UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX para a terapia
fotodinâmica tópica do câncer de pele**

Luciana Mattoso Pires de Campos Araújo

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX para a terapia
fotodinâmica tópica do câncer de pele**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Luciana Mattoso Pires de Campos Araújo

Orientadora: Renata Fonseca Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2010

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.

Araújo, Luciana Mattoso Pires de Campos

Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX para a terapia fotodinâmica tópica do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2010.

149 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna.

1. protoporfirina IX. 2. dendrímero. 3. iontoforese. 4. terapia fotodinâmica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Luciana Mattoso Pires de Campos Araújo

Título do trabalho: Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX para a terapia fotodinâmica tópica do câncer de pele.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador(a): Renata Fonseca Vianna
Lopez

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Renato e Ana Luiza que estiveram sempre presentes, me incentivaram e apoiaram neste caminho. Obrigada pela oportunidade de realizar mais esta conquista.

Aos meus irmãos Renatinho e Tatiana pela amizade, incentivo, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Renata Fonseca Vianna Lopez pelo carinho, paciência , dedicação e exemplo de amor a pesquisa.

Ao meu grande amor, Carlos , sempre tão presente, me ajudou e dividiu comigo momentos felizes, difíceis e decisivos. Obrigado por encher minha vida de alegria.

À minha pequena Letícia, que chegou durante a realização deste trabalho,
meu maior e melhor presente.

AGRADECIMENTOS

As amigas Danielle e Stephânia que trabalharam muito comigo durante toda esta etapa e tornaram este trabalho muito mais divertidos, vocês fizeram falta no laboratório.

À Patricia e ao Joel, amigos que ganhei no fim desta etapa, vocês me ajudaram muito na finalização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Danielle, Deise, Fábio, Franciane, Guilherme, Koréa, Priscila, Stephânia, Taís, Thaís pela agradável convivência no laboratório ao longo desse período.

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery da FCFRP-USP pela valiosa contribuição neste trabalho.

Ao Prof^a. Dr^a. Sofia Nikolau da FCFRP-USP pela colaboração nas análises de RMN.

Ao Prof. Carlos Curti da FCFRP-USP pela colaboração nas análises fluorimétricas.

Ao Prof. Dr. Pietro Cincaglini pela colaboração nas análises de DSC.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas por se tornar meu responsável na FAPESP no último ano deste trabalho.

Ao funcionário José Orestes do Departamento de Farmacotécnica da FCFRP-USP pela valiosa contribuição nas análises de tamanho de partícula.

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

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca e as funcionárias Ana Lúcia, Eleni e Rosana pela colaboração e trabalho prestado.

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

RESUMO

ARAÚJO, L.M.P.C. **Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX na terapia fotodinâmica tópica do câncer de pele.** 2010. 149f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A protoporfirina IX (PpIX) é uma substância fotodinamicamente ativa, entretanto, devido a sua alta lipofilia apresenta dificuldades para penetrar nas camadas mais profundas da pele, não sendo administrada topicamente. Assim, o objetivo deste trabalho é estudar a influência de diferentes tipos de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) na solubilidade, penetração cutânea e penetração celular da PpIX com o intuito de melhorar a terapia fotodinâmica tópica (TFD) com esta substância. Os estudos de solubilidade da PpIX na presença dos dendrímeros PAMAM G4, G4.5 e G4-OH mostraram que o dendrímero PAMAM G4.5, foi o que solubilizou a maior quantidade de PpIX seguido do PAMAM-OH G4 > PAMAM G4 > tampão HEPES. A partir dos estudos de solubilidade foi possível identificar que a PpIX na presença dos dendrímeros PAMAM G-4.5 e G4-OH apresentam diagramas de solubilidade tipo B_S e B_I quando na presença do PAMAM G4. Os estudos de varredura em espectroscopia UV-VIS e fluorescência indicaram a presença de agregados principalmente nos complexos PpIX-PAMAM G-4.5 obtidos. Os complexos solúveis PpIX-PAMAM G4-OH apresentaram tamanho médio de 13,2 nm, e potencial zeta de -3,41. Já os complexos com o dendrímero PAMAM G-4.5 apresentaram uma população bidispersa, com tamanhos de 31 e 391 nm e um potencial zeta de -17,3. A análise de DSC e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier mostraram alterações nas características da PpIX em solução e quando complexada com os dendrímeros. Nos estudos de permeação e retenção cutânea passiva com os complexos contendo 0,006 mg/mL de PpIX, estes não aumentaram a penetração cutânea do fármaco. No entanto, a complexação permitiu que maiores quantidades de PpIX ficassem disponíveis na solução doadora, e um aumento significativo na penetração da PpIX foi observado quando experimentos com 1 mg/mL de PpIX complexada foram conduzidos; ademais notou-se uma possível ação promotora do dendrímero PAMAM G4-OH. Nos estudos de iontoforese verificou-se que a corrente elétrica não aumentou a penetração da PpIX em relação aos experimentos passivos quando o complexo PpIX-PAMAM G4.5 foi estudado, provavelmente devido a maior liberação da PpIX do complexo na presença da corrente elétrica, aumentando os agregados que são grandes o suficientes para não penetrar na pele. Por outro lado, a iontoforese anódica aumentou a penetração do complexo PpIX-PAMAM G4-OH por eletrosmose até as camadas mais profundas da pele, levando a PpIX inclusive até a solução receptora. Os estudos de cultura de células tumorais confirmaram a capacidade dos dendrímeros em aumentar a penetração da PpIX através de membrana. A complexação melhorou a distribuição da PpIX no interior das células e aumentou significativamente a fotocitotoxicidade desta porfirina.

Palavras chave: sistema de liberação, dendrímero, protoporfirina IX, iontoforese, terapia fotodinâmica tópica .

ABSTRACT

ARAÚJO, L.M.P.C. **Dendrimers as drug carriers for protoporphyrin IX to topical photodynamic therapy of skin cancer.** 2010. 149f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Protoporphyrin IX (PpIX) is a photodynamic active drug that is not topically administered due to its high lipophilicity and consequent low penetration in deep skin layers. The aim of this work is to study the influence of different types of polyamidoamine dendrimers (PAMAM) in PpIX solubility, skin and cell penetration to enhance topical photodynamic therapy (PDT). The solubility studies of PpIX in the presence of PAMAM dendrimers G4, G4.5 and G4-OH demonstrated that the G4.5 solubilized the greatest amount of PpIX, followed by PAMAM G4-OH > PAMAM G4 > HEPES buffer. Solubility studies showed that the PpIX in the presence of PAMAM dendrimers G-4.5 and G4-OH presented solubility diagrams of BS type, and BI type in the presence of PAMAM G4. Studies of scanning UV-VIS and fluorescence indicated the presence of aggregates mainly in PpIX-PAMAM G-4.5 solution. The PpIX-PAMAM G4-OH complexes showed a mean size of 13.2 nm and zeta potential of -3.41; the complexes with PAMAM dendrimer G-4.5 had a bi-dispersed population, with sizes of 31 and 391 nm and a zeta potential of -17.3. The analysis of DSC and Fourier transform infrared Fourier showed changes in the characteristics of PpIX when it was complexed with the dendrimers. Passive skin permeation and retention studies with the complexes containing 0.006 mg/ml PpIX had not increased PpIX penetration, however, the complexation allowed greater amounts of PpIX to become available in the donor solution, and experiments with 1 mg/mL of PpIX increased significantly the penetration of the drug. Moreover, dendrimer PAMAM G4-OH seemed to act as a penetration enhancer. Iontophoresis did not increase skin penetration of PpIX compared to passive studies when the PpIX-PAMAM G4.5 was studied, likely because the electric current increased PpIX release from the complexes, forming aggregates large enough to not penetrate through the skin. On the other hand, anodic iontophoresis increased significantly the penetration of the PpIX-PAMAM G4-OH by eletrosmosis, spreading the drug to deep skin's layers, also reaching the receiver solution. Studies in cell culture confirmed the ability of dendrimers to increase the penetration of PpIX through the membrane. The complexation improved the distribution of PpIX within the cells and significantly increased photocytotoxic of the porphyrin.

Keywords: delivery system, dendrimer, protoporphyrin IX, iontophoresis, topical photodynamic therapy

Sumário

Introdução	2
1 Revisão da Literatura.....	5
1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	5
1.2 Porfirinas.....	6
1.3 Dendrímeros.....	9
1.4 Aplicação de iontoforese para aumentar a permeabilidade de fármacos através da pele	16
2	
2.1 Objetivos específicos	
3 Material e Métodos.....	
3.1 Material	
3.2 Métodos.....	
4 Resultados e Discussão	
4.1 Estudos de aglomeração da PpIX em solução aquosa.....	
4.2 Padronização da metodologia analítica para a quantificação da PpIX em meio aquoso por espectrofluorimetria	
4.3 Estudos de solubilidade da PpIX	
4.4 Preparo do complexo sólido PpIX-dendrímero PAMAM.....	
4.5 Caracterização dos complexos PpIX-dendrímero PAMAM	
4.6 Estudos in vitro de permeação cutânea passiva e iontoforética da PpIX em solução aquosa e presente nos complexos PpIX-PAMAM G4.5 e PpIX-PAMAM G4- OH	
4.7 Estudo da atividade antitumoral da PpIX em solução aquosa na presença e ausência de uma corrente elétrica fraca em células de carcinoma epidermal escamoso A431.....	
4.8 Estudos de localização celular da PpIX em solução e presente nos complexos PpIX-dendrímero PAMAM em células de carcinoma epidermal escamoso (A 431).	
5 Conclusão.....	25
6 Referências Bibliográficas.....	27

Introdução

A administração de fármacos através da pele vem despertando cada vez mais o interesse das indústrias farmacêuticas devido às diversas vantagens que apresenta. O fármaco veiculado na pele pode ter ação tópica ou transdérmica, dependendo das características da formulação. Os novos sistemas de liberação de fármacos, como conjugados poliméricos, micro e nanoemulsões, lipossomas, cristais líquidos, sistemas micro e nanoparticulados, emulsões múltiplas, entre outros, direcionam a liberação do fármaco para um local específico da pele, podendo liberá-lo lentamente (liberação sustentada), diminuindo efeitos colaterais e, muitas vezes, aumentando sua estabilidade, características essas que aumentam a eficácia das formulações cosméticas e dermatológicas (Nessem, 2001, Paolino et al., 2002). Apesar de todas essas vantagens, uma substância para atravessar a pele, e ter ação tópica ou transdérmica, deve se solubilizar e difundir-se através da camada mais externa da epiderme, o estrato córneo. Esta camada apresenta excelentes propriedades de barreira para a penetração de fármacos na pele, o que limita a liberação de um grande número de substâncias por esta via.

Várias estratégias são utilizadas para contornar essa barreira e aumentar a penetração cutânea de fármacos, dentre elas o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados, como os dendrímeros, e a aplicação de métodos físicos, como a iontoforese, devem ser considerados pois apresentam grande interesse para a pesquisa científica desde sua descoberta.

Os dendrímeros são uma classe especial de polímeros que apresentam estrutura muito ramificada e regular. Os dendrímeros de poliamidoamina ou PAMAM foram uns dos primeiros a serem sintetizados e são extensivamente estudados. Eles são polímeros líquidos ou semi-sólidos, monodispersos, ordenados e muito ramificados, que podem apresentar vários tipos de grupos funcionais periféricos como aminas, carboxílas ou hidroxilas, os quais aumentam com o número de geração (G0, G1, G2, etc.) (Vandamme e Brobeck, 2005).

Os dendrímeros de PAMAM têm apresentado potencial interesse como sistemas de liberação de fármacos. Sua arquitetura original possibilita a interação com fármacos muito ou pouco solúveis em água, formando complexos via encapsulamento molecular, com ligações covalentes e não covalentes. A alta densidade de cargas superficiais presente, devido à presença dos múltiplos grupos ionizáveis na periferia, possibilita também a interação eletrostática com diferentes fármacos. Além disso, como cada macromolécula pode interagir com várias moléculas do fármaco (dependendo dos grupos superficiais disponíveis), pode-se obter complexos com estequiometria diferente da 1:1, o que resulta em um maior aumento da solubilidade de substâncias hidrofóbicas, e pode possibilitar a melhora da penetração transdérmica delas através de mecanismo semelhante ao apresentado pelos complexos com ciclodextrinas (Chauhan, et al., 2003). Para finalizar, o controle preciso do tamanho, forma e superfície química dos dendrímeros possibilita a obtenção de nanoestruturas mimetizadoras de proteínas globulares, micelas e lipossomas (Esfand e Tomalia, 2001; Tomalia et al., 1990; DeMatti, et al, 2004 e Kitchens, et al., 2005).

Existem vários relatos na literatura de princípios ativos que tiveram sua atividade biológica melhorada ou modificada quando complexados com dendrímeros. Complexos com oligonucleotídeos, por exemplo, aumentam a entrada de ácidos nucleicos no citoplasma e no núcleo das células (Tomalia, 1995; DeMatti et al., 2004; DeLong, et al., 1997; Yoo, et al., 1999 e Yoo e Juliano, 2000). Conjugados de cisplatina, agente anti-neoplásico, com dendrímeros PAMAM, levaram a liberação lenta do fármaco, acúmulo de altas concentrações em tumores sólidos e baixa toxicidade comparada com a cisplatina livre (Malik, et al., 1999). Dendrímeros contendo grupos fotoativos para utilização na Terapia Fotodinâmica para tratamento de tumores vem sendo sintetizados por diversos autores (Azzellini e Ribeiro, 2003; Azzellini, 2000; Nishiyama, et al., 2003). Outros trabalhos recentes têm avaliado o potencial dos dendrímeros para a liberação de fármacos por via oral, ocular bem como transdérmica (Sakthivel e Toth, 1999, Vandamme e Brobeck, 2005 e Chauhan, et al., 2003).

A protoporfirina IX (PpIX) é uma substância fluorescente e fotodinamicamente ativa que absorve luz na região do ultravioleta e visível. No tratamento de tumores por terapia fotodinâmica (TFD), a PpIX acumulada nos tecidos é excitada pela presença de luz no comprimento de onda (λ) de 635 nm. Na volta para o estado fundamental, algumas moléculas de PpIX reagem com o oxigênio presente formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O $^1\text{O}_2$ assim formado parece ser o principal agente citotóxico na TFD-PpIX e é então o maior responsável pela morte do tecido em tratamento (Trepte et al., 1994). No entanto, ela não é administrada topicamente devido a sua alta lipofilia, apresentando dificuldades para penetrar na pele. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação são estratégias utilizadas na tentativa de carrear a PpIX para que esta possa atingir as camadas mais profundas da pele podendo ser utilizada na TFD tópica do câncer de pele.

1 Revisão da Literatura

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD consiste na administração de um agente fotossensibilizante, pelas vias sistêmica, tópica ou por injeção intratumoral, seguido de um período de 1-72h (dependendo da farmacocinética do agente), para que ocorra seu acúmulo no tecido tumoral. As lesões são então expostas à luz no comprimento de onda de absorção máxima do agente fotossensibilizante (Figura 1). As interações fotoquímicas entre este, a luz e o oxigênio molecular produzem oxigênio singleto citotóxico e outras formas de oxigênio ativo, como peróxido, radicais hidroxilas e ions superóxidos, resultando em danos para as organelas presentes nas células tumorais, o que elimina o tumor. Os principais sítios atingidos pela TFD são organelas membranosas, como mitocôndrias, lisossomos e membrana citoplasmática (Dahle et al., 1999; Rogers et al., 1991; West, 1989). Desta forma, a necrose do tumor pela TFD é gerada pela combinação da morte celular direta, oclusão da irrigação sanguínea na área e uma reação inflamatória aguda (Vrouenraets et al., 2000).

Figura 1: Terapia Fotodinâmica tópica. A) região de câncer de pele, B) aplicação do agente fotossensibilizante, C) acúmulo do fármaco no tecido tumoral e D) exposição à luz no comprimento de onda de absorção máxima do agente fotossensibilizante (adaptada de <http://www.photocure.com> - 12/07/2006).

A TFD afeta apenas as áreas irradiadas, já que o oxigênio singleto possui tempo de meia vida curto, realizando um tratamento sítio específico e não invasivo.

A eficiência da TFD é afetada por vários fatores, incluindo propriedades físico-químicas do fotossensibilizador, comprimento de onda da luz de ativação, profundidade da penetração do feixe de luz no tecido biológico, resposta do tecido ao oxigênio singleto, entre outros (Moan et al., 1992).

Derivados de porfirinas têm sido estudados por décadas como poderosos fotossensibilizantes. Um deles, o Photofrin[®], já foi aprovado para uso clínico (Detty et al., 2004).

1.2 Porfirinas

As porfirinas (Pp) são uma classe de tetrapirróis que tem atraído a atenção dos pesquisadores de todo o mundo devido a sua extensiva aplicação como agente fotossensibilizante (Peng et al., 1997). As espécies de porfirina IX como as deuteroporfirinas, hematoporfirina IX, derivados de hematoporfirina, mesiporfirina IX e a protoporfirina IX (PpIX) são amplamente utilizadas como fotossensibilizadores na TFD para o tratamento de câncer (Dougherty, 1989).

As propriedades funcionais das porfirinas estão diretamente relacionadas à sua estrutura e as suas características físico-químicas. As Pp são substâncias lipofílicas que na presença de água tendem a formar agregados. Estes agregados interferem na sua reatividade biológica, bem como na sua ação fotodinâmica (Melo e Reisaeter, 1986; Dougherty et al., 1978; Moan et al., 1980; Kessel e Kohn, 1980) e nas ligações com as proteínas (Morgan et al., 1980). O aumento da concentração de Pp em uma solução aquosa leva a um deslocamento do equilíbrio de estruturas monômero-dímero, levando a um aumento de dímeros nesta solução. Karns et al. (1979) observaram mudanças na forma da banda de absorção Soret das porfirinas na presença de seus dímeros (Karns et al., 1979). Brown et al. (1976) e Melo e Reisaeter (1986) sugeriram que a formação de micelas também pode ocorrer com muitas porfirinas em solução aquosa quando presentes em altas concentrações. Esta conclusão foi baseada na observação de mudanças

súbitas na posição dos picos de absorção Soret de algumas porfirinas com o aumento da concentração acima do ponto crítico. Abaixo da concentração crítica para formação de micelas um equilíbrio simples de monômero-dímero é proposto (Melo e Reisaeter, 1986; Brown et al., 1976).

Os agregados das porfirinas assumem estruturas que podem ser classificadas como tipo J- ou H-, de acordo com a orientação induzida pelas transações dipolo dos constituintes da molécula, podendo ser “cabeça-cauda” (tipo J-) ou “cabeça-cabeça” (tipo H-) como pode ser observado na Figura 2 (Kubat et al., 2005; Akins et al., 2006). As posições da banda Soret nos espectros de UV-vis indicam qual o tipo de agregado formado. Sendo assim, quando são formados agregados co-faciais (tipo H-) a banda Soret é deslocada para o azul. Agregados “extremidade com extremidade” (agregados J-) desloca esta banda para a região do vermelho em relação à absorbância do monômero (Kubat et al., 2005).

Figura 2: Esquema dos arranjos das unidades monoméricas de porfirina, (a) dímeros H ($\alpha = 90^\circ$), (b) dímeros J ($\alpha = 0^\circ$) e (c) forte acoplamento das unidades de porfirina formando agregado J, (Kubat et al., 2005).

A formação dos agregados de porfirina em soluções aquosas é afetada pela estrutura e substituição das respectivas porfirinas, pela força iônica, temperatura e pH da solução (Kubat et al., 2005).

A característica lipofílica, bem como a formação dos agregados em solução aquosa dificulta a aplicação tópica das porfirinas na TFD. Assim, a procura por sistemas carreadores que possibilitem a administração destes fotossensibilizantes

bem como evite a formação dos agregados em soluções aquosa tem sido de interesse para o avanço na TFD.

É importante salientar que o fármaco mais utilizado na TFD não é uma porfirina, e sim um precursor da protoporfirina IX (PpIX), o ácido 5-aminolevulínico (ALA). O 5-ALA após administração é enzimaticamente convertido em PpIX, uma molécula fotossensível e precursora do heme em sua via biossintética. O 5-ALA é o primeiro intermediário no ciclo do heme. É formado na mitocôndria pela condensação de glicina e succinil CoA, pela ação da enzima ALA-sintase. Após várias reações, ocorre a formação da PpIX a qual é convertida em heme pela enzima ferroquelatase na presença de ferro. Normalmente a produção de 5-ALA é controlada por mecanismo de “feedback” negativo, neste a presença do heme livre inibe sua síntese (Divaris et al., 1990; Kennedy & Pottier, 1992 e Szeimies et al., 1996). Assim, um excesso de 5-ALA administrado desvia o mecanismo de controle deste “feedback” negativo, resultando em um acúmulo intracelular de PpIX (Lopez et al., 2004). Como a conversão de PpIX em heme é um processo relativamente lento nas células tumorais, os tecidos cancerosos acumulam PpIX em concentrações fotossensibilizantes (Divaris et al., 1990; Wolf e Kerl, 1995; Dietel et al., 1996 e Szeimies et al., 1996). Desta forma, seria muito mais fácil a administração direta da PpIX para que não seja necessário todos esses passos de penetração cutânea e conversão do precursor pela célula no agente fotossensibilizante. No entanto a PpIX não é administrada topicamente devido a sua alta lipofilia, apresentando dificuldades para penetrar na pele. Outra barreira encontrada para o uso direto da PpIX foi relatado em estudos realizados em cultura de células por Ji et al, 2006 e Bronshtein et al., 2006. Esses autores observaram que esta, quando 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 apresentando uma maior efetividade da TFD. Acredita-se que o uso de sistemas de liberação contendo PpIX possam aumentar a solubilidade em água da PpIX, melhorando sua penetração na pele bem como alterando sua distribuição celular.

1.3 Dendrímeros

Os dendrímeros são uma classe especial de polímeros que apresentam estruturas muito ramificadas e regulares. Os dendrímeros de poliamidoamina ou PAMAMs (Figura 3) foram uns dos primeiros a serem sintetizados e são muito estudados. Estes dendrímeros têm apresentado potencial interesse como sistemas de liberação de fármacos.

Figura 3: Representação gráfica de dendrímeros PAMAM do núcleo a geração 4 (Svenson e Tomalia, 2005).

As estruturas dendríticas são chamadas de “moléculas em cascata”, e foram primeiramente relatadas por Vögtl e colaboradores (Buhleier et al., 1978). Mais tarde, o desenvolvimento das estruturas destas moléculas em conjunto com técnicas sintéticas deu origem às grandes estruturas dendríticas (Boas e Heegaard, 2004), e esta classe de moléculas foi denominada dendrímeros ou polímero em cascata. A palavra dendrímero tem origem grega “dendron” e “meros” que significam “árvore” e “parte”, respectivamente (Dykes, 2011).

Os dendrímeros são, apesar do seu tamanho molecular grande, estruturas bem definidas, com baixa polidispersividade quando comparado aos polímeros tradicionais. A nível molecular os dendrímeros ramificados resultam em estruturas semiglobulares ou globulares, na maioria das vezes com alta densidade funcional na superfície. As altas gerações dos dendrímeros ocupam um volume hidrodinâmico menor em relação aos polímeros lineares. No entanto, comparados às proteínas globulares, os dendrímeros apresentam um alto volume hidrodinâmico.

As estruturas dendríticas são caracterizadas por “camadas” entre cada ponto focal chamado de geração, como pode ser observado nos círculos da Figura 4.

Figura 4: Determinação das gerações de um dendrímero comercial de PAMAM (Starbust[®]): (A) Dendrímero de poliamidoamina (G3), (B) Dendrímero poliamidoamina G5 (Boas e Heegaard, 2004).

O número da geração é definido pelo número de pontos focais que vão do núcleo a superfície. O núcleo é muitas vezes denominado geração 0 (G0) não apresentando ramificações. Nos dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) os compostos intermediários possuem grupos superficiais carboxilatos, os quais são denominados dendrímeros de meia geração, por exemplo, G 1.5, G 2.5 (Figura 4).

1.3.1 Estrutura dos dendrímeros e propriedades intrínsecas dos compartimentos

As estruturas dos dendrímeros crescem conforme os compartimentos surgem, e podem ser divididas em três partes:

- Superfície multivalente com um alto número de sítios reativos em potencial;
- Ramificações ou “casca exterior” logo abaixo da superfície que são bem definidas e protegidas pela superfície externa do dendrímero;

- Núcleo, o qual nas gerações altas é protegido pelas ramificações dos dendrímeros (Hawker et al., 1993).

As três partes do dendrímero podem ser adaptadas para objetivos específicos como, por exemplo, carreadores de fármacos. O interior do dendrímero é bem adequado para o encapsulamento de moléculas visitantes. As superfícies multivalentes das altas gerações dos dendrímeros podem conter um grande número de grupos funcionais. Isto torna a superfície dos dendrímeros e as ramificações mais suscetíveis a interações com um grande número de espécies.

1.3.2 Síntese química dos dendrímeros

Os dendrímeros podem ser sintetizados quimicamente por duas formas diferentes, divergente ou convergente, como mostra a Figura 5.

Figura 5: Estratégia de síntese de dendrímeros; (A) Divergente e (B) Convergente (Boas e Heegaard, 2004).

Na estratégia divergente, (Figura 5-A), os dendrímeros são sintetizados iniciando do núcleo e aumentam geração por geração. Entretanto, o alto número de reações, que são realizadas por moléculas individuais para cada ramificação, demanda transformações efetivas na molécula (~99%) o que leva a formação de deformidades na estrutura (Boas e Heegaard, 2004). A estratégia convergente

(Figura 5-B) foi uma alternativa desenvolvida por Hawker e Frechét (Hawker e Frekchet, 1990) para minimizar estes possíveis defeitos. Esta estratégia inicia pelos grupos terminais em direção ao núcleo, onde os segmentos de dendrímeros, denominados de dendrômeros, são ligados entre si. No método convergente apenas algumas reações apresentam sítios funcionalizados em cada passo, diminuindo os possíveis sítios reativos.

Cada geração do dendrímero sintetizada pelo método divergente pode ser purificada, todavia a purificação dos dendrômeros de gerações mais altas torna-se mais difícil, pois aumenta a similaridade do reagente em relação ao produto final formado. No entanto, com a purificação após cada passo desta síntese podem ser obtidos dendrímeros sem defeitos.

Pelo método convergente é possível criar estruturas dendriméricas assimétricas como, por exemplo, com a união de dois dendrômeros diferentes (Wooley et al., 1993; Boas e Heegaard, 2004).

1.3.3 Propriedades físico-químicas dos dendrímeros

Antecipadamente na história dos dendrímeros foi sugerido que a estrutura tridimensional na escala de nanômetros das altas gerações faria desta classe de moléculas sintéticas capazes de mimetizar as proteínas (Farin and Avnir, 1991). No entanto, em contraste com as proteínas, as quais consistem na “dobra” de cadeias polipeptídicas lineares, a arquitetura do interior dos dendrímeros possui uma grande extensão formada por ligações covalentes, resultando em uma estrutura um pouco menos flexível. Os dendrímeros são em média menos compactos que as proteínas e apresentam um número de grupos funcionais na superfície maior que as proteínas, mas com massa molecular semelhante (Boas e Heegaard, 2004).

Estudos da dinâmica molecular realizados por diferentes grupos de pesquisa mostraram que os dendrímeros da mesma forma que as proteínas, podem se adaptar ao meio “diminuindo” ou “estendendo” sua conformação dependendo da polaridade, força iônica e pH do solvente. As aminas terminais dos dendrímeros PAMAM (dendrímero que possui grupamento amino como grupo terminal)

apresentam uma configuração estendida em baixos pHs devido à repulsão eletrostática entre as aminas terciárias protonadas do seu interior e as aminas primárias da superfície (Figura 6) (Boas e Heegaard, 2004).

Figura 6: Alterações conformacionais causadas na estrutura de um dendrímero PAMAM com grupamentos terminais amino com o aumento do pH. (A) Estrutura tridimensional, (B) Estrutura bidimensional (Boas e Heegaard, 2004).

Em $\text{pH} > 9$ a dobra dos grupos superficiais em direção a região interna do dendrímero PAMAM ocorre pela formação de pontes de hidrogênio entre as aminas terciárias protonadas e as aminas primárias superficiais, resultando em uma estrutura densa (Chen et al., 2000). Desta forma, concluiu-se que as mudanças conformacionais relacionadas ao pH são dependentes da natureza dos grupos carregados na superfície dos dendrímero (Boas e Heegaard, 2004).

A polaridade do solvente influencia muito na estrutura tridimensional dos dendrímeros e tem sido objeto de discussão. Estudos teóricos e experimentais

com dendrímeros PAMAM com grupamentos amina superficiais mostram que estes dendrímeros quando dispersos em solvente apolar tendem a formar interações intramoleculares (por exemplo, pontes de hidrogênio) gerando um aumento na densidade molecular na região do núcleo do dendrímero e conseqüentemente, baixa densidade molecular na superfície. Em solventes polares, as ramificações do dendrímero estão solvatadas e a densidade molecular na sua superfície aumenta (Ballauff, 2001; Boas e Heegaard, 2004). Sendo assim, o microambiente influencia no limite de difusão entre as moléculas do solvente no dendrímero, ou seja, os dendrímeros dissolvidos em solventes polares, como a água, podem ter um interior muito apolar (micela unimolecular) permitindo que moléculas orgânicas de baixa polaridade sejam encapsuladas ou carregadas em um meio aquoso. Assim, as propriedades dos dendrímeros tornam esta classe de moléculas capazes de carrear substâncias bioativas com diferentes características (Boas e Heegaard, 2004).

1.3.4 Propriedades dos dendrímeros como sistemas carreadores

Uma das maiores vantagens dos dendrímeros como sistemas carreadores é a possibilidade de desenhá-los e sintetizá-los para aplicações específicas.

A arquitetura original dos dendrímeros de PAMAM possibilita a sua interação com fármacos muito ou pouco solúveis em água, formando complexos via encapsulamento molecular, com ligações covalentes e não covalentes. A alta densidade de cargas superficiais presente, devido aos múltiplos grupos ionizáveis na periferia, possibilita também a interação eletrostática com diferentes fármacos (Figura 7). Além disso, como cada macromolécula pode interagir com várias moléculas do fármaco (dependendo dos grupos superficiais disponíveis), pode-se obter complexos com estequiometria diferente da 1:1, o que resulta em um maior aumento da solubilidade de substâncias hidrofóbicas, que pode possibilitar a melhora da penetração transdérmica delas através de mecanismo semelhante aos apresentados pelos complexos com ciclodextrinas (Chauhan et al., 2003).

Figura 7: Propriedades intrínsecas e extrínsecas da estrutura dos dendrímeros (Bai et al., 2006).

Existem vários relatos na literatura de princípios ativos que apresentaram sua atividade biológica melhorada ou modificada quando complexados com dendrímeros. Complexos com oligonucleotídeos, por exemplo, aumentam a entrada de ácidos nucleicos no citoplasma e no núcleo das células (Svenson e Tomalia, 2005; Yoo et al., 1999; Yoo e Juliano, 2000; deLong et al., 1997). Conjugados de cisplatina, agente anti-neoplásico, com dendrímeros PAMAM, levaram a liberação lenta do fármaco, acúmulo de altas concentrações em tumores sólidos e baixa toxicidade comparada com a cisplatina livre (Malik et al., 1999).

Dendrímeros contendo grupos fotoativos para utilização na Terapia Fotodinâmica para tratamento de tumores vem sendo sintetizados por diversos pesquisadores (Nishiyama et al., 2003; Azzellini e Ribeiro, 2003). Outros trabalhos recentes têm avaliado o potencial dos dendrímeros para a liberação de fármacos por via oral, ocular, transdérmica e tópica (Sakthivel et al., 1999; Vandamme e Brobeck, 2005; Chauhan et al., 2003; Venuganti e Perumal, 2008; Jevprasesphant et al., 2004).

O uso dos dendrímeros como promotor de absorção na liberação transdérmica de fármacos vem sendo explorado (Wang, et al.2003, Cheng et al.2006, Ventaka, et al., Chauhan, et al., 2003). Segundo a literatura os dendrímeros atuam aumentando a solubilidade de fármacos lipofílicos (Chauhan, et al., 2003 ; Cheng et al., 2006), bem como alguns trabalhos mostram que dendrímeros catiônicos interagem com a pele desorganizando-a de forma que permita a penetração do fármaco (Cheng, et al., 2006 ; Venkata, et al., 2009).

Além da utilização de sistemas de liberação de fármacos, métodos físicos também podem ser empregados concomitantemente para controlar e aumentar a penetração de fármacos na pele ou através dela. A associação de diferentes mecanismos de ação vem despertando o interesse de alguns grupos de pesquisa (Dahlan, et al., 2009; Essa, et al., 2004; Fang, et al., 1999; Badkar, et al., 1999) a fim de obter uma ação sinérgica que possibilite um maior exito na aplicação transdérmica de fármacos. Um dos métodos físicos mais estudados e utilizados é a iontoforese.

1.4 Aplicação de iontoforese para aumentar a permeabilidade de fármacos através da pele

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

As vantagens da iontoforese incluem (a) aumento significativo na permeação transdérmica, especialmente para substâncias polares; (b) controle

preciso da quantidade de fármaco permeada, tanto que diferentes perfis de liberação podem ser monitorados, atendendo assim a necessidades específicas de cada paciente; (c) processo não invasivo e considerado seguro (Mudry et al., 2006), sem riscos de infecções ou danos, além de ser uma importante alternativa para a administração endovenosa (Singh et al., 1996).

A aplicação da iontoforese consiste na passagem de uma corrente elétrica fraca ($\sim 0,5 \text{ mA/cm}^2$) por uma solução eletrolítica contendo o fármaco em contato com a pele. Um eletrodo-terra colocado em qualquer lugar do corpo completa o circuito elétrico (Aulton, 2005). A iontoforese é baseada no princípio geral da eletricidade, de que cargas iguais se repelem e cargas opostas se atraem. Assim, para a penetração através da pele de uma substância carregada negativamente, esta é colocada em contato com um eletrodo negativo, onde, na presença de corrente elétrica ocorrerá repulsão entre ela e o eletrodo, com conseqüente entrada desta na pele. O mesmo ocorre com íons carregados positivamente, colocados em contato com eletrodos positivos. O transporte de moléculas neutras ou sem carga também pode ser facilitado pela iontoforese (Singh et al., 1996).

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

A eletrosmose refere-se ao fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma diferença de potencial elétrico é aplicada na pele. O termo eletrosmótico deriva do fato de que, sobre a influência da corrente elétrica, a pele favorece o transporte do Na^+ sobre o Cl^- devido à permissividade desta membrana. Isto é, a pele possui ponto isoelétrico de aproximadamente 4,0–4,5 e, acima desta faixa de pH, os grupos carboxilatos associados a resíduos de aminoácidos presentes na membrana encontram-se ionizados. Portanto, a pele se encontra carregada negativamente quando em contato com uma solução com pH fisiológico, favorecendo o transporte de cátions

e dificultando o de ânions. Vários autores demonstraram que o número de transporte do Na^+ através da pele humana *in vitro*, em pH 7,4, é quase o dobro do número de transporte do Cl^- (Bath, et al., 2000; Gratieri, et al., 2008).

Sendo assim, a aplicação de um campo elétrico através da pele, favorece o movimento de íons no sentido do ânodo para o cátodo, na tentativa de neutralizar as cargas negativas desta membrana. Estes íons, ao se movimentarem, levam consigo um volume de solvente e este impulso é transferido para as moléculas neutras presentes no sistema. Portanto, o fluxo de solvente ou fluxo eletrosmótico faz com que moléculas neutras possam ser liberadas por iontoforese através do ânodo e os cátions se beneficiem desta segunda força adicional à eletrorrepulsão (Cullander, et al., 1991; Gratieri, et al., 2008)

De maneira geral, a mobilidade elétrica de uma molécula é inversamente proporcional ao seu tamanho e, pelo fato de moléculas grandes também serem levadas pelo fluxo de solvente, aproveitando-se das vias de baixa resistência do tecido, a eletrosmose desempenha papel fundamental na permeação cutânea de macromoléculas (Abla, et al., 2005; Cazáres-Delgadillo, et al., 2007; Pikal, M.,J., 2001).

Taveira e colaboradores (2009) avaliaram a contribuição do fluxo eletrosmótico no eletrotransporte da doxorrubicina com o uso de um gel não iônico (hidroxietilcelulose) e um catiônico (quitosana) e constataram que o fluxo eletrosmótico foi drasticamente reduzido quando o fármaco foi incorporado em um gel catiônico, isto porque a iontoforese aumentou a penetração do polímero de quitosana, neutralizando as cargas negativas da pele responsáveis pelo fluxo eletrosmótico do ânodo em direção ao cátodo em pH fisiológico, diminuindo assim, a contribuição deste fluxo na permeação do fármaco. Este estudo evidencia a influência da iontoforese não só no aumento da penetração de fármacos, mas também na penetração de componentes da formulação.

Estudos confirmam o aumento da penetração de fármacos por iontoforese quando comparada ao transporte passivo isolado. Curdy et al (2000), relatam maior penetração de piroxicam por iontoforese em relação à difusão passiva, independente do tempo de aplicação. Além disso, outros autores também

verificaram que a iontoforese aumenta a penetração tópica e transdérmica de fármacos. Chesnoy et al. (1999) demonstraram que a iontoforese aumentou o transporte do fármaco catiônico cloridrato de propranolol no estrato córneo humano. Hirvonen et al (1998) demonstraram a permeação de polipetídeos e a influência dos mecanismos de eletrorrepulsão e eletrosmose na sua liberação.

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

1.4.1 Dispositivo iontoforético e reações eletroquímicas

Um dispositivo iontoforético é composto por uma fonte de energia e dois compartimentos com eletrodos. A fonte de energia pode ser uma bateria ou um controlador eletrônico. Este expande a capacidade do dispositivo iontoforético, pois permite regular a intensidade e frequência da corrente elétrica de acordo com a demanda. Desta forma, pode controlar de forma precisa o perfil de liberação do fármaco (Tapper, 1989). A maioria dos dispositivos disponíveis no comércio funciona com uma corrente elétrica contínua e unidirecional. A formulação com fármaco (D^+A^-) contendo a molécula ionizada (D^+) é colocada no compartimento com eletrodo de mesma carga, por exemplo, um fármaco carregado positivamente em pH fisiológico, como a lidocaína, é colocado no compartimento anódico (positivo). O compartimento do eletrodo oposto é colocado em outro local distante da pele (Gratieri et al., 2008).

Quando a corrente é aplicada, o campo elétrico induz um direcionamento nos íons presentes: cargas positivas no compartimento anódico movem-se em direção ao cátodo, enquanto os ânions movem-se em direção oposta (Kalia et al, 2004). O par de eletrodos mais utilizados na iontoforese é o de Ag/AgCl. As reações

eletroquímicas no ânodo (eletrodo de Ag) necessitam da presença de íons Cl^- . Esses íons reagem com a prata e formam cloreto de prata, que, por sua baixa solubilidade em meio aquoso é simultaneamente depositado na superfície do eletrodo liberando um elétron. Na tentativa de manter a eletroneutralidade no ânodo, ou um cátion move-se para fora do compartimento em direção a pele, ou um ânion deixa a pele e move-se em direção ao compartimento anódico. Já no cátodo (eletrodo de AgCl), o cloreto de prata é reduzido com a chegada de elétrons da fonte de energia e há formação de Ag, que permanece depositada no eletrodo, e libera íons Cl^- para a solução. Novamente, a neutralidade elétrica deve ser mantida, ou com a entrada de cátions da pele, ou com a perda de um ânion (Figura 8) (Kalia et al, 2004; Chang et al., 2000).

Figura 8: Representação esquemática da movimentação de íons e as reações eletroquímicas durante a iontoforese (adaptado de Kalia et al., 2004).

A presença obrigatória de íons Cl^- no compartimento anódico leva usualmente a diminuição da liberação do fármaco. Isso ocorre, pois sais

comumente usados para produzir Cl^- também levam a produção de íons Na^+ , os quais competem efetivamente com o fármaco pela corrente elétrica (Kalia et al., 2004).

A Figura 9 também apresenta os movimentos dos íons na pele durante a iontoforese. Sobre a influência da corrente, os íons biológicos (X^-) que são os chamados cloros primários, viajam da pele para o compartimento do ânodo. Os ânions do cátodo são repelidos para a pele, enquanto que os íons biológicos (M^+) como o Na^+ e K^+ , vão da pele para o cátodo. O fármaco carregado positivamente (D^+), sobre a influência do campo elétrico, migra para dentro da pele. A taxa de transporte de íons através da pele é proporcional a magnitude da corrente elétrica aplicada (Subramony et al, 2006). Dependendo de várias características, como as propriedades físico-químicas do fármaco, a intensidade da corrente elétrica e as interações químicas existentes entre fármaco e pele, a substância submetida à iontoforese pode ficar retida no estrato córneo, na epiderme, na derme e / ou atingir a corrente sanguínea.

Figura 9: Fluxo de íons na pele durante a iontoforese (Subramony et al., 2006).

1.4.2 Dispositivos comerciais iontoforéticos

Atualmente, os dispositivos comercialmente disponíveis para liberação iontoforética são os da Iomed Inc (Salt Lake City, UT), Empi Corporation (St. Paul,

MN) e Travanti Pharma Inc. (St. Paul, MN). Estes sistemas são vendidos sem os fármacos, e é necessário adicionar a solução com fármaco ao reservatório antes do tratamento. O IontoPatch[®] (Travanti Pharma Inc.) possui uma bateria que é descartada junto com o dispositivo iontoforético (Figura 10). A desvantagem destes dispositivos está na falta de padronização e otimização da solução quando é colocada em contato com o eletrodo, podendo acarretar em baixa eficiência de corrente e, conseqüentemente, baixa liberação do fármaco.

Figura 10: Dispositivo iontoforético IontoPatch[®] (www.iontopatch.com – 20/11/2010).

A Vysteris, Inc (Fair Lawn, NJ) (Figura 11) recebeu em 2004 a aprovação do New Drug Applications (NDA) para colocar no mercado um sistema de liberação iontoforética de lidocaína, para anestesia local. Além destes, existe ainda um dispositivo capaz de detectar hipoglicemia e hiperglicemia ao extrair a glicose da pele com o auxílio de corrente elétrica, chamado Glucowatch[®], criado pela Cyguns Inc. (Redwood City, CA) e a disposição no mercado desde 1999 (Subramony et al., 2006).

Figura 11: Vyteris Inc. LidoSite™ sistema tópico. Sistema de liberação iontoforética de lidocaína para anestesia local (Subramony et al., 2006).

Este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar complexos de dendrímeros PAMAM contendo a PpIX e avaliar a penetração cutânea e a fotocitotoxicidade destes complexos na presença e ausência de iontoforese.

A PpIX é uma substância endógena, fotossensível, com custo inferior ao 5-ALA (precursor da PpIX aprovado pelo FDA para a TFD). No entanto, ela não é administrada topicamente devido a sua alta lipofilia, apresentando dificuldades para penetrar na pele. Outra barreira encontrada para o uso direto da PpIX foi relatado em estudos realizados em cultura de células por Ji et al, 2006 e Bronshtein, et al., 2006. Esses autores observaram que esta, quando administrada exogenamente, tem uma localização difusa no citoplasma e na membrana plasmática, diferentemente da PpIX induzida pelo 5-ALA, a qual apresenta localização subcelular nas mitocôndrias apresentando uma maior efetividade da TFD. Acredita-se que os dendrímeros contendo PpIX melhorar a distribuição celular da PpIX além de aumentar a solubilidade em água, melhorando sua penetração na pele da mesma maneira que complexos de ciclodextrina fazem com substâncias hidrofóbicas (Chauhan *et al.*, 2003). Ou seja, o dendrímero transporta

as moléculas de PpIX “solúveis” para a superfície da pele, onde elas particionam para dentro do estrato córneo. A aplicação da iontoforese pode aumentar a penetração do sistema na pele e alterar a localização subcelular da PpIX.

2 Conclusão

- A metodologia analítica desenvolvida mostrou-se adequada para a quantificação da PpIX em solução aquosa.
- Os estudos de solubilidade em meio aquoso tamponado contendo NaCl mostraram que o dendrímero PAMAM G4.5 foi o que solubilizou a maior quantidade de PpIX seguido do PAMAM-OH G4 > tampão HEPES ≥ PAMAM G4. As principais interações formadas entre os dendrímeros estudados e a PpIX parecem ser hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio.
- Os dendrímeros PAMAM em solução aquosa pH 7 solubilizaram maior quantidade de PpIX comparados à solução aquosa pH 4.
- O NaCl diminuiu a solubilidade da PpIX em solução aquosa contendo dendrímeros PAMAM.
- A PpIX na presença dos dendrímeros PAMAM G4, G-4.5 e G4-OH apresentaram perfil de solubilidade tipo B_I para o dendrímero PAMAM G4 e B_S para os dendrímeros PAMAM G-4.5 e G4-OH.
- O complexo sólido PpIX-PAMAM G4-OH possui 1,73 vezes mais PpIX comparado ao complexo PpIX-PAMAM G-4.5.
- Os espectros de absorbância e fluorescência dos complexos PpIX-PAMAM G-4.5 indicam a presença de agregados.
- A complexação da PpIX com os dendrímeros não alterou o potencial zeta dos dendrímeros e os complexos PpIX G4-OH apresentou 13,2 nm e o complexo PpIX-PAMAM G-4.5 possui duas populações uma com 31 e a outra com 391 nm.

- Os complexos sólidos PpIX-dendrímero PAMAM foram caracterizados por análise espectroscópica de infravermelho transformada de Fourier ;
- Nos estudos *in vitro* de permeação cutânea passiva e iontoforética do complexo PpIX-PAMAM G4-OH e PpIX-PAMAM G-4.5 contendo 0,1% de PpIX pode-se observar que o complexo PpIX-PAMAM G4-OH promoveu a melhor permeação cutânea após iontoforese anódica devido à eletrosmose, permitindo que a PpIX atinja as camadas mais profundas da pele, sendo quantificado no receptor da célula de difusão;
- Nos estudos de cultura de células os complexos PpIX-PAMAM não apresentaram citotoxicidade na ausência de luz para as células A431.
- A fotocitotoxicidade do complexo PpIX-PAMAM G-4.5 foi semelhante ao complexo PpIX-PAMAM G4-OH para as células A431 sendo ambos mais fotocitotóxicos comparados a PpIX não complexada. E a iontoforese aumentou significativamente a fotocitotoxicidade da PpIX livre ou complexada sendo maior para a PpIX complexada com o dendrímero PAMAM G4-OH seguido da PpIX-PAMAM G-4.5 e PpIX livre respectivamente.
- Avaliou-se a localização celular da PpIX em solução livre e presente nos complexos em células A 431 e observou-se que esta encontra-se presente no citoplasma das células e com maior intensidade de fluorescência quando presente nos complexos PpIX-PAMAM comparados a solução aquosa;

Os complexos de PpIX obtidos com dendrímeros PAMAM aumentaram a penetração cutânea e celular da PpIX levando a um aumento da sua fotocitotoxicidade podendo este sistema de liberação nanoparticulado contribuir para a TFD.

3 Referências Bibliográficas

FDA, Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research. 2001. Disponível em <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.fdf>.

Abla N, Naik A, Guy RH, Kalia YN. Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin. **J Control Release**. 108(2-3):319-30, 2005

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899. 29-5-2003, 2008.

Akins, D. L., Zhu, H., and Gao, C. Aggregation of Tetraaryl-substituted Porphyrins in Homogeneous Solution. **J. Phys. Chem.** pp 5420-5425. 2006.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Czerwinski, M. J., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. **Proc.Am.Assoc.Cancer Res.** 27, pp 389. 1986.

Asthana A, Chauhan A S, Diwan P V and Jain N K. Poly(Amidoamine) (PAMAM) Dendritic Nanostructures for Controlled Site-Specific Delivery of Acidic Anti-Inflammatory Active Ingredient. **AAPS PharmSciTech** 6: pp E536-E542, 2005.

Aulton, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª ed. Ed. Artmed: Porto Alegre, 2005.

Azzellini, G.C. Supramolecular effects in dendritic systems containing photoactive groups. **An. Acad. Bras.** v. 72, n. 1, pp 33-37, 2000.

Azzellini, G. C. and Ribeiro, M. G. Synthesis of New Cationic Metalloporphyrins and Heterodimer Formation with Anionic Metallophthalocyanines. **J. Br. Chem. Soc.**14[6], pp 914-921. 2003.

Bai S, Thomas C, Rawat A and Ahsan F. Recent Progress in Dendrimer-Based Nanocarriers. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst** 23: pp 437-495, 2006.

Banga, A. K., Chien Y. W. Ionophoretic Delivery of drugs : Fundamentals, developments and biomedical applications. **J. Controll. Release**, v.7, p.1-24, 1988.

Ballauff, M. Dendrimers III: Design, Dimension, Function. **Topics Curr.Chem.** 212, pp 177-194. 2001.

Baptista J, Martinez C, Leite L and Cochito M. Our PDT Experience in the Treatment of Non-Melanoma Skin Cancer Over the Last 7 Years. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 20: pp 693-697, 2006.

Bath, B.D., White H.S., Scott E.R. Visualization and analysis of electroosmotic in hairless mouse skin. **Pharm res** 17: pp 471-475, 2000.

Battah S.H, Chee C E, Nakanishi H, Gerscher S, Macrobert A J and Edwards C. Synthesis and Biological Studies of 5-Aminolevulinic Acid-Containing Dendrimers for Photodynamic Therapy. **Bioconjug Chem** 12: pp 980-988, 2001.

Bertini I. and Luchinat C. **NMR of Paramagnetic Substances**. Coordination Chemistry Reviews 150, 1996.

Boas U. and Heegaard P. M. Dendrimers in Drug Research. **Chem Soc Rev** 33: pp 43-63, 2004.

Bose, S.; Ravis, W.R.; Lin, Y.J.; Zhang, L.; Hofmann, G.A.; Banga, A.K. Electrically-assisted transdermal delivery of buprenorphine. **J. Control. Release**, v.73, n.2-3, p.197-203, 2001.

Braun C.S., Vetro J.A., Tomalia D. A., Koe G. S., Koe J. G. and Middaugh C. R. . Structure/Function Relationships of Polyamidoamine/DNA Dendrimers As Gene Delivery Vehicles. **J Pharm Sci** 94: pp 423-436, 2005.

Bronshteint I., Aulova S., Juzeniene A., Iani V., Ma L. W., Smith K. M., Malik Z., Moan J .and Ehrenberg B. In Vitro and in Vivo Photosensitization by Protoporphyrins Possessing Different Lipophilicities and Vertical Localization in the Membrane. **Photochem Photobiol** 82: pp 1319-1325, 2006.

Brounaugh, R. L. and Maibach, H. T. **Percutaneous absorptions: Drugs - Cosmetics - Mechanisms - Methodology**. Drugs and Pharmaceutical Sciences 97, 3^o ed., 1999.

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.

Buhleier, E, Wehner, W., and Vögtle, F. "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies. **Synthesis** 405, pp 155-158. 1978.

Cairduff, F.; Stringer, M.; Hudson, E.; Ashand, D.; Brown, S. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. **Br. J. Cancer**, v.69, p.605-608, 1994.

Cakara, D., Kleimann, J., and Borkovec, M. Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations. **Macromolecules** 36, pp 4201-4207. 2003.

Calzavara-Pinton, P.G. Repetitive photodynamic therapy with topical aminolevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. **J. Photochem. Photobiol. B.** v.29, p.53-57, 1995.

Cázares-Delgadillo J, Naik A, Ganem-Rondero A, Quintanar-Guerrero D, Kalia YN. Transdermal delivery of cytochrome C--A 12.4 kDa protein--across intact skin by constant-current iontophoresis. **Pharm Res.** (7):1360-8, 2007.

Chang, S.L.; Hofmann, G.A.; Zhang, L.; Deftos, L.J.; Banga, A.K. Transdermal iontophoretic delivery of salmon calcitonin. **Int J Pharm**, v.200, n.1, p.107-113, 2000.

Chauhan, A. S., Sridevi, S., Chalasani, K. B., Jain, A. K., Jain, S. K., and Diwan, P. V. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. **J Control Release.** 90[3], pp 335-343. 2003.

Chen, W., Tomalia, D. A., and Thomas, J. L. Intercalation Kinetics of Long Polymers in 2 nm Confinements. **Macromolecules** 33, pp 9169-9172. 2000.

Cheng Y., Wu Q., Li Y. and Xu T. External Electrostatic Interaction Versus Internal Encapsulation Between Cationic Dendrimers and Negatively Charged Drugs: Which Contributes More to Solubility Enhancement of the Drugs? **J Phys Chem B** 112: pp 8884-8890, 2008.

Chesnoy, S.; Durand, D.; Doucet, J.; Courraze, G. Structural parameters involved in the permeation of propranolol HCl by iontophoresis and enhancers. **J Control Release**, v.58, p.163-175, 1999.

Cullander C, Guy RH. Sites of iontophoretic current flow into the skin: identification and characterization with the vibrating probe electrode. **J Invest Dermatol.** 97:55-64,1991.

Curdy, C.; Kalia, Y.; Naik, A.; Guy, R.H. Piroxican delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. **J Control Rel.**, v.76, p.73-79, 2001.

Dahle J., Steen H. B. and Moan J. The Mode of Cell Death Induced by Photodynamic Treatment Depends on Cell Density. **Photochem Photobiol** 70: pp 363-367, 1999.

Dailey, H.A.; Smith, A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. **Biochemistry**, v.223, pp 441-445,1984.

De Gennes, P. G. and HERVET, H. Statistics of "Starburst" Polymers. **J.Phys.Lett.** 44, pp L351-L360. 1983.

de Haas E.R., de Vijlder H. C., Sterenborg H. J., Neumann H. A. and Robinson D. J. Fractionated Aminolevulinic Acid-Photodynamic Therapy Provides Additional Evidence for the Use of PDT for Non-Melanoma Skin Cancer. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 22: pp 426-430, 2008.

DeLong R., Stephenson K., Loftus T., Fisher M., Alahari S., Nolting A. and Juliano R.L. Characterization of Complexes of Oligonucleotides With Polyamidoamine Starburst Dendrimers and Effects on Intracellular Delivery. **J Pharm Sci** 86: pp 762-764, 1997.

DeMatti, C.R.; Huang, B.; Tomalia, D.A., Designed dendrimer syntheses by self-assembly of single-site, ssDNA functionalized dendrons, **Nano. Lett.** v.4, pp 771–777, 2004.

Denizot F. and Lang R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. **J Immunol Methods** 89: pp 271-277, 1986.

Detty M.R., Gibson S.L. and Wagner S.J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **J Med Chem** 47: pp 3897-3915, 2004.

Devarakonda B., Hill R. A. and de Villiers M. M. The Effect of PAMAM Dendrimer Generation Size and Surface Functional Group on the Aqueous Solubility of Nifedipine. **Int J Pharm** 284: pp 133-140, 2004.

Devarakonda B., Hill R. A., Liebenberg W., Brits M. and de Villiers M. M. Comparison of the Aqueous Solubilization of Practically Insoluble Niclosamide by Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers and Cyclodextrins. **Int J Pharm** 304: pp 193-209, 2005a.

Devarakonda B., Li N. and de Villiers M. M. Effect of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers on the in Vitro Release of Water-Insoluble Nifedipine From Aqueous Gels. **AAPS PharmSciTech** 6: pp E504-E512, 2005b.

Devarakonda B., Otto D. P., Judefeind A., Hill R. A. and de Villiers M. M. Effect of PH on the Solubility and Release of Furosemide From Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer Complexes. **Int. J. Pharm.** 345 (1-2): pp 142-153, 2007.

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. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** Lausanne, v.33, pp 225-231, 1996.

Divaris, D.X.G.; Kennedy, J.C.; Pottier, R.H. Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration o 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. **Am. J. Phatol.** Philadelphia, v.136, n.4, pp 891-897, 1990.

Dougherty T.J. Photodynamic Therapy--New Approaches. **Semin Surg Oncol** 5: pp 6-16, 1989.

Dougherty T.J., Kaufman J. E., Goldfarb A., Weishaupt K. R., Boyle D. and Mittleman A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Res** 38: pp 2628-2635, 1978.

Drzazga Z., Michnik A. and Zimnicka M. Differential Scanning Calorimetry Study of Haemin Thermal Stability. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** 72: pp 555-563, 2003.

Dykes, G. M. Dendrimers: a review of their appeal and applications. **J.Chem.Technol.Biotechnol.** 76, pp 903-918. 2001.

El-Sharabasy, M.M.H.; El-Waseef, A.M.; Hafez, M.M.; Salim, S.A. Phorphyrin metabolism in some malignant disease. **Br. J. Cancer.** v.65, pp 409-412, 1992.

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

Essa, E.A., Bonner, M.C., Barry, B.W., Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. **Int. J. Pharm.** 240, 55–66, 2002.

Essa, E.A., Bonner, M.C., Barry, B.W. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. **J. Control Rel.** 95, 535–546, 2004.

Fang JY, Sung KC, Lin HH, Fang CL. Transdermal iontophoretic delivery of enoxacin from various liposome-encapsulated formulations. **J Control Release.** 60(1):1-10, 1999

Farin, D. and Avnir, D. **Surface Fractality of Dendrimers.** Angew.Chem.Int.Ed Engl. 30, pp 1379-1380. 1991.

Fritsch C., Lehmann P., Stahl W., Schulte K. W., Blohm E., Lang K., Sies H. and Ruzicka T. Optimum Porphyrin Accumulation in Epithelial Skin Tumours and Psoriatic Lesions After Topical Application of Delta-Aminolaevulinic Acid. **Br J Cancer** 79: pp 1603-1608, 1999.

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

Gerscher S., Connelly J. P., Beijersbergen Van Henegouwen G. M., Macrobert A. J., Watt P. and Rhodes L. E. A Quantitative Assessment of Protoporphyrin IX Metabolism and Phototoxicity in Human Skin Following Dose-Controlled Delivery of the Prodrugs 5-Aminolaevulinic Acid and 5-Aminolaevulinic Acid-n-Pentylester. **Br J Dermatol** 144: pp 983-990, 2001.

Han I, Kim M, Kim J. Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. **Exp Dermatol.** 13(2):86-92, 2004

Han H.D., Lee A., Hwang T., Song C. K., Seong H., Hyun J. and Shin B. C. Enhanced Circulation Time and Antitumor Activity of Doxorubicin by Comblike Polymer-Incorporated Liposomes. **J Control Release** 120: pp 161-168, 2007.

Hatakeyama T. and Quinn F. X. **Thermal Analysis - Fundamentals And Applications to Polymer Science**. British Library Cataloguing in Publication Data, New York, 1985.

Hawker, C. J. and Frechet, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. **J. Am. Chem. Soc.** 112, pp 7638-7647. 1990.

Hawker, C. J., Wooley, K. L., and Frechet, J. M. J. Unimolecular micelles and globular amphiphiles: dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. **J.Chem.Soc.**, Perkin Trans. 1, pp 1287-1297. 1993.

Heo D.S., Park J. G., Hata K., Day R., Herberman R. B. and Whiteside T. L. Evaluation of Tetrazolium-Based Semiautomatic Colorimetric Assay for Measurement of Human Antitumor Cytotoxicity. **Cancer Res** 50: pp 3681-3690, 1990.

Higuchi, T. and Connors, K. A. Phase-solubility techniques. **Adv.Anal.Chem.Instrum.** 4, pp 177-212. 1965.

Hirvonen, J.; Guy, R.H., Transdermal iontophoresis: modulation of electroosmosis by polypeptides. **J Control Release**. v.50, p.283-89, 1998.

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

Jevprasesphant R., Penny J., Attwood D. and D'Emanuele A. Transport of Dendrimer Nanocarriers Through Epithelial Cells Via the Transcellular Route. **J Control Release** 97: pp 259-267, 2004.

Ji Z., Yang G., Vasovic V., Cunderlikova B., Suo Z., Nesland J. M. and Peng Q. 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** 84: pp 213-220, 2006.

Jichlinski, P.; Forrer, M.; Mizeret, J.; Glanzmann, T.; Braichotte, D.; Wagnieres, G.; Zimmer, G.; Guillou, L.; Schmidlin, F.; Graber, P.; Van den Berg, H.; Leisinger, H.J. Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. **Lasers Surg. Med.** v.20, n.4, p.402-408, 1997.

Kalia, Y.N.; Naik, A.; Garrison, J.; Guy, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v.56, p.619-58, 2004.

Kalka, K.; Merk, H.; Mukhtar, H. Photodynamic therapy in dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.42, pp 389-413, 2000.

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.

Kennedy, J.C.; Pottier, D. C. Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., Lausanne, v.6, pp 143-148, 1990.

Kessel D. and Kohn K. I. Transport and Binding of Mesoporphyrin IX by Leukemia L1210 Cells. **Cancer Res** 40: pp 303-307, 1980.

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

Klajnert B., Stanislawska L., Bryszewska M. and Palecz B. Interactions Between PAMAM Dendrimers and Bovine Serum Albumin. **Biochim Biophys Acta** 1648: pp 115-126, 2003.

Koga M., Kai H., Egami K., Murohara T., Ikeda A., Yasuoka S., Egashira K., Matsuishi T., Kai M., Kataoka Y., Kuwano M. and Imaizumi T. Mutant MCP-1 Therapy Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Malignant Melanoma in Mice. **Biochem Biophys Res Commun** 365: pp 279-284, 2008.

Kojima C., Toi Y., Harada A. and Kono K. Preparation of Poly(Ethylene Glycol)-Attached Dendrimers Encapsulating Photosensitizers for Application to Photodynamic Therapy. **Bioconjug Chem** 18: pp 663-670, 2007.

Kolhe P., Misra E., Kannan R. M., Kannan S. and Lieh-Lai M. Drug Complexation, in Vitro Release and Cellular Entry of Dendrimers and Hyperbranched Polymers. **Int J Pharm** 259: pp 143-160, 2003.

Konan-Kouakou Y.N., Boch R., Gurny R. and Allemann E. In Vitro and in Vivo Activities of Verteporfin-Loaded Nanoparticles. **J Control Release** 103: pp 83-91, 2005.

Krane J., Skjetne T. and Telnaes N. Nuclear Magnetic Spectroscopy of Petroporphyrins. **Tetrahedron** 39: pp 4109-4119, 1983.

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.

Lange, N.; Jichlinski, P.; Zellweger, M.; Forrer, M.; Marti, A.; Guillou, L.; Kucera, P.; Wagnières, G.; Van Den Bergh, H. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. **Br. J. Cancer**. v.80, n.1/2, pp 185-193, 1999.

Leibovici, L.; Schoenfeld, N.; Yehoshua, H.A.; Mamet, R.; Rakowsky, E.; Shindel, A.; Atsmon, A. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. **Cancer**. v.62, pp 2297-2300, 1988.

Lescanet R.L. and Muthukumar M. Configurational Characteristics and Scaling Behavior of Starburst Molecules: a Computational Study. **Macromolecules** 23: pp 2280-2288, 1990.

Lopez, R.F.V.; Bentley, M.V.L.B.; Delgado-Charro, M.B.; Guy, R.H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharm. Res.**, v.18, p.311-315, 2001.

Lopez R.F., Bentley M.V., Begona Delgado-Charro M. and Guy R.H. Optimization of Aminolevulinic Acid Delivery by Iontophoresis. **J Control Release** 88: pp 65-70, 2003.

Lopez R.F., Lange N., Guy R. and Bentley M. V. Photodynamic Therapy of Skin Cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and Its Esters. **Adv Drug Deliv Rev** 56: pp 77-94, 2004.

Lopez, R. F.V.; Seto, J. E.; Blankschtein, D. and Langer, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**. Oct 22, 2010.

Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., and Sugimachi, K. The ATP assay is more sensitive than succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. **Eur.J.Cancer Clin.Oncol.** 23, pp 276. 1986.

Malik N., Evagorou E. G. and Duncan R. Dendrimer-Platinate: a Novel Approach to Cancer Chemotherapy. **Anticancer Drugs** 10: pp 767-776, 1999.

Manosroi J., Apriyani M. G., Foe K. and Manosroi A. Enhancement of the Release of Azelaic Acid Through the Synthetic Membranes by Inclusion Complex Formation With Hydroxypropyl--Cyclodextrin. **Int J Pharm** 293: pp 235-240, 2005.

Margalit R., Shaklai N. and Cohen S. Fluorimetric Studies on the Dimerization Equilibrium of Protoporphyrin IX and Its Haemato Derivative. **Biochem J** 209: pp 547-552, 1983.

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.

Moan J., Berg K., Bommer J. C. and Western A. Action Spectra of Phthalocyanines With Respect to Photosensitization of Cells. **Photochem Photobiol** 56: pp 171-175, 1992.

Moan J., Waksvik H. and Christensen T. DNA Single-Strand Breaks and Sister Chromatid Exchanges Induced by Treatment With Hematoporphyrin and Light or by X-Rays in Human NHIK 3025 Cells. **Cancer Res** 40: pp 2915-2918, 1980.

Molavi O., Ma Z., Mahmud A., Alshamsan A., Samuel J., Lai R., Kwon G. S. and Lavasanifar A. Polymeric Micelles for the Solubilization and Delivery of STAT3 Inhibitor Cucurbitacins in Solid Tumors. **Int J Pharm** 347: pp 118-127, 2008.

Morgan W.T., Smith A. and Koskelo P. The Interaction of Human Serum Albumin and Hemopexin With Porphyrins. **Biochim Biophys Acta** 624: pp 271-285, 1980.

Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods** 65: pp 55-63, 1983.

Mosmann T.R. and Fong T. A. Specific Assays for Cytokine Production by T Cells. **J Immunol Methods** 116: pp 151-158, 1989.

Murat, M. and Crest, G. S. Molecular Dynamics Study of Dendrimer Molecules in Solvents of Varying Quality. **Macromolecules** 29, pp 1278-1285. 1996.

Na M., Yiyun C., Tongwen X., Yang D., Xiaomin W., Zhenwei L., Zhichao C., Guanyi H., Yunyu S. and Longping W. Dendrimers As Potential Drug Carriers. Part II. Prolonged Delivery of Ketoprofen by in Vitro and in Vivo Studies. **Eur J Med Chem** 41: pp 670-674, 2006.

Navone, N.M.; Polo, C.F.; Frisardi, A.L.; Andrade, N.E.; Battle, A.M. Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic in vitro studies and some heme enzymatic activity levels. **Int. J. Biochem.** v.22, pp 1407-1411, 1990.

Nessem, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 26, n. 3, p. 387-99, 2001.

Nicoli S, Santi P, Couvreur P, Couarraze G, Colombo P, Fattal E. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. **Int J Pharm.** 214(1-2):31-5, 2001.

Nishiyama N., Stapert H. R., Zhang G. D., Takasu D., Jiang D. L., Nagano T., Aida T. and Kataoka K. Light-Harvesting Ionic Dendrimer Porphyrins As New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Bioconjug Chem** 14: pp 58-66, 2003.

Ohno, O., Kaizu, Y., and Kobayash, H. J-aggregate formation of water-soluble porphyrin in acidic aqueous media. **J.Chem.Phys.** 99[5], pp 4128-4139. 1993.

Osborne, D.W., Ward, A.J.L., O'Neill, K.J. Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 43, pp 451-454, 1991.

Pankerdt, R.J., Stella, V.J. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. **J. Parent. Sci. Technol.** v. 44, pp 139-149, 1990.

Paolino D.; Ventura C.A.; Nistico, S.; Puglisi, G.; Fresta M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. **Int J Pharm.** v. 244, pp 21-31, 2002.

Paulo P.M. and Costa S. M. Non-Covalent Dendrimer-Porphyrin Interactions: the Intermediacy of H-Aggregates? **Photochem Photobiol Sci** 2: pp 597-604, 2003.

Paulo P.M. and Costa S. M. Interactions in Noncovalent PAMAM/TMPyP Systems Studied by Fluorescence Spectroscopy. **J Phys Chem B** 109: pp 13928-13940, 2005.

Peltola S., Saarinen-Savolainen P., Kiesvaara J., Suhonen T. M. and Urtti A. Microemulsions for Topical Delivery of Estradiol. **Int J Pharm** 254: pp 99-107, 2003.

Peng Q., Warloe T., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Giercksky K. E. and Nesland J. M. 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy. Clinical Research and Future Challenges. **Cancer** 79: pp 2282-2308, 1997.

Phipps, J. B., Padmanabhan, R. V., Lattin, G. A., 1988. Transport of ionic species through skin. **Solid State Ionics**. 28-30: 1778-1783.

Pikal, M.J. The role of electroosmotic flow in transdermal and iontophoresis. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.46, p.281-305, 2001.

Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C. R. A., Granchi, D., and Savarino, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical Materials** 15, pp 173-190. 1994.

Prieto M.J., Bacigalupe D., Pardini O., Amalvy J. I., Venturini C., Morilla M. J. and Romero E. L. Nanomolar Cationic Dendrimeric Sulfadiazine As Potential Antitoxoplasmic Agent. **Int J Pharm** 326: pp 160-168, 2006.

Rhodes, L.E.; Tsoukas, M.M.; Rox Anderson, R.; Kollias, N. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin. **J. Invest. Dermatol.** v.108: pp 97-91,1997.

Roberts J.C., Bhalgat M. K. and Zera R. T. Preliminary Biological Evaluation of Polyamidoamine (PAMAM) Starburst Dendrimers. **J Biomed Mater Res** 30: pp 53-65, 1996.

Rogers D.W., Lanzafame R. J., Hinshaw J. R. and Qiu K. Effect of Argon Laser and Photofrin II on Murine Neuroblastoma Cells. **J Surg Res** 50: pp 266-271, 1991.

Sakthivel T., Toth I. and Florence A. T. Distribution of a Lipidic 2.5 Nm Diameter Dendrimer Carrier After Oral Administration. **Int J Pharm** 183: pp 51-55, 1999.

Schulmafab, U., Neubert, R., and Wohlrab, W. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. **J.Control.Release.** 46[3], pp 279-285. 1997.

Schulman J.H., Steckenius W. and Prince L. M. Mechanism of Formation and Structure of Micro-Emulsions by Eletron Microscopy. **J Phys Chem** 63: pp 1677-1680, 1959.

Sharma S., Jajoo A. and Dube A. 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-IX Accumulation and Associated Phototoxicity in Macrophages and Oral Cancer Cell Lines. **J Photochem Photobiol B** 88: pp 156-162, 2007.

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.

Shukla A., Krause A. and Neubert R. H. Microemulsions As Colloidal Vehicle Systems for Dermal Drug Delivery. Part IV: Investigation of Microemulsion Systems Based on a Eutectic Mixture of Lidocaine and Prilocaine As the Colloidal Phase by Dynamic Light Scattering. **J Pharm Pharmacol** 55: pp 741-748, 2003.

Silverstein R.M., Webster F. X. and Kiemle D. J. Espectroscopia de RMN de Hidrogênio, in **Identificação Espectrométrica De Compostos Orgânicos**. LTC Editora ed, Rio de Janeiro, 2007, pp 123-197.

Singh, P., Maibach, H. I., Iontophoresis : an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**. 18: pp 379-394,1996.

Sintov A.C. and Brandys-Sitton R. Facilitated Skin Penetration of Lidocaine: Combination of a Short-Term Iontophoresis and Microemulsion Formulation. **Int J Pharm** 316: pp 58-67, 2006.

Sivash A.A., Masinovsky Z. and Lozovaya G. I. Surfactant Micelles Containing Protoporphyrin IX As Models of Primitive Photocatalytic Systems: a Spectral Study. **Biosystems** 25: pp 131-140, 1991.

Smith, K. M. **Porphyrins and metalloporphyrins**. pp 265-268. Amsterdam, Elsevier, 1975.

Subramony, J. A., Sharma, A., Phipps, A. S. Microprocessor controlled transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 317: 1-6, 2006.

Svenson S. and Chauhan A. S. Dendrimers for Enhanced Drug Solubilization. **Nanomed** 3: pp 679-702, 2008.

Svenson S. and Tomalia D. A. Dendrimers in Biomedical Applications--Reflections on the Field. **Adv Drug Deliv Rev** 57: pp 2106-2129, 2005.

Szeimies, R. M.; Karrer, S.; Sauerwald, A.; Landthaler, M. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study. **Dermatology**. v. 192, p. 246-251, 1996.

Szeimies, R.M.; Sassy, T.; Landthaler, M. Penetration potency of topical applied 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.** v.59, p.73-76, 1994.

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

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

Tomalia, D.A. Dendrimer molecules, **Sci. Am.** v.272 pp 62–66, 1995.

Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J. and Smith P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. **Polymer Journal** 17: pp 117-132, 1985.

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, pp 138– 175, 1990.

Trepte O, Rokahr I, Andersson-Engels S and Carlsson K (1994) Studies of Porphyrin-Containing Specimens Using an Optical Spectrometer Connected to a Confocal Scanning Laser Microscope. **J Microsc** 176: pp 238-244.

Vandamme T.F. and Brobeck L. Poly(Amidoamine) Dendrimers As Ophthalmic Vehicles for Ocular Delivery of Pilocarpine Nitrate and Tropicamide. **J Control Release** 102: pp 23-38, 2005.

Venuganti V.V. and Perumal O. P. Effect of Poly(Amidoamine) (PAMAM) Dendrimer on Skin Permeation of 5-Fluorouracil. **Int J Pharm** 361: pp 230-238, 2008.

Vrouenraets M.B., Visser G. W., Loup C., Meunier B., Stigter M., Oppelaar H., Stewart F. A., Snow G. B. and van Dongen G. A. Targeting of a Hydrophilic Photosensitizer by Use of Internalizing Monoclonal Antibodies: A New Possibility for Use in Photodynamic Therapy. **Int J Cancer** 88: pp 108-114, 2000.

West .CM. Size-Dependent Resistance of Human Tumour Spheroids to Photodynamic Treatment. **Br J Cancer** 59: pp 510-514, 1989.

Wolf, P.; Kerl, H. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid: a promising concept for the treatment of cutaneous tumors . **Dermatology.** v.190, p. 183-185, 1995.

Wooley, K. L., HAWKER, C. J., and FRECHET, J. M. J. Physical Properties of Dendritic Macromolecules: A Study of Glass Transition Temperature. **Macromolecules** 26, pp 1514-1519. 1993.

Wu H., Ramachandran C., Bielinska A. U., Kingzett K., Sun R., Weiner N. D. and Roessler B. J. Topical Transfection Using Plasmid DNA in a Water-in-Oil Nanoemulsion. **Int J Pharm** 221: pp 23-34, 2001.

Yanase S., Nomura J., Matsumura Y., Nagai K., Kinoshita M., Nakanishi H., Ohnishi Y., Tokuda T. and Tagawa T. Enhancement of the Effect of 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy by Simultaneous Hyperthermia. **Int J Oncol** 27: pp 193-201, 2005.

Yang H., Morris J. J. and Lopina S. T. Polyethylene Glycol-Polyamidoamine Dendritic Micelle As Solubility Enhancer and the Effect of the Length of Polyethylene Glycol Arms on the Solubility of Pyrene in Water. **J Colloid Interface Sci** 273: pp 148-154, 2004.

Yang W., Li Y., Cheng Y., Wu Q., Wen L. and Xu T. Evaluation of Phenylbutazone and Poly(Amidoamine) Dendrimers Interactions by a Combination of Solubility, 2D-NOESY NMR, and Isothermal Titration Calorimetry Studies. **J Pharm Sci.** Epub ahead of print, 2008.

Yiyun C., Tongwen X. and Rongqiang F. Polyamidoamine Dendrimers Used As Solubility Enhancers of Ketoprofen. **Eur J Med Chem** 40: pp 1390-1393, 2005.

Yoo H. and Juliano R. L. Enhanced Delivery of Antisense Oligonucleotides With Fluorophore-Conjugated PAMAM Dendrimers. **Nucleic Acids Res** 28: pp 4225-4231, 2000.

Yoo H., Sazani P. and Juliano R. L. PAMAM Dendrimers As Delivery Agents for Antisense Oligonucleotides. **Pharm Res** 16: pp 1799-1804, 1999.

Zhang, X., SAZAKI, K., and KURODA, Y. Characterization of Magnesium Porphyrins and Aggregation of Porphyrins in Organic Solvent. **Bull.Chem.Soc.Jpn.** 80[3], pp 536-542. 2007.