

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 Ciancaglini 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).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

