GRINSTAFF M. W.; Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. **Chem Soc Rev**, 40, p. 173–190, 2011.

MIZUTANI, K.; WATANABE, D.; AKITA, Y.; AKIMOTO, M.; TAMADA, Y.; MATSUMOTO, Y. Photodynamic therapy using direct-current pulsed iontophoresis for 5-aminolevulinic acid application. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 25, p. 280–282, 2009.

MOAN, J.; BERG, K.. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem. Photobiol**, 53, p. 543-553, 1991.

MONTANARI, M.L.C., MONTANARI, C.A.; VELOSO, D.P. Sistemas transportadores de drogas. **Quim. Nova**, v.21, n.4, 1998.

MORTON, C. A., BROWN, B. S., COLLINS, S., IBBOTSON S. I., JENKINSON, H., KURWA, H., LANGMACK, K., KENNA, K. M., MOSELEY, H., PEARSE, A. D., STRINGER, M., TAYLOR, D. K., WONG, G., RHODES, L. E., Guidelines for topical photodynamic therapy: report of workshop of the British Photodermatology group. **British Journal of Dermatology**, 146, p. 552-567, 2002.

MORTON, C.A., McKENNA, K. E., RHODES, L. E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **British Journal of Dermatology**, 159, p. 1245-1266, 2008.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50, p. 161-177, 2000.

MURTHY, K.S.; TALIM, S.T.; SINGH, I. A comparative evaluation of topical application and iontophoresis of sodium fluoride for desensitization of hypersensitive dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 36, n. 3, p. 448-58, 1973.

NAJLAH, M and D'EMANUELE, A. Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, p. 522–527, 2006.

NAWALANYA, K.; RUSINC, A.; KEPCZYNSKIA, M.; FILIPCZAKC, P.; KUMOREKA, M.; KOZIKA, B.; WEITMAND, H.; EHRENBEGD, B.; KRAWCZYKC, Z.; NOWAKOWSKAA, M. Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: In vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**, 430, p. 129– 140, 2012

NANJWADE, B. K., BECHRA, H. M., DERKAR, G. K., MANVI, F. V., NANJWADE, V. K. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** V. 38, p.185–196, 2009.

NAIR, A.B.; KIM, H.D.; CHAKRABORTY, B.; SINGH, J.; ZAMAN, M.; GUPTA, A.; FRIDEN, P.M.; MURTHY, S.N. Ungual and trans-ungual iontophoretic delivery of terbinafine for the treatment of onychomycosis. **J Pharm Sci.**, v. 98, n. 11, p. 4130-40, 2009.

NISHIYAMA, N., STAPERT H. R., ZHANG, G. D., TAKASU, D., JIANG, D. L., NAGANO, T., AIDA, T., KATAOKA, K. Light-Harvesting Ionic Dendrimer Porphyrins as New Photosensitizers for Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Bioconjugate Chem**, 14, p. 58-66, 2003.

OSUNA, B.; VARELL, H. Potential of dendrimers as drug carries in ophthalmology. **Arch Soc Esp Oftalmol**, v.82, p. 69-70, 2007.

PATRI, A. K., MAJOROS, I. J., BAKER, J. R. J. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology** 6, p. 466–471, 2002.

PERUMAL, O. P., INAPAGOLLA, R., KANNAN, S., KANNAN, R. M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. **Biomaterials**, 29 p. 3469–3476, 2008.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med Sci** v.24, p. 259–268, 2009.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 63, p. 470–491, 2011.

PUBCHEM. **Compound PpIX.** Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=4971>> Acesso em 07 out. 2013.

PUBCHEM. **Compound Aminolevulinic Acid.** Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=137>> Acesso em 07 out. 2013.

RICCHELLI, F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 109 – 118, 1995.

RICCHELLI, F.; GOBBO, S.; MORENO, G.; SALET, C.; BRANCALEON, L.; MAZZINI, A. Photophysical properties of porphyrin planar aggregates in liposomes. **Eur. J. Biochem**, v. 253, p. 760 – 765, 1998.

ROBERTS DJ; CAIRNDUFF F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **Br J Plast Surg**.48, 6 p. 360-70, 1995.

ROSSI, L. M., SILVA, P. R., VONO, L. R., FERNANDES, A. U., TADA, D. B., BAPTISTA, M. S. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. **Langmuir**, 24, p. 12534-12538, 2008.

SAOVAPAKHIRAN, A., D'EMANUELE, A., ATTWOOD, D., PENNY, J. Surface Modification of PAMAM Dendrimers Modulates the Mechanism of Cellular Internalization. **Bioconjugate Chem.**, 20, p. 693–7.

SEARLES, J.A., CARPENTER, J.F., RANDOLPH, T.W., The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature-Controlled Shelf. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 860-871, 2001.

SIMON, V.; DEVAUX, C; DARMON, A.; DONNET, T.; THIE'NOT, E.; GERMAIN¹, M.; HONNORAT, J.; DUVAL, A; POTTIER, A.; BORGHI, E.; LEVY, L.; MARILL, J. Pp IX Silica Nanoparticles Demonstrate Differential Interactions with In Vitro Tumor Cell Lines and In Vivo Mouse Models of Human Cancers. **Photochemistry and Photobiology**, 86, p. 213–222, 2010.

SHCHARBIN D., KLAJNERT B. and BRYSZEWSKA M. The Effect of PAMAM Dendrimers on Human and Bovine Serum Albumin at Different PH and NaCl Concentrations. **J Biomater Sci Polym Ed** 16: pp 1081-1093, 2005

SOUZA, J. G. **Iontoforese *in vitro* e *in vivo* de uma ftalocianina de zinco aniônica em tecidos sadios e tumores induzidos para a terapia fotodinâmica de tumores cutâneos**. 2010. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SOUZA, J. G.; GELFUSO, G. M.; SIMÃO, P. S.; BORGES, A. C.; LOPEZ, R. F. V. Iontophoretic transport of phthalocyanine tetrasulphonic acid as a tool to improve drug topical delivery. **Anticancer Drugs**, 22(8), p. 783-93, 2011.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 71, p. 445–462, 2009.

SVENSON, S.; TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, p. 2016-2129, 2005.

TADA, D. B.; VONO, L. L. R.; DUARTE, E. L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P. K.; BAPTISTA, M. S.; ROSSI, L. M.; Methylene Blue-Containing Silica-Coated Magnetic Particles: A Potential Magnetic Carrier for Photodynamic Therapy. **Langmuir** 23, p. 8194-8199, 2007.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p. 35-40, 2009.

TOMALIA, D.A., NAYLOR, A.M.; GODDARD III, W.A. Starburst dendrimers. Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 29, p. 138– 175, 1990.

TOMALIA, D.A. Dendrimer molecules, **Sci. Am.** v.272 p. 62–66, 1995.

VANDAMME, TH. F., BRODECK, L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. **Journal of Controlled Release**, 102, p. 23–38, 2005.

VAN DEN AKKER, J.T.H.M.; IANI, V.; STAR, W.M.; STERENBORG, H.J.C.M.; MOAN, J. Systemic Component of Protoporphyrin IX Production in Nude Mouse Skin upon Topical Application of Aminolevulinic Acid Depends on the Application Conditions. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, n.2, p. 172-177, 2002.

VAN DEN BERGH, H. On the evolution of some endoscopic light delivery systems for photodynamic therapy. **Endoscopy**, v. 30, n. 4, p. 392 – 407, 1998.

VENOSA, G. D.; HERMIDA, L.; FUKUDA, H.; DEFAIN, M. V.; RODRIGUEZ, L.; MAMONE, L.; MACROBERT, A.; CASAS, A.; BATLLE, A. Comparison of liposomal formulations of ALA Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 96, p. 152-158, 2009.

VENUGANTI, V.V.K.; PERUMAL, O.P. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 230-238, 2008.

VENUGANTI, V. V. K., PERUMAL, O. P. Poly(amidoamine) Dendrimers as Skin Penetration Enhancers: Influence of Charge, Generation, and Concentration. **Journal fo Pharmaceutical Sceince**, v. 98, 7, p. 2345-2356, 2009.

VENUGANTI, V. V.; SAHDEV, P.; HILDRETH, M.; GUAN, X.; PERUMAL, O. Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers. **Pharm Res**, 28, p. 2246–2260, 2011.

YANO, S., HIROHARA, S., OBATA, M., HAGIYA, Y., OGURA, S., IKEDA, A., KATAOKA, H., TANAKA, M., JOH, T., Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, 12, p. 46-67, 2011.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Prog Retin Eye Res.**, v. 23, n. 3, p. 253-81, 2004.

YOO H. and JULIANO R. L. Enchance Delivery of Antisense Oligonucleotídeos With Fluorophore-Conjugated PAMAM Dendrimer. **Nucleic Acids Res** 28, p 4225-4231, 2000.

WANG, X.; WANG, P.; TONG, W.; LIU, Q.. Comparison of pharmacokinetics, intracellular localization and sonodynamic efficacy of endogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. **Ultrasonics**, 50, p. 803-810, 2010.

WANG, Y.; THAKUR, R.; FAN, Q.; MICHNIAK, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdrmal iontophoretic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 60, p. 179-191, 2005.

WU, S., DA XING. Mechanism of mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis under Photofrin-mediated photodynamic therapy. **Journal of X-Ray Science and Technology**, 20, p. 363–372, 2012.

ZHAO, B., HE, Y., Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. **Expert Rev Anticancer Ther**, 10(11), p. 1797-1809, 2010.

ZHANG, L-W., AL-SUWAYEH, S. A.; HUNG, C-F, CHEN, C-C; FANG, J-Y. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions, **International Journal of Nanomedicine**, 6, p. 693–704, 2011.