UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele:
avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas**

Wagner Luiz Heleno Marcus Bertolini

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Wagner Luiz Heleno Marcus Bertolini

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu pudesse alcançar este momento. Todos que participaram, de qualquer forma que tenha sido, creio que deixaram um pouco de si para que eu realizasse mais uma etapa em minha vida.

Em especial à minha esposa Lucimara e à minha filha Ludmila.

AGRADECIMENTOS

Em momentos de agradecimentos muitas vezes podemos ser injustos e incorrer no erro de esquecimento de alguém que tenha contribuído. Porém, àqueles que participaram mais frequentemente e contribuíram em vários aspectos e etapas deste trabalho, meu mais simples e sincero obrigado.

Ao técnico de laboratório José Oreste Del Ciampo, o primo, pela ajuda principalmente nas dermatomizações.

Ao técnico de laboratório Henrique Diniz, o primo II, pela ajuda no que se refere aos animais do biotério, entre outras.

Às colegas doutorandas Fábria Rosseti e Aline Carollo pelo auxílio e disposição em me ajudarem nas técnicas empregadas.

Um agradecimento especial à minha orientadora Vitória que, no início desta tese era minha orientadora e já no decorrer desta não era mais: havia se tornado uma referência em minha vida pessoal, me incentivando em momentos muito difíceis a seguir em busca da realização pessoal e da felicidade que alcancei ao me tornar pai.

À minha esposa Lucimara, que sempre me orienta, me ensina, me fortalece e contribui das mais diversas formas.

Às colegas Ana Luiza Degani e Raquel Tassara, que me auxiliaram e me incentivaram a não desistir da batalha deste trabalho.

E agradecer a Deus pelo presente ofertado, que foi a chegada de minha filha Ludmila. Chegou como um raio de luz irradiando felicidade e alegria a todos que a conhecem. E agora, também, pela conclusão de mais uma etapa em minha vida acadêmica.

Muito Obrigado a todos!!!!!!

EPÍGRAFE

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RESUMO

BERTOLINI, WAGNER L. H. M. **A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas.** 2009 118f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O câncer é a segunda doença principal do planeta, muito próximo de se tornar a mais incidente. Os tratamentos tradicionais do câncer, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia apresentam severos efeitos colaterais ao paciente devido à citotoxicidade que podem causar às células normais, além das cancerosas. Objetivando minimizar estes efeitos indesejáveis pesquisadores de diversas áreas afins vislumbram novas técnicas, novos tipos e formas de tratamentos que apresentem um melhor perfil terapêutico; que possam agir de forma mais seletiva contra as células cancerosas, minorando os efeitos indesejáveis em relação às células saudáveis. Dentre as técnicas pesquisadas destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta é uma técnica de tratamento nova e promissora. A técnica do tratamento consiste em aplicar, no tecido alvo, substâncias fotossensibilizantes, posteriormente ativadas com luz de comprimentos de onda específicos, com a finalidade de produzir destruição celular, por meio da ação de produtos citotóxicos fotoativados. Destaca-se a seletividade apresentada pela técnica, que deve ser reconhecida como uma das vantagens entre as técnicas empregadas no tratamento do câncer. O presente trabalho objetiva verificar a influência do D-limoneno como promotor de permeação do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) em aplicação tópica. Isto visa aumentar a permeação do 5-ALA quando aplicado topicamente. O 5-ALA é convertido a protoporfirina-IX (PpIX) pela via do ciclo Heme. Esta é um potente agente fotossensibilizador endógeno. O interesse no uso deste promotor foi aumentar a taxa de penetração do 5-ALA, possibilitando a permeação de maiores quantidades do fármaco em questão. Para isto foram realizados estudos de permeação *in vitro* do 5-ALA, em concentração de 1% (p/p) utilizando-se formulações (emulsões O/A) com diferentes concentrações do promotor D-limoneno (0, 5, 10, 20 e 30%), (p/p). Observou-se que o fluxo *in vitro* do 5-ALA através da pele de orelha de porco aumentou para todas as formulações empregadas quando comparado ao controle, sem D-limoneno, para um período de estudo de 12h. A retenção no estrato córneo e na [epiderme + derme] apresentou aumento

significativo, evidenciando, assim, um efeito eficiente do D-limoneno como promotor. Experimentos *in vivo* foram conduzidos em camundongos objetivando a análise do efeito da formulação na produção e acúmulo de PpIX na pele. Observou-se que o D-limoneno aumentou significativamente a quantidade de PpIX extraída da pele. Os resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram o potencial do D-limoneno como promotor de absorção cutânea para o 5-ALA para a TFD tópica do cancer de pele.

Palavras chave: 1. câncer de pele. 2. Terapia fotodinâmica. 3. promotor de permeação. 4. D-limoneno. 5- Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)

ABSTRACT

BERTOLINI, WAGNER L. H. M. D-limonene influence in the cutaneous penetration enhancer for 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: *in vitro* and *in vivo skin* permeation and retention studies. 2009 118f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The topical administration of 5-ALA has been distinguished on skin cancer photodynamic therapy (PDT) because of its efficiency in the treatment of tumors and the reduced phototoxic collateral effects. However, this effectiveness is limited by its low penetration in the skin. A proposal to optimize the 5-ALA penetration in the skin is the use of cutaneous penetration enhancers, which seek to alter the cutaneous barrier for many bioactive molecules. The aim of this work was the pharmaceutical development of formulations containing D-limonene as a cutaneous penetration enhancer, seeking the increase of the cutaneous penetration of 5-ALA for skin cancer PDT. The *in vitro* flux of 5-ALA present in 1% (w/w) from different formulations containing D-limonene (20 e 30% w/w) was significantly increased after 12 hours of experiment, in comparison with formulations without D-limonene, mainly for the formulations containing 20% and 30% of D-limonene with 1% of 5-ALA (1,45 and 2,01 times, respectively). The stratum corneum (SC) and [epidermis + dermis] without SC retention were also significantly increased, showing an enhancer effect of the promoter. In addition, *in vivo* experiments were accomplished in mice, with the purpose of analyzing the formulation effect on the PpIX production and accumulation in the skin. It was observed that the penetration enhancer's presence significantly increased the amount of PpIX extracted from the skin. Both *in vitro* and *in vivo* results showed the potentiality of the formulations containing D-limonene as a cutaneous penetration enhancer for 5-ALA delivery on the skin cancer PDT.

Key words: 1) 5-aminolevulinic acid. 2) D-limonene. 3) Photodynamic therapy. 4) penetration enhancers. 5) Skin cancer

1. INTRODUÇÃO

A palavra câncer (neoplasia) está associada ao sinônimo de sequelas, sofrimento e morte, para a maioria das pessoas. A desinformação ou falta do uso de métodos de prevenção, por parte da população, constitui uma das principais barreiras para enfrentar esse mito e prevenir a atual situação do câncer no Brasil e no mundo: a segunda causa de morte por doença.

As neoplasias podem ser definidas como proliferações desorganizadas de células, que apresentam um crescimento autônomo e perda da diferenciação celular. Este tipo de célula evolui independentemente dos mecanismos que, normalmente, controlam a proliferação e a diferenciação celular, transformando o organismo em uma espécie de hospedeiro de células neoplásicas. Os agentes causadores das neoplasias podem ser físicos, químicos ou biológicos, sendo responsáveis por modificações genéticas das células que proliferam sem controle (LOPEZ *et al.*, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), se medidas urgentes não forem tomadas, o câncer passará a ocupar o primeiro lugar em mortalidade até 2020, principalmente nos países em desenvolvimento.

Cerca de dois milhões de novos casos são diagnosticados anualmente no mundo todo, e a expectativa é de que esses números continuem a aumentar (NA *et al.*, 2001). A maior parte está associada à exposição excessiva a radiação ultravioleta e, por isso, os cânceres de pele são mais comuns na face e nas áreas do corpo que ficam mais expostas (MELNIKOVA *et al.*, 2005).

O câncer de pele é um dos tipos mais frequentes da doença no Brasil. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (Inca) do Ministério da Saúde, mais de 113 mil pessoas apresentarão diagnóstico positivo da doença neste ano, no país. Nos Estados Unidos, o número de novos casos beira um milhão de pessoas com câncer todos os anos. Um estudo coordenado por dermatologista da Mayo Clinic, nos Estados Unidos da América, revelou que nos últimos 30 anos houve um aumento de 74% no número de pessoas com menos de 40 anos com câncer de pele. Apesar de o câncer de pele surgir com mais frequência na cabeça e no pescoço (90%), o estudo mostrou que em 40% dos casos a doença aparece em outras partes do corpo, refletindo os descuidos durante o banho de sol (CHRISTENSON *et al.*, 2005).

O aumento do número de casos de câncer de pele decorre do aumento da exposição solar, seguida do descuido com fatores de fotoproteção e falta do uso de medidas de prevenção por parte de grande parcela da população. É muito comum

caso de exposição solar em períodos de grande incidência de raios UV, principalmente em banho de sol entre 10h e 15h (PARRISH *et al.*, 1978). Grande parte das pessoas parece não compreender as consequências devastadoras, aliadas à negligência do uso diário do protetor solar. Tais protetores devem ser, geralmente, superiores ao Fator de Proteção Solar (FPS) 15.

Sabe-se que a exposição à radiação ultravioleta promove alguns efeitos benéficos como: aquecimento corpóreo e síntese de vitamina D, que promove a retenção de cálcio nos ossos; ação antidepressiva e efeito fotoprotetor, que em doses moderadas estimula a síntese de melanina. Esta exposição à radiação ultravioleta pode também provocar inúmeros efeitos danosos como: queimaduras, fotoenvelhecimento e cânceres de pele, dependendo da exposição (PATEL *et al.*, 1992; HORRIOT *et al.*, 1995; BERSET *et al.*, 1996; VANQUERP *et al.*, 1999).

A exposição à radiação UV está associada ao desenvolvimento de tumores cutâneos, particularmente o carcinoma celular escamoso, o carcinoma basocelular e o melanoma (PERLIS & HERLYN, 2004).

Pesquisas nesta área mostram que a radiação UV pode danificar o DNA e o material genético, pode causar lipoxidação levando à produção de radicais livres, causar inflamação; romper a comunicação celular; modificar a expressão gênica em resposta ao estresse e enfraquecer a resposta imune da pele (RANGARAJAN e ZATZ, 2003). Além disso, aumenta o risco de câncer cutâneo, promove o fotoenvelhecimento e exacerba dermatoses fotossensíveis (TAYLOR *et al.*, 1990; WOLF *et al.*, 1993).

O DNA é a biomolécula mais afetada pela radiação UV, pois apresenta maior absorção do comprimento de onda nessa faixa de emissão. Existe uma estreita relação entre os comprimentos de onda ultravioleta provenientes da luz solar e sua participação na geração destas doenças na pele, especialmente nos melanócitos, células escamosas e basais. Ainda não estão bem elucidados ou correlacionados os comprimentos de onda e os mecanismos de ação envolvidos.

1.1. A radiação UV e a pele

O espectro eletromagnético da radiação solar compreende desde os curtos raios cósmicos até as longas ondas de rádio. A radiação não ionizante compreende a ultravioleta (UV), com comprimento de onda entre 100 e 400 nm, a luz visível, de 400 a 800 nm e a infravermelha, de 800 a 1700 nm (Figura 1).

A radiação ultravioleta é um poderoso agente etiológico da maioria dos casos de câncer de pele humano (ELDER, 1989; JHAPPAN *et al.*, 2003). É, todavia, a principal responsável pelos fotodanos cutâneos e é dividida em três categorias: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) (EPSTEIN, 1990).

Figura 1: Características dos raios ultravioleta quanto à incidência na Terra. Disponível em: www.solamigo.org; obtido em 28/09/2007.

Os raios UVC não atingem a superfície da Terra em quantidade significativa, pois são filtrados na camada de ozônio. Portanto, podem se constituir em risco para as populações de países que sofrem deterioração da camada de ozônio (em que poderíamos citar a Austrália). Pode, assim, tornarem-se perigosos (KOH e LEW, 1994).

A radiação ultravioleta, especialmente a radiação UVB, que é a maior carcinogênica para o homem (GREEN *et al.*, 1999), é a principal responsável pelo desenvolvimento do câncer da pele. Provoca mutação no DNA com ativação de oncogenes e supressão de respostas imunes locais.

Os raios ultravioletas tipo B (UVB) têm comprimento de onda entre 290 e 320nm, ultrapassam a camada de ozônio, atingem a pele, penetrando até a camada

basal da epiderme e causam principalmente danos diretos ao DNA, tais como, dímeros pirimidínicos, os quais podem promover mutações que podem levar à carcinogênese (MACCUBBIN *et al.*, 1995; LARSSON *et al.*, 2005); podem causar eritema, imunossupressão, inibição da síntese de DNA, RNA, alterações da síntese de proteínas, lise das membranas celulares e mutação celular, nos casos de carcinomas de células basais e escamosas. Sua incidência aumenta consideravelmente durante o verão, especialmente nos horários entre 10 e 16 horas, quando a intensidade dos raios atinge o seu máximo.

Estes raios são parcialmente bloqueados pela camada de ozônio. A diminuição de 1% desta provoca o aumento de 2% da radiação UVB na superfície do planeta, o que gera uma elevação potencial da incidência de câncer de pele (http://www.fismed.ufrgs.br/sol_efeitos.htm, acessado em dezembro 2008).

A exposição prolongada a estes raios sem os devidos cuidados e medidas de proteção podem desencadear a doença do câncer de pele no indivíduo. A excessiva exposição solar da população durante a segunda metade do século passado é a principal causa do aumento na prevalência do câncer de pele (URBACH, 1991; ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Os raios ultravioletas tipo A (UVA) compõem a maior parte do espectro ultravioleta (formado por raios tipo A, B e C) e possuem intensidade constante durante todo o ano, atingindo a pele praticamente da mesma forma durante o inverno ou o verão. Sua intensidade também não varia muito ao longo do dia, sendo pouco maior entre 10 e 16 horas que nos outros horários do dia. Têm comprimento de onda entre 320 a 400 nm (a luz visível vai de 400 a 800 nm). Penetram profundamente na pele, sendo o principal responsável pelo fotoenvelhecimento. Tem importante participação nas fotoalergias e também predispõe o indivíduo ao surgimento do câncer de pele.

Os raios UVA induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), acarretando danos às membranas celulares e, também, danos ao DNA, principalmente na forma de quebra da fita e ligação cruzada proteína-DNA (GODAR *et al.*, 1993). Interação indiretamente na derme reticular, induzindo a produção de radicais livres que podem causar envelhecimento precoce ou fotoenvelhecimento e indução tumoral (MATSUI e DELEO, 1991; KOH e LEW, 1994; PACKER, 1994; LINGE, 1996; SCHARFETTNER-KOCHANNEK *et al.*, 1997). Além disso, a radiação UVA induz a produção do gene supressor tumoral p53 e danos ao DNA (BURREN *et*

al., 1998), imunossupressão (DUMAY *et al.*, 2001) e instabilidade genômica (PHILIPSON *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos associam o melanoma à exposição intensa à luz solar na infância e, principalmente, ocasionado pela exposição à radiação UVA (MOAN *et al.*, 1999). Apesar de serem menos carcinogênicos do que os UVB, proporcionalmente, os raios UVA atingem de 10 a 100 vezes mais a superfície da Terra (HERBERT, 1983).

Apesar de que qualquer pessoa possa ser acometida pela doença, algumas pessoas fazem parte de um grupo de maior risco. Existem vários fatores que podem contribuir para tal. Dentre estes fatores de risco poderíamos citar algumas características físicas destas pessoas tais como apresentarem pele, olhos e cabelos claros do que em pessoas de pele escura (ARMSTRONG; KRICKER, 2001); pessoas que apresentam geralmente queimaduras decorrentes da exposição solar, apresentando menor efeito de bronzeamento, indivíduos com uma exposição ao sol por períodos prolongados, seja por motivo de lazer ou por exigência ocupacional, e os que possuem história familiar de tumor na pele (CUMMINGS *et al.*, 1997).

Existem vários outros fatores que poderíamos citar, entre estes: o fator fenotípico, a exposição contínua ao sol (sendo este o fator que mais contribui para o surgimento da doença) sem as devidas medidas de fotoproteção, predisposição genética, exposição à radiação ionizante, exposição a carcinógenos químicos, tais como, o tabaco, hidrocarbonetos industriais, fuligem e arsênio (BARON & GREENBERG, 2000; GOTTLÖBER *et al.*, 1999); exposição a certos subtipos de papiloma vírus humano (HUMPHREYS, 2001).

Pessoas que vivem em países tropicais, como Brasil e Austrália (país com o maior registro de câncer de pele no mundo) estão mais expostas a esse tipo de doença (URBACH, 1997; GREEN *et al.*, 1996). O Quadro 1 relaciona os efeitos decorrentes da exposição prolongada ao sol.

Quadro 1: Efeitos do excesso de sol sobre a pele e os olhos

EFEITOS/DOENÇAS	SINTOMAS/OBSERVAÇÕES
1. Fotoenvelhecimento	Pele ressecada
2. Fitofotodermatite (pelo trabalho com plantas, tintas e ceras)	Prurido e hiperemia na pele
3. Queimaduras solares	Eritemas de vários graus
4. Dermatites de contato (pelo uso de inseticidas e fungicidas)	Prurido e hiperemia na pele
5. Câncer de pele (carcinoma e melanoma)	Lesões hipercrônicas na pele
6. Insolação	Tonturas, vertigens, tremores, delírios e convulsões.
7. Prostração térmica	Dor de cabeça, tonturas, mal estar, fraqueza e inconsciência
8. Redução da defesa imunológica	Infecções de repetição, leucopenia
9. Catarata	Perda de visão (cristalino opaco)
10. Pterígio	Conjuntivite solar
11. Pindécua	Tumor na pálpebra

Fonte: www.solamigo.org em 28/09/2007.

1.2. Tipos de Câncer de pele

Os três tipos mais comuns de câncer de pele são os denominados de câncer tipo basocelular e espinocelular (câncer do tipo não-melanoma) e melanoma cutâneo maligno (melanoma) (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Os tumores cutâneos malignos não-pigmentados são representados principalmente por dois tipos de alteração do epitélio: o carcinoma basocelular (BCC) e o carcinoma espinocelular (ECC). Estes tipos representam o mais comum e mais grave dentre os tipos de neoplasma maligno em humanos (BASTIAENS *et al.*, 1998, GROSSMAN & LEFFELL, 1997). Dentre estes tipos de carcinomas o basocelular é o mais incidente, quando comparado ao espinocelular. A ocorrência destes tipos vem aumentando progressivamente, acarretando uma sobrecarga no sistema de saúde em todo o mundo (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). No Brasil o BCC continua sendo o tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos. Apesar de apresentar bom prognóstico a ocorrência destes deixam sequelas na maioria das vezes, o que contribui para onerar os serviços de saúde.

O número de casos novos estimados para o Brasil em 2008 e também 2009 é de 55.890 casos em homens e de 59.120 casos novos em mulheres. Estes valores referem-se aos casos de câncer do tipo não melanoma. Estes valores correspondem a um risco estimado de 59 casos novos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres (INCA/MS 2009).

O risco estimado por sexo e região para este tipo de câncer, segundo o INCA/MS para 2008 e a previsão para 2009 está apresentado na Tabela 1.

A incidência do câncer tipo melanoma aumentou abruptamente nos últimos 50 anos, atingindo principalmente populações de pele branca (AUTIER, 2004). No Brasil é o tipo de câncer de pele menos freqüente, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa (2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul do país (INCA/MS 2008).

Tabela 1: Incidência de casos de câncer de pele por sexo afetado e regiões do país (para cada 100.000 habitantes) em 2006 e previsão para 2008/2009.

Região do país	Homens		Mulheres	
	2006	2008	2006	2008/2009
Sul	89	82	93	82
Sudeste	70	68	69	64
Centro-Oeste	52	45	73	64
Nordeste	44	47	50	53
Norte	32	27	32	28

Fonte: INCA/2009 <http://www.inca.gov.br>

1.2.1. Carcinoma basocelular (BCC)

O BCC (Figura 2) é originário da epiderme e dos apêndices cutâneos acima da camada basal, como os pêlos, por exemplo, (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004).

Figura 2: BCC (A), forma plano-superficial (B) e forma nódulo-ulcerativa (C).
Fonte: (A) <http://www.dermatologia.net> acesso em 29/01/2008 às 18:56h e (B e C) INCA/MS, 2008

É um tumor que raramente entra em metástase. Pode se manifestar de várias maneiras. Feridas que não cicatrizam ou lesões que sangram com facilidade devido a pequenos traumatismos, como o roçar da toalha, podem ser um BCC. Acomete, principalmente, a região da cabeça e pescoço e está relacionado à intensa exposição solar (SHELTON, 2001; LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). Embora não seja letal, pode ocasionar desfiguração e morbidade devido à destruição do tecido local ou como resultado de tratamento cirúrgico (HOWELL *et al.*, 2005). É um tipo de câncer mais comum em adultos, acima dos 40 anos. Porém, não são raros os casos de pessoas com menos de 30 anos. Observa-se a ocorrência principalmente em pessoas de pele clara, que se queimam facilmente e apresentam sardas (HUMPHREYS, 2001).

1.2.2. Carcinoma espinocelular (ECC)

O ECC (Figura 3), também conhecido como carcinoma epidermóide, é bem menos freqüente que o basocelular. Tem origem no queratinócito da epiderme, podendo também surgir no epitélio escamoso das mucosas (LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004). É um tipo de tumor que tem crescimento mais rápido e a lesão maior pode, diferentemente do basocelular, ser mais agressivo e entrar em metástase. Apresenta como regiões mais afetadas o pescoço e a cabeça, sendo que os indivíduos de cor branca e a exposição solar excessiva são os fatores de risco (SHELTON, 2001; LAUTH; UNDEN; TOFTGARD, 2004).

Figura 3: Câncer de pele tipo espinocelular.

Fonte: www.dermatologia.net, obtida em 17/09/2007

É comum acometer áreas de mucosa aparente, como a boca ou o lábio, cicatrizes de queimaduras antigas ou áreas que sofreram irradiação (raios X). Pode ocorrer, também, a partir de ceratoses actínicas, que são lesões pré-cancerosas decorrentes da exposição prolongada e repetida da pele ao sol.

Este tipo de câncer acomete indivíduos de pele clara. Porém, é mais comum do que o tipo basocelular em indivíduos não-brancos. Em indivíduos de pele clara está relacionado com histórico de queratose actínica e ocorre predominantemente em homens e mulheres acima dos 40 anos (HUMPHREYS, 2001).

1.2.3. Melanoma

O melanoma cutâneo (Figura 4) é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele).

Figura 4: Imagens de melanomas.

Fonte: www.gbm.org.br

Embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele (portanto, menos freqüente do que os outros tumores de pele anteriormente citados), o melanoma é o mais grave devido à alta possibilidade de formação de metástases (FOUNDATION SKIN CANCER, 2006). Sua letalidade é mais elevada (INCA, 2006), pois é um câncer mais agressivo (Figura 5). Por isto, é de extrema importância o diagnóstico precoce para a sua cura.

Figura 5: Dados estatísticos referentes à incidência e mortalidade dos diferentes tipos de câncer de pele.

Apesar de ser mais freqüente nas áreas da pele comumente expostas ao sol, o melanoma também pode ocorrer em áreas de pele não expostas. Este tipo de câncer apresenta algumas características básicas (Figura 6) tais como: assimetria (formato irregular), bordas irregulares (limites externos irregulares), coloração variada (uma mesma lesão apresentando várias cores: preta, castanho, branca, avermelhada ou azul) e diâmetro maior que 6 milímetros.

Tal tipo de câncer possui alto potencial de mortalidade e sua incidência aumentou muito nas últimas décadas. Ocorre principalmente entre 40 e 60 anos, porém, 20% dos pacientes possuem menos de 40 anos. Acomete o tronco e as pernas nos homens e mulheres, respectivamente (BRUCE; BRODLAND, 2000).

Figura 6: Câncer de pele tipo melanoma e suas características e metástase em perna de uma paciente. Fontes: www.dermatologia.net, obtida em 17/09/2007; www.pathguy.com(Metástase); www.ariyan.com/pix/Services/melanoma.

1.2.4. Tratamento e Prevenção

Os tratamentos tradicionais do câncer, tais como, cirurgia, radioterapia e quimioterapia apresentam severos efeitos colaterais ao paciente devido à citotoxicidade que podem causar às células normais, além das cancerosas.

Objetivando minimizar estes efeitos indesejáveis pesquisadores de diversas áreas afins vislumbram novas técnicas, novos tipos e formas de tratamentos que apresentem um melhor perfil terapêutico, que possam agir de forma mais seletiva contra as células cancerosas, minorando os efeitos indesejáveis em relação às células saudáveis (SHARMAN, VAN LIER; ALLEN, 2004). Ressalta-se, ainda, o impacto econômico decorrente dos custos com o seu tratamento, que envolve tecnologia sofisticada e qualificação específica de recursos humanos.

O tratamento de tumores malignos não-pigmentados geralmente é feito através de aplicação de laser, eletrodissecção, criocirurgia, cirurgia, radioterapia ou quimioterapia tópica (empregando-se os compostos 5-fluoracil e podofilina). Tais terapias apresentam alto custo. Podem apresentar taxa de recidiva por volta de 10% e, normalmente, suas cicatrizes apresentam áreas com hipo ou hiperpigmentação. Outros efeitos colaterais podem ocorrer, tais como processos inflamatórios graves, dor e irritação. Estes efeitos podem permanecer por várias semanas (WAGNIERES *et al.*, 1998; DE ROSA & BENTLEY, 2000).

A quimioterapia é um tratamento à base de fármacos citotóxicos que impedem a proliferação celular, principalmente das células neoplásicas que possuem uma alta velocidade de crescimento. Entretanto, a quimioterapia também afeta células normais desencadeando uma série de efeitos colaterais como diarreia, dores abdominais, úlceras, emese e queda de cabelo.

A radioterapia induz morte celular por ação de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnética (raios X ou gama) ou particulada (partículas α e β , prótons e nêutrons), que eliminam o tecido neoplásico. Entretanto, a radiação atinge os tecidos normais causando reação inflamatória local como cistite, dermatite e retinite.

A cirurgia é utilizada para a retirada de tecidos neoplásicos localizados e não é indicada para casos de metástase. Tais tratamentos clássicos são demorados e causam desgaste e sofrimento aos pacientes e familiares. Por isto, necessita-se de técnicas terapêuticas que visem minimizar ou eliminar estes efeitos colaterais indesejados, buscando melhores resultados estéticos, eficientes, menos destrutivos, não agravando casos de pacientes com varias lesões (PENG *et al.*, 1995; WENBERG *et al.*, 1996, SZEIMIES *et al.*, 1996; ZEITOUNI *et al.*, 2001; STENDER; WULF, 1996; SZEIMIES; KARRER, 1996).

A prevenção do câncer de pele, inclusive os melanomas, inclui ações de prevenção primária por meio de proteção contra luz solar. Tais ações demonstraram serem efetivas e de baixo custo (CARDINEZ *et al.*, 2004; AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2004). A prevenção secundária, através de exame dermatológico cuidadoso, também é indicada, tendo a vantagem adicional de permitir o diagnóstico precoce de melanoma de pele em sua fase inicial, reduzindo a morbidade e mortalidade desta doença (MANNE *et al.*, 2004; HUMPHREYS, 2001).

1.3. Terapia Fotodinâmica

1.3.1. Um breve Histórico

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que pode ser considerada “recente” na ciência e na terapêutica, pois teve aplicação científica a partir de metade do Século XX. Porém, o uso da luz para algum tipo de terapia é muito antigo. Consta que há mais de 4.000 anos os egípcios e orientais foram os precursores no uso desta terapia, por eles denominada de Helioterapia (Hélio em alusão ao Deus Sol) (MOAN & PENG, 2003) através da ingestão de alguns tipos de plantas concomitante à exposição à luz solar, para tratar várias doenças, em que poderíamos citar o vitiligo (BUDAVARI, 1989; STERNBERG, 1998).

Em 1900, Raab descreveu a ação de corantes acridina e luz solar sobre *Paramecia*, demonstrando que este organismo unicelular pode morrer sob essas condições.

Vários pesquisadores realizaram diferentes trabalhos vislumbrando o uso de luz e de corantes para tratamentos de algumas doenças. Entre estes poderíamos citar Finsen, cura de *Lupus vulgaris*, em 1901; Trappeiner, em 1903, realizou aplicação tópica do corante eosina e propôs o tratamento de um câncer de pele; Meyer-Betz, em 1913, com um auto-experimento em que injetou uma substância que pensava ser hematoporfirina apresentando resultado somente após se expor à luz, com fotossensibilidade na pele por vários meses; Policard (1924), estudou porfirinas visando a produção de fototoxicidade, principalmente em tumores malignos; Bonnett (1999) buscou a cura da varíola e tuberculose; ALLISON *et al.*, (2004) visaram a cura da varíola e tuberculose.

Durante o transcorrer dos tempos vários outros estudos foram realizados. Diversas substâncias foram empregadas buscando atingir melhores resultados do processo. Um dado importante desta técnica é que se observou um acúmulo preferencial destes fotocompostos em tumores implantados em camundongos e ratos e que a incidência de luz proporcionava regressão da doença, conforme observou Schwartz na década de 60. Baseado nestes resultados, Lipson obteve sucesso no tratamento de câncer de mama através da irradiação seletiva do tumor, tornando-se este caso um marco inicial da TFD como terapia clínica para câncer.

Doughert e colaboradores, em 1978, realizaram o primeiro estudo clínico sistemático de lesões malignas utilizando a técnica fotoquímica. Eles empregaram

um agente sensibilizante, luz e oxigênio combinados para destruição de um tecido tumoral (DOUGHERT *et al.*, 1978).

Os compostos porfirínicos tiveram seus estudos iniciados em meados dos anos 70 para uso em TFD, culminando com o desenvolvimento do Photofrin II[®] (refinamento do HpD) por Dougherty. O Photofrin[®] é o único medicamento aprovado (no final de 1998) pela FDA/EUA (Food and Drug Administration) para o tratamento do câncer com a técnica de TFD.

Deseja-se que estas drogas tenham um melhor perfil de ação, menores efeitos indesejáveis, menor custo, melhor facilidade de aplicação, etc.

Novos estudos e a procura por novos compostos a serem usados em TFD levaram à descoberta de vários fármacos fotossensíveis. Surgiram, assim, vários fármacos novos como o Levulan[®] Kerastick, um pró-fármaco, que tem tratamento preferencial em lesões de pele na face e escalpo e a recente aprovação do Visudyne[®], (<http://www.visudyne.com>, acessada 18/09/07), medicamento aprovado para o tratamento de degeneração macular, no início de 2000, por diversos países.

Entre 1999 e 2001 foram aprovados os compostos ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster metil 5-aminolevulinato, que podem atuar como precursores do fotossensibilizador endógeno protoporfirina IX (PpIX). Estes foram aprovados nos EUA e Europa, respectivamente, para o tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular superficial ou não (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

Em função de novos fármacos e tecnologias a TFD tornou-se a opção preferencial nos casos de terapia para diversas doenças cutâneas, devido à busca de tratamentos com boa adesão (ORTEL *et al.*, 1996) e que não apresentassem os efeitos colaterais negativos observados nos tratamentos usuais para o câncer de pele.

1.3.2. Alguns Aspectos da Terapia Fotoquímica

Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é a forma de terapia fotoquímica mais desenvolvida e que está em aplicação clínica em vários países. O princípio deste método consiste em introduzir no organismo um fotossensibilizador (FS), que não seja ativo em seu estado fundamental e que, quando ativado pela luz, provoca um dano seletivo ao tecido alvo (Figura 7). Esta seletividade deve ser reconhecida como

uma das grandes vantagens no tratamento do câncer (BROW; BROWN; WALKER, 2004; ZEITOUNI; OSEROFF; SHIEH, 2003).

Figura 7: Representação esquemática do princípio da Terapia Fotodinâmica.

Fonte: <http://dfm.ffclrp.usp.br/fabio/fotoquimioterapia.htm>

O uso da TFD baseia-se no efeito fotodinâmico, em que ocorrem reações fotoativadas. Os mecanismos destas reações foram intensivamente investigados com técnicas que permitiram descrever, de uma forma clara, processos envolvendo os estados excitados, tais como: espectroscopia acoplada à fotólise relâmpago ou *flash*-fotólise; espectroscopia de emissão; ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espectroscopia no estado excitado, entre outras. A absorção de um fóton por uma espécie A leva à formação de uma espécie A^* de vida curta, eletronicamente excitada, conforme Esquema a seguir:

A energia absorvida pode ser dissipada quimicamente ou fisicamente, conforme o Esquema abaixo:

O estado da espécie produzida na excitação depende da energia do fóton de luz absorvido. A espécie no estado excitado pode sofrer diferentes processos conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8: Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2). O fotossensibilizador no estado singlete fundamental (S_0) é irradiado com luz visível gerando fotossensibilizador no estado singlete excitado (S_1). S_1 pode decair para um estado tripleto excitado (T_1) gerando radical superóxido ($^3O_2^-$) (mecanismo Tipo I) e/ou oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo Tipo II). Estas ROS reagem com biomoléculas formando biomoléculas oxidadas (fonte: modificado de Silva, 2003).

A TFD exhibe três mecanismos de ação frente à destruição do tumor. Inicialmente as espécies reativas de oxigênio podem matar diretamente as células tumorais. Outra possibilidade é causar dano às veias associadas ao tumor, produzindo trombos e acarretando o infarto do tumor. Por fim, pode ativar uma resposta imune contra as células do tumor (DOLMANS *et al.*, 2003).

Na TFD os mecanismos de destruição celular iniciam-se pelas reações decorrentes da absorção de fótons pelo agente fotossensibilizador, que passará do estado fundamental para o estado excitado. Após certo tempo este voltará ao seu estado fundamental emitindo fluorescência ou atingirá um estado tripleto por um processo denominado “cruzamento intersistema”. Neste caso o fotossensibilizador emite fosforescência passando diretamente do estado tripleto para o singlete. Tal

possibilidade tornou-se alvo de pesquisas para novas técnicas de fotodiagnóstico (STRINGER E MOGHISSI, 2004).

O estado triplete do fotossensibilizador pode apresentar dois tipos de mecanismo. Tais mecanismos são denominados de Tipo I e de Tipo II:

Mecanismo Tipo I: Após absorção da luz por substratos e/ou corantes exógenos presentes nos tecidos celulares o composto fotoativo no estado S_1 ou T_1 pode, por reações de oxidação e redução com diferentes biomoléculas, ser fotorreduzido a ânion radical, que por transferência de um elétron à molécula de oxigênio, gera espécies reativas (denominadas como EROs) como peróxidos ($ROO^\cdot$), ânion superóxido ($O_2^\cdot$), ânion radical hidroxila ($OH^\cdot$), etc, que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando a morte de tais tecidos ou apoptose celular. Finalizando, o fotossensibilizador volta para seu estado fundamental. Poderíamos citar a excitação de porfirinas em presença de substâncias redutoras (SHARMAN *et al.*, 2000).

Mecanismo Tipo II: Outro caminho possível para o estado excitado triplete gerado é o de transferência de energia para o oxigênio molecular. A molécula no estado T_1 transfere sua energia para a molécula de oxigênio cujo estado fundamental é tripleto (3O_2), formando seu estado excitado singleto (1O_2). O oxigênio singleto é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação da célula. O 1O_2 pode induzir várias reações em cadeia com componentes moleculares da célula, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, etc, tendo como resultado a morte celular e, desse modo, a destruição do tumor. No diagrama de Jablonsky (Figura 9) estão mostradas as etapas fotoquímicas envolvidas no processo de fotossensibilização celular endógena.

Figura 9: Diagrama de Jablonsky, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível. S_0 é o estado fundamental. S_1 e T_1 são os estados excitados singlete e tripleto de menor energia, respectivamente. S_2 é um segundo estado excitado singlete. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radioativas. Fonte: SKOOG *et al.*, 1996.

O fator que determina se ocorrerá reação do Tipo I ou Tipo II é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do sensibilizador. Em sistemas atualmente usados clinicamente, a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de aproximadamente 10% enquanto a ocorrência do mecanismo tipo II é de até 90 %. Este parâmetro pode variar, dependendo, entretanto, das características do sensibilizador usado e da natureza do alvo da sua ação.

Atualmente alguns grupos (MARTINS *et al.*, 2004; NICHOLSON *et al.*, 2003; DE ROSA & CRUTCHLEY, 2002) trabalham nos estudos envolvendo a absorção de um segundo fóton a partir do estado excitado tripleto (T_1), gerando estados tripletes de maior energia (T_n) que resultam na degradação do fotossensibilizador em outras espécies radiculares, independente da presença de oxigênio.

A eficácia de TFD é atribuída a reações bimoleculares entre os estados excitados S_1 e T_1 do sensibilizador e as moléculas alvo ou de oxigênio formando seu estado excitado. Por isso ela é maior quando os rendimentos quânticos dos estados excitados são maiores e seus tempos de vida são mais longos, pois neste caso a probabilidade de encontro entre a molécula excitada do fotossensibilizador e de

outro reagente é maior. Isso diminui a probabilidade de perda de energia de excitação sem começar a reação.

A TFD poderá ser aplicada clinicamente também em várias outras áreas como na dermatologia, na oftalmologia (tratamento de degenerações maculares) e na imunologia (terapia de doenças autoimunes), entre outros.

Atualmente, a TFD é indicada no tratamento de lesões pré-cancerosas (queratose actínica, por exemplo), câncer de pele tipo não-melanoma e doenças de pele não cancerosas, como a psoríase (BAGNATO *et al.*, 2005; BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DE ROSA; BENTLEY, 2000; IBBOTSON *et al.*, 2004; MCGILLIS; FEIN, 2004; ZEITOUNI; OSEROFF; SHIEH, 2003).

A TFD apresenta várias vantagens onde se inclui o tratamento simultâneo de tumores múltiplos, boa aceitabilidade pelo paciente, tempo de cura relativamente curto e bons resultados estéticos. Seu custo também é considerado efetivo e pode ser útil em pacientes que recusam ou que não podem se submeter às cirurgias (ZEITOUNI; OSEROFF; SHIEH, 2003).

O uso da TFD para o tratamento de melanoma ainda não foi substancialmente pesquisado em nenhum estudo, em parte devido à dificuldade em se alcançar boa penetração da luz em lesões pigmentadas. Outro fator seria a natureza agressiva da doença (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

É necessário que a região a ser tratada pela TFD seja totalmente iluminada com uma dose de luz acima do seu limiar para que haja um bom resultado na terapia. Portanto, o sucesso no tratamento de tumores de pele pela TFD (Figura 10) se dá pelo fácil acesso da luz às lesões cancerosas, pois sendo planas e superficiais, apresentam uma superfície livre à iluminação (BAGNATO *et al.*, 2004).

Figura 10: Exemplo de um carcinoma tratado com TFD no Brasil. Aqui temos o aspecto inicial da lesão; logo após a TFD; 8 dias após a TFD e 70 dias após o tratamento.

Fonte: Dados do Prof. J. P. Tardivo (Faculdade de Medicina da Fundação do ABC).

Na TFD tópica podem ser utilizadas diversas fontes de luz (Figura 11), tais como, laser e fonte de luz não convergente (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DE ROSA; BENTLEY, 2000; IBBOTSON *et al.*, 2004). A fonte de luz utilizada deve exibir um espectro de característica adequada, que coincida com o comprimento de onda de máxima absorção do fotossensibilizador aplicado (DE ROSA; BENTLEY, 2000). Fotossensibilizadores com bandas de absorção acima de 600 nm são, normalmente, alvos para uso na TFD. Os comprimentos de onda maiores penetram mais profundamente o tecido (IBBOTSON *et al.*, 2004) e os de menores comprimentos de onda podem ser absorvidos por cromóforos bioendogênicos ou espalhada pelos tecidos, tornando a fotoxidação apenas superficial (OSTLER *et al.*, 2000).

Figura 11: Dispositivo LED desenvolvido no Brasil que permite a iluminação de grandes áreas com intensidades de luz usuais de 150 mW/cm^2 .
Fonte: BAGNATO *et al.*, 2004.

DOUGHERTY (1989) foi o primeiro a reportar o uso clínico da TFD com o fotossensibilizador derivado da hematoporfirina (HpD) para o tratamento de diversos tumores, incluindo o câncer de pele. A desvantagem da utilização deste fotossensibilizador é o longo período necessário para a fotossensibilização da pele e sua baixa absorção na região do comprimento de onda vermelho, onde a penetração da luz é favorecida (LOPEZ *et al.*, 2004).

1.3.3. Os fotossensibilizadores

A TFD consiste na administração de um fotossensibilizador ou seu precursor por diferentes vias (tópica, oral, intravascular, ou injeção local intra-tumoral). Uma grande vantagem da TFD é que separadamente, nem o fotossensibilizador nem a luz visível produzem efeitos deletérios para o paciente e funcionam somente quando atuam juntos na região do corpo a ser tratada, evitando, assim os efeitos colaterais graves para organismo.

Decorrido um intervalo de tempo (geralmente de 3 a 96 horas, tempo este necessário para permitir a distribuição, máxima diferenciação entre tecido normal e afetado, localização e acúmulo do fotossensibilizador nos tumores) as lesões malignas são expostas à luz, em comprimento de onda apropriado à absorção máxima desta molécula. Tal combinação e fotoativação resultam na formação de

espécies reativas de oxigênio, em que o oxigênio singleto é a principal espécie responsável pela citotoxicidade (GIBSON *et al.*, 1999).

Geralmente a regressão de um tumor por tratamento em TFD apresenta algumas etapas comuns, tais como:

- necrose massiva do tumor após 72h do tratamento;
- formação de ferida na região do tumor após 3 a 4 dias;
- desaparecimento da ferida e total regressão do tumor após 13 dias, com cicatrização da pele e crescimento de pelos após 20 dias (Figura 10).

Os agentes fotossensibilizantes são compostos que absorvem energia da luz visível em comprimento de onda específico. Tais fotossensibilizantes são capazes de utilizar essa energia para induzir reações em outras moléculas, como o oxigênio molecular intracelular. A TFD é realizada mediante a presença de três componentes básicos: (i) o agente fotossensibilizante, (ii) o oxigênio molecular e, (iii) a luz (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN; 2005; SHARMAN; VAN LIER; ALLEN, 2004).

Para que a TFD seja considerada ideal o fotossensibilizador utilizado não deve ser tóxico nas doses clínicas utilizadas e deve se concentrar principalmente em tecidos malignos do que em tecidos normais, promovendo uma alta taxa de concentração tumor/tecido normal (BAGNATO *et al.*, 2004).

O fotossensibilizador ideal a ser usado na TFD deve apresentar algumas propriedades gerais para os compostos e suas formulações, tais como: pureza química; características fotofísicas favoráveis: alta absorção ótica na região espectral com comprimento de onda maior que 600 nm, onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes; serem fotoativos (ter a capacidade de induzir as fotoreações que destroem as células doentes); serem fotoestáveis; não possuírem toxicidade no seu estado fundamental (não excitado); baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade); fotossensibilidade não prolongada; simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de 2 anos); farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo); facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis; facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade; facilidade de análise total dos componentes da fórmula; alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade) (NAZAROVA, *et al.*, 2005; NOWIS *et al.*, 2005; LOPEZ *et al.*, 2004).

A utilização tópica do fotossensibilizador permite altas concentrações no tecido local em comparação a outras vias, sendo que o fotossensibilizador não é detectado no plasma. Seu custo é menor que os outros métodos de administração e possui menos reações adversas sistêmicas (WONG *et al.*, 2003).

A seletividade dos fotossensibilizadores parece ser decorrente do aumentado metabolismo apresentado pelas células neoplásicas, que levariam, deste modo, ao maior acúmulo do fotossensibilizador quando comparado às quantidades acumuladas por células normais. Estas células neoplásicas apresentam um menor *clearance* do que as células normais, favorecendo, portanto, o acúmulo do fotossensibilizador (ZENZEN e ZANKL, 2004). Muitos destes, por sua vez, apresentam alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

As células tumorais apresentam maior quantidade de receptores para as LDL quando comparadas às células normais. Em função disso observa-se maior difusão destes agentes para o interior das células tumorais, por endocitose (PENG *et al.*, 1990; REDDI, 1993). A permeabilidade das veias tumorais é aumentada, permitindo assim maior fluxo de nutrientes e de agentes fotossensibilizantes para dentro do tumor (KRAMMER, 2001).

Vários outros fatores contribuem para uma maior retenção do fotossensibilizador. Entre estes poderíamos ressaltar a baixa solubilidade e a deficiente drenagem linfática nos tecidos tumorais (HENDERSON & DOUGHERT, 1992).

As protoporfirinas, devido ao seu uso há mais de quinze décadas, fazem parte da classe de fotossensibilizadores mais estudada e empregada na TFD. Têm boa aceitabilidade devido a apresentarem toxicidade mínima quando na ausência de luz e poucas interações com outros fármacos. Apesar de apresentar como aspecto negativo o fato de sensibilizar a pele por prolongado período de tempo, o que pode levar o paciente a riscos de fototoxicidade durante o tratamento, tais fármacos são muito empregados em tratamentos oncológicos combinados (NOWIS *et al.*, 2005).

Para se contornar estes aspectos negativos das protoporfirinas o uso de pró-fármacos é uma possibilidade em amplo desenvolvimento, pois, estes exibem a vantagem de levar à formação do fotossensibilizadores apenas *in situ*. Poderíamos citar o ácido 5-aminolevulínico como uma alternativa de pró-fármaco.

1.4. O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)

O acúmulo endógeno de protoporfirina IX (PpIX), um fotossensibilizador endógeno, induzido pela administração tópica ou sistêmica de 5-ALA, tem sido abordado e usado atualmente em TFD.

Tal abordagem terapêutica é uma promissora opção para terapias variadas, em que poderíamos citar o tratamento de várias doenças, incluindo lesões tumorais e pré-tumorais, distúrbios vasculares proliferativos. A organização FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos e Organismos da Europa aprovaram recentemente a aplicação para tratamento de queratose actínica e carcinomas de células basais (ZEITOUNI *et al.*, 2003).

Sabe-se que a PpIX pode ser sintetizada em todas as células que possuem mitocôndria e que é formada com rigoroso controle endógeno, ocorrendo em praticamente em todas as células nucleadas. A PpIX apresenta uma maior afinidade e propensão em se acumular em tecidos com alta atividade celular. A acumulação do fotossensibilizador em tecidos doentes não é específica para doenças neoplásicas ou pré-neoplásicas.

O 5-ALA é um pró-fármaco, precursor metabólico de porfirinas endógenas, que pode ser convertido, através de rota biossintética do heme em PpIX. A PpIX é um eficiente agente fotossensibilizador endógeno, que é ativado pela luz e é altamente fluorescente.

Kennedy *et al.* (1990) introduziram método alternativo com o uso do ácido 5-ALA tópico, o que possibilitou uma maior margem de segurança dos efeitos fototóxicos no local de aplicação, diferentemente dos derivados porfirínicos veiculados sistemicamente. Estes causam uma fotossensibilidade mais ampla e difusa por um período mínimo de quatro semanas.

O uso tópico do 5-ALA apresenta um perfil muito favorável em termos de propriedades terapêuticas, possibilitando a restrição dos efeitos fototóxicos gerados na área da aplicação (MORTON *et al.*, 2002; KENNEDY *et al.* 1992; KENNEDY *et al.* 1990. Os picos de emissão de fluorescência da PpIX, geralmente em comprimentos de onda próximo a 631nm, são indicadores importantes da absorção e da metabolização deste pela pele, conforme relatado na literatura (ACKERMANN, 1998; MARTIN, 1995).

O nome químico para o 5-ALA na forma de cloridrato (fármaco empregado neste estudo) é hidrocloreto do ácido 5-amino-4-oxopentanóico. Apresenta massa molar de 167.59 Da. A fórmula estrutural do 5-ALA está representada na Figura 12.

Figura 12: Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA).

O fármaco de nome comercial Levulan[®] Kerastick tem como princípio ativo o ácido 5-aminolevulínico, e o fabricante é o DUSA Pharmaceuticals.

O 5-ALA na forma de cloridrato, 5-ALA·HCl, é um sólido branco, fotossensível, higroscópico, bastante solúvel em água e ligeiramente em etanol. Quando usado como solução tópica a 20% em uma mistura de 354 mg de 5-ALA·HCl, 1,5 mL de etanol em água (48% v/v) e polietilenoglicol apresenta estabilidade limitada a 2 horas após a mistura.

A síntese endógena do 5-ALA é normalmente controlada com rigor pela enzima ALA-sintetase, provavelmente através do nível intracelular de Heme. Quando se administra exogenamente o 5-ALA para a célula, subverte-se esse controle resultando no acúmulo da PpIX, que é convertida em heme pela ferroquelatase pela adição de ferro ao núcleo da PpIX. Uma vez que essa conversão é um processo lento (CORREA *et al.*, 2003), níveis elevados de PpIX são encontrados no tecido. O acúmulo intracelular de PpIX deve ser alcançado no tecido para produzir um efeito fotodinâmico. Este necessita da exposição à luz (FUKUDA, 1993).

O 5-ALA é formado na mitocôndria no primeiro passo do ciclo do Heme (Figura 13), através da condensação entre a succinil CoA e a glicina. Duas moléculas de 5-ALA, no citosol, combinam-se e formam uma substância denominada porfobilinogênio. Quatro destas moléculas combinam-se formando o uroporfirinogênio, que é convertido a coproporfirinogênio. O coproporfirinogênio é recaptado pela mitocôndria e é convertido, por uma enzima denominada coproporfirinogênio oxidase, a protoporfirinogênio, que origina a PpIX, que é precursora imediata do grupo Heme (HASAN *et al.*, 2000).

Figura 13: Ciclo do Heme. Enzimas ALA Sintetase (A); ALA desidratase (B); porfobilinogênio deaminase (C); uroporfirinogênio co-sintase (D); uroporfirinogênio descarboxilase (E); coproporfirinogênio oxidase (F); protoporfirinogênio oxidase (G) e ferroquelatase.

Um mecanismo de feedback negativo controla a síntese de 5-ALA quando da presença de heme livre (KAPPAS *et al.*, 1989). Um artifício que pode ser empregado para induzir um acúmulo intracelular de PpIX é evitar este mecanismo de *feedback*.

Ao se comparar a estrutura do 5-ALA com as das porfirinas (conforme se pode observar na Figura 14), verifica-se que este apresenta uma estrutura molecular bem simples, pequena, hidrossolúvel.

Figura 14: Fórmula Estrutural da Protoporfirina IX e 5-ALA, respectivamente.

Peng e colaboradores (1995) observaram que o 5-ALA tem a propriedade de penetrar seletivamente em estrato córneo neoplásico, enquanto que em estrato córneo de tecido normal isto praticamente não ocorre.

Há várias vantagens na fotossensibilização por PpIX induzida pelo 5-ALA. Uma delas é que o organismo elimina PpIX e outros compostos metabólicos produzidos após administração tópica de 5-ALA rapidamente, o que limita o risco da fotossensibilidade de 1 a 2 dias (WEBBER *et al.*, 1997).

De Felício e colaboradores (2008) fizeram um amplo estudo do uso do 5-ALA para TFD em câncer de pele não melanoma e observaram várias vantagens tais como: minimamente invasiva e alternativa em pacientes com dificuldades, impossibilidade, alto risco ou recusa do procedimento cirúrgico; possibilidade de tratamento ambulatorial, de lesões múltiplas em sessão única ou em sítios de pobre cicatrização, de reaplicações ou do emprego posterior de outros procedimentos terapêuticos, e notadamente a superioridade dos resultados estéticos.

Atualmente a utilização do 5-ALA como pró-fármaco está sendo bastante estudada devida às facilidades que este apresenta, principalmente para as aplicações dermatológicas. O uso do 5-ALA e, conseqüentemente, a geração de PpIX é considerado um valioso tratamento para o câncer de pele não melanômico, como também em condições hiperproliferativas e hipervasculares (LOPEZ *et al.*, 2004).

A eficiência da TFD-ALA tópica está relacionada com a baixa habilidade do 5-ALA em penetrar na pele. Este é um dos grandes problemas na utilização tópica do 5-ALA, uma molécula hidrofílica que apresenta carga. Tais características limitam sua permeação no estrato córneo que depende de vários parâmetros, como, por exemplo: sua concentração na pele, permeabilidade do fármaco e taxa de conversão do 5-ALA em PpIX (SVAASAND *et al.*, 1996).

O caráter hidrofílico/hidrofóbico de um fotossensibilizador influi diretamente no seu estado de agregação e também no seu transporte e incorporação pelas células. Tem sido observado que quanto mais hidrofóbico for o fotossensibilizador, maior sua incorporação pelas células tumorais e melhor o efeito da TFD (BONNET, 1995).

1.5. Permeação de fármacos

O transporte de fármacos pela pele é complexo, pois, além da estrutura e propriedades distintas que esta apresenta, muitos outros fatores influenciam a penetração cutânea dos fármacos. Dentre estes fatores podemos citar: 1) a molécula penetrante e suas propriedades físico-químicas; 2) o sistema de liberação do fármaco e 3) a combinação de pele, fármaco e sistema de liberação (RANADE, 1991).

A permeação cutânea de fármacos pode ser descrita em três fases principais: 1) liberação da molécula do fármaco da formulação para a superfície da pele; 2) partilha e difusão da molécula pela pele; e 3) distribuição da molécula no local de ação pela circulação sistêmica. Qualquer um dos dois primeiros passos é limitante para a taxa de permeação. Modificações nas propriedades do fármaco (coeficiente de partilha, solubilidade, etc) e/ou da formulação ou sistema de liberação podem facilitar a penetração de ativos de interesse.

1.6. Anatomia e Histologia da pele

A pele é o manto que reveste todo o organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É o maior órgão do corpo humano, revestindo, num adulto, uma área média de superfície de 2m² e recebendo um terço da circulação sanguínea do corpo. Ela é constituída de uma estrutura complexa de tecidos de natureza variada, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (Figura 15). Na pele observam-se várias estruturas anexas, que são os pêlos, unhas e glândulas sudoríparas e sebáceas (JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

Figura 15: Representação esquemática das camadas da pele.

O EC representa, ao mesmo tempo, uma barreira protetora natural contra a penetração de compostos exógenos tóxicos, ataques físicos, excessiva perda de água ou de outro componente natural do corpo (CHIEN, 1992) e o principal órgão de comunicação com o exterior.

Esta barreira biológica é composta de três camadas principais: (i) epiderme, (ii) derme e (iii) hipoderme, que apresentam como principais características básicas:

- i. **epiderme:** é a camada mais externa, porção epitelial de origem ectodérmica, avascular, composta de epitélio pavimentoso estratificado. Local de renovação celular contínua. As células epiteliais são mantidas juntas principalmente por pontes interligadas que são responsáveis pela integridade da pele (JACOB e FRANCONI, 1970). É essencialmente dividida em duas partes: a parte mais interna, que corresponde à epiderme viável (150 μm) (HOUK; GUY, 1988) e o estrato córneo, que constitui a parte mais externa. A epiderme viável é subdividida em quatro subcamadas: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso e estrato germinativo, sendo responsável pela multiplicação e diferenciação de células, que dão origem às células do estrato córneo. O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme (5 a 8 μm , chegando excepcionalmente a 20 μm). Mais de 90% de suas células são corneócitos (CEVC, 2004). Os corneócitos são células achatadas, anucleadas e preenchidas

com queratina. Nos mamíferos esses corneócitos estão distribuídos em aproximadamente quinze camadas (CEVC, 2004) e encontram-se associados com numerosos desmossomas. Entre os corneócitos há uma grande quantidade de material lipídico, altamente organizado, que funciona como um “cimento” extracelular, vedando os espaços entre as células. Esses lipídeos compreendem ácidos ceramidas (41%), ácidos graxos (9%), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%) e pequena quantidade de colesterol sulfato (2%) (SUHONEN; BOUWSTRA; URTTI, 1999). A qualidade, a quantidade e a cristalinidade dos lipídeos do estrato córneo determinam a perfeição da barreira da pele (CEVC, 2004). A camada córnea constitui a principal barreira para a passagem de solutos (ABRAHAM *et al.*, 1995) e, juntamente com a matriz lipídica, possui grande importância nos estudos de permeabilidade da pele. O limite entre a epiderme e a derme não é regular, apresentando saliências e reentrâncias das duas camadas, que imbricam e se ajustam entre si.

- ii. **derme:** uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, é formada por uma rede de fibras colágenas, elásticas, reticulina e da substância fundamental, que dá suporte aos vasos sanguíneos, linfáticos e às células nervosas. Os apêndices cutâneos (os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas) originam-se na derme e estendem-se até a superfície da pele. Na derme estão presentes também os fibroblastos (células responsáveis pela produção da substância fundamental e pelas fibras) e as células de defesa. O transporte de solutos nesta área é rápido, podendo atingir a circulação sistêmica, através dos vasos sanguíneos. A camada mais profunda é formada por muitas estruturas com características elásticas (denso estroma fibroelástico de tecido conjuntivo), grandes quantidades de vasos sanguíneos (redes vasculares) e fibras nervosas.
- iii. **hipoderme** (tecido subdermal adjacente ou tecido subcutâneo) está situada abaixo e em continuidade com a derme, e embora tenha a mesma origem desta, não faz parte da pele, mas apenas lhe serve de suporte e união com órgãos subjacentes. O tecido subcutâneo está localizado abaixo da derme e constitui-se num tecido fibrilar, contendo células adiposas e funciona como uma reserva de gordura, com propriedades isolantes e protetoras que desempenham papel de

proteção mecânica, de conservação da temperatura corporal e de reserva de calorías. Não possui um papel na penetração cutânea porque se situa abaixo do sistema vascular, que está localizado na derme (SINGH & SINGH, 1999).

Como anteriormente mencionado, a epiderme é composta de cinco camadas de tipos de células: estrato córneo (EC), estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso e estrato basal.

A epiderme pode ser dividida em duas partes principais:

- **Estrato germinativo**, que é a parte mais interna, onde são produzidos os corneócitos (células queratinizadas), que se proliferam, sofrem alterações e dão origem às células mortas do estrato córneo. À medida que essas células migram do estrato germinativo para a superfície da pele seu conteúdo de água vai diminuindo, tornando-se uma camada seca;
- **Estrato córneo**, também chamado “camada de descamação”, pois as suas células queratinizadas vão se destacando do epitélio, sendo substituídas por outras. É uma camada constituída de células mortas ou em vias de degenerescência, muito ricas em queratina. É a camada mais externa da pele e de grande importância para os estudos de penetração cutânea, constituindo a principal barreira para a passagem de fármacos (ABRAHAM *et al.*, 1994). O estrato córneo apresenta uma estrutura bifásica de lipídeo-proteína e tem aproximadamente 10 a 20 µm de espessura (PIROT *et al.*, 1997). A parte protéica dessa camada é formada por queratina, a qual é composta de células anucleadas (corneócitos) dispersas em uma matriz lipídica (parte lipídica). Esta matriz é constituída por lipídios como as ceramidas (18%), triglicérides (25%) ácidos graxos livres (19%) e esteróis (14%) (SZNITOWSKA *et al.*, 2002), os quais formam uma matriz contínua ao redor dos corneócitos, o que faz com que o estrato córneo acentue sua “função barreira”. O estrato córneo é comumente descrito como uma parede de “cimento e tijolos” em que as células queratinizadas representam os tijolos e os espaços intersticiais entre as células, ou seja, a matriz lipídica, representa o cimento (AGUILELLA *et al.*, 1997). Por isso, o

estrato córneo é normalmente responsável pela função de “barreira da pele” limitando a difusão percutânea de fármacos através dela.

1.6.1. Estrato Córneo: Uma Barreira Biológica à Permeabilidade de Fármacos

No desenvolvimento de formulações tópicas e transdérmicas é importante que se conheça a estrutura da pele e o modo como as substâncias podem penetrá-la. De maneira geral, a absorção de fármacos através da pele ocorre passivamente. A absorção trans-epidérmica envolve a difusão do fármaco através do EC e camadas de células da epiderme viável até as camadas superiores da derme, atingindo a micro-circulação (SCHEUPLEIN; BLANK, 1971).

A pele constitui uma barreira à penetração de fármacos, devido à estrutura da epiderme. Para que um fármaco seja absorvido através da pele, deve romper a barreira imposta pelo estrato córneo e também às camadas subseqüentes da epiderme para atingir a derme, podendo eventualmente passar para a corrente sanguínea e ter uma ação sistêmica.

Segundo Ansel *et al.* (1999) e Cleary (1982), a permeação de solutos através de um fármaco através do estrato córneo pode ocorrer por difusão passiva através de três mecanismos sugeridos:

- ❖ permeação transcelular (através das células): os solutos passam diretamente através das células córneas e da matriz lipídica intercelular;
- ❖ permeação intercelular (entre as células): os solutos difundem-se ao redor das células córneas de uma maneira tortuosa, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica (ABRAHAM *et al.*, 1995);
- ❖ permeação transfolicular (através dos folículos pilosos) e pelos ductos sudoríparos. Várias investigações têm estabelecido que a rota transfolicular é bastante significativa como via de penetração para muitos compostos (GUPCHUP; ZATZ, 1997). É uma rota paralela na qual o soluto pode ser absorvido através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (MOSER *et al.*, 2001; KITSON & THEWALT, 2000; ANSEL *et al.*, 2000).

Os mecanismos de penetração de substâncias através da pele estão representados na Figura 16.

Figura 16: Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias através da pele humana (adaptado de BARRY, 2002).

Para um fármaco ser absorvido por difusão passiva através da pele, é necessário ter adequada lipofilicidade e também um peso molecular relativamente baixo (BROWN, 2006). É muito difícil a permeação de moléculas com tamanho superior a 200-350 Daltons na pele intacta (CEVC *et al.*, 1996), podendo-se dizer que o tamanho máximo a ser considerado é de 400 Da. A maioria de pequenas moléculas solúveis em água, não eletrólitos, difundem até a circulação sistêmica até mil vezes mais rápido quando a camada córnea está ausente. Assim, para maximizar o fluxo de substâncias, tentamos reduzir este obstáculo, embora algumas vezes a via folicular possa ser importante (BARRY, 2001).

Do ponto de vista da penetração, a pele age como uma barreira mecânica nanoporosa, perfurada por um grande número de canais ou caminhos quase semi-circulares. A maioria das publicações estima que esses “poros” hidrofílicos possuam um diâmetro médio que varia entre 0,4 a 36,0 nm. Como a maioria das moléculas passíveis de permear atravessa a pele por esses “microcanais” intercelulares, muitas técnicas têm sido propostas para melhorar esse percurso e transpor a arquitetura molecular representada pelos corneócitos e pelas múltiplas camadas de lipídeos intercelulares (BARRY, 2001).

A resistência ao transporte através do estrato córneo depende das propriedades e arranjo de suas camadas alternadas hidrofóbicas e hidrofílicas, bem como de sua espessura, a qual varia de espécie para espécie e de região do corpo em um mesmo indivíduo. Variáveis adicionais, como a concentração local de folículos pilosos e glândulas sudoríparas, fornecem uma possível rota alternativa para difusão (PEREIRA, 1999).

Alguns fatores devem ser considerados no estudo da penetração cutânea de fármacos segundo ALENCASTRE (2001) e ANSEL *et al.* (1999):

- ✓ A concentração do fármaco: de modo geral, a quantidade absorvida por via percutânea por unidade de área de superfície por intervalo de tempo aumenta na medida em que a concentração do fármaco aumenta;
- ✓ Uma quantidade maior do fármaco é absorvida pela via percutânea quando a substância é aplicada em uma grande área;
- ✓ A hidrossolubilidade do fármaco determina a concentração apresentada no local de absorção, e o coeficiente de partição tem forte influência na velocidade de transporte através dos locais de absorção;
- ✓ A absorção parece ser aumentada por veículos que se espalham facilmente sobre a superfície da pele, misturam-se rapidamente com o sebo, colocando a substância ativa em contato com as células do tecido;
- ✓ Os veículos oleosos e/ou os curativos oclusivos agem como barreira à umidade, impedindo a passagem do suor da pele, o que geralmente resulta em aumento da hidratação cutânea;
- ✓ O tempo e a intensidade de fricção na aplicação tópica têm influência sobre a quantidade absorvida: quanto maior o período e a intensidade, maior a absorção;
- ✓ O local de aplicação pode ter um efeito sobre o grau de absorção;
- ✓ Geralmente, quanto maior o período de contato com a pele, maior será a absorção. Entretanto, alterações da hidratação ou a saturação da pele com a substância ativa podem impedir o aumento significativo da absorção com o tempo;
- ✓ Doses múltiplas de aplicação podem aumentar a biodisponibilidade da substância ativa.

1.7. Estudos *in vitro* e *in vivo* de liberação e permeação cutânea

A absorção de fármacos através da pele pode ser avaliada utilizando-se metodologias *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea, são muito explorados e têm muita importância na otimização da escolha mais adequada de uma formulação farmacotécnica a serem empregadas em uma investigação de liberação dérmica.

Os modelos experimentais *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, por serem mais simples e rápidos. Para avaliar a permeação e a retenção de fármacos *in vitro* através da pele de animais ou humana são utilizados sistemas

compostos de células de difusão, onde uma membrana (pele inteira ou estrato córneo) separa as fases doadora e receptora.

Alguns fatores devem ser considerados nos estudos *in vitro*: a preparação da pele, a escolha da fase receptora e do sistema de agitação adequado, e a manutenção da temperatura fisiológica. A pele humana é preferível nos estudos de absorção e metabolismo de fármacos. Entretanto, seu uso é limitado devido à dificuldade de aquisição e variabilidade das amostras de pele. Desta maneira, faz-se necessário o uso de pele de animais para estudos repetitivos ou mecânicos que requerem grandes quantidades de pele (BARRY, 1983; LEVEQUE *et al.*, 2003, PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1993).

SCHMOOK *et al.* (2001) realizaram um estudo comparativo entre (i) pele humana, (ii) um equivalente de pele humana viva (GraftskinTM LSETM), (iii) epiderme humana reconstituída (SkinethicTM HRE), (iv) pele de rato, e (v) pele de porco, para estudos *in vitro* de absorção percutânea. A pele humana é o modelo ideal para esses estudos, contudo não é acessível para a maioria dos pesquisadores. A princípio, modelos reconstituídos de pele poderiam ser uma alternativa promissora, no entanto, esses autores mostraram que produtos comercializados de derme e epiderme reconstituída têm as propriedades “barreira” mais fracas, quando comparada com pele humana fresca ou congelada. Ao final dos estudos observou-se que a pele de porco foi a que obteve menor disparidade comparada com a pele humana, demonstrando assim, uma opção para estudos em desenvolvimentos de formulações de uso tópico e transdérmico, quando não se tem pele humana disponível.

1.8. Promotores de absorção cutânea

Os promotores de absorção são substâncias químicas que se utiliza como excipientes, incorporando-os aos sistemas transdérmicos e tópicos com a finalidade de que estes ajam como alternadores da permeabilidade cutânea de maneira reversível e segura (WALTERS, 1989). Podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo diminuindo, assim, a resistência da pele à difusão do fármaco (WALTERS, 1989; BARRY, 1987) ou, ainda, podem aumentar o fluxo do fármaco devido o incremento da atividade termodinâmica deste na formulação.

Os promotores de absorção possibilitam que muitos fármacos aumentem sua taxa de penetração, diminuem o *lag time* e possibilitam a administração de grandes

quantidades de fármaco, inclusive os polares, o que não seria possível em outras condições (MARTINS, 2002)

A literatura tem demonstrado que os promotores de absorção cutânea podem alterar a composição e/ou a organização lipídica e/ou protéica inter e intracelular do estrato córneo, diminuindo reversivelmente a sua função barreira e/ou aumentando o coeficiente de partilha (MATSUDA, ARIMA, 1999).

A ação dos promotores para promover a permeação de fármacos através da pele é acarretar alteração reversível da bicamada lipídica e, assim, da sua função barreira. Deve interagir nas cabeças polares lipídicas da membrana da bicamada e nas cadeias hidrofóbicas. Tais interações resultam no aumento da fluidez da membrana (SUHONEN *et al.*, 1999).

Embora muitos promotores de absorção químicos tenham sido desenvolvidos para pele humana ou animal, nenhum deles se mostrou ideal. Algumas das propriedades desejáveis para promotores de absorção são (BARRY, 1983):

- ❖ Devem ser não-tóxicos, não-irritantes e hipoalergênicos;
- ❖ Devem agir rapidamente e que a atividade e a duração do efeito sejam previsíveis e reprodutíveis;
- ❖ Não devem ser farmacologicamente ativos para o organismo, ou seja, não devem se ligar a sítios receptores;
- ❖ Devem atuar unidirecionalmente, ou seja, devem permitir a entrada dos agentes terapêuticos no organismo enquanto previnem a perda de substâncias endógenas;
- ❖ Quando removidos da pele as propriedades de barreira devem ser restituídas rápida e completamente;
- ❖ Devem ser apropriados para formulação em diversas preparações tópicas e, portanto, devem ser compatíveis com os excipientes e os fármacos;
- ❖ Devem ser cosmeticamente aceitáveis.
- ❖ Economicamente acessível e com boas propriedades solventes (HADGRAFT, 1999; SINHA, KAUR, 2000).

O uso de promotores de absorção cutânea apresenta, no entanto, limitações devido à toxicidade potencial destas substâncias, que podem causar danos à pele. Por esse motivo deve-se fazer a escolha do promotor de absorção a ser utilizado tendo em mente qual é o objetivo da terapia. Deve-se selecionar um promotor que possa atuar em uma terapia em que se deseja uma ação tópica ou transdérmica.

Quando se objetiva uma ação tópica deve-se desenvolver uma formulação em que se possa minimizar o fluxo do fármaco através da pele e, em contrapartida, aumenta a sua retenção. Para uma ação transdérmica deve-se buscar uma formulação que tenha um objetivo oposto ao das características mencionadas para a ação tópica, ou seja: é necessário que a formulação possa maximizar o fluxo do fármaco através da pele, atingindo, assim, a circulação sistêmica e, simultaneamente, minimizar a retenção e o metabolismo da droga na pele (HSIEH, 1994).

O mecanismo de ação dos promotores de absorção é muito variado. Poder-se-ia citar como principais características que estes possam apresentar visando um incremento para procedimentos de terapia dermatológica. Entre estas:

- ❖ Potencializam a permeabilidade do fármaco através da pele, gerando um dano reversível ao estrato córneo.
- ❖ Aumentam a atividade termodinâmica do fármaco, quando agem também como co-solventes.
- ❖ Aumentam o coeficiente de partição do fármaco para possibilitar a liberação deste, passando do veículo para a pele.
- ❖ Incrementam a difusão do fármaco, alterando o estrato córneo.
- ❖ Promovem maior penetração, gerando um reservatório do fármaco no estrato córneo.

Os promotores de absorção quando aumentam a permeabilidade do fármaco através da pele atuam causando uma alteração dos caminhos polares e/ou apolares do estrato córneo. Ao agirem sobre os caminhos polares os promotores de absorção podem: modificar a polaridade dos lipídeos ou interferir na estrutura rígida dos lipídeos da matriz, aumentar a fluidez; gerar separação de fases nos domínios polares e apolares dos lipídeos; extrair os lipídeos, possibilitando uma maior facilidade para a penetração de fármacos ou outras substâncias (SHAH, 1994; BARRY, 2004).

Nos caminhos polares os promotores de absorção podem desencadear alterações muito significativas, entre elas, podem desnaturar as proteínas dos queratinócitos, tornando-os mais permeáveis à passagem de substâncias; modificar o grau de compactação do EC agindo nos desmossomos e estruturas protéicas.

A Figura 17 traz uma representação esquemática destas características mencionadas anteriormente, quando da ação dos promotores de absorção acarretando alteração de permeabilidade do EC.

Figura 17: Diferentes mecanismos de ação dos promotores de absorção.
Fonte: (BARRY, 2004).

A Tabela 2 apresenta vários promotores de absorção aceitos na farmacotécnica e seus respectivos mecanismos de ação. Observa-se que a maioria destes promotores aumenta topicamente a concentração de fármacos, ao passo que alguns promotores apresentam capacidade considerável em promover a penetração percutânea de fármacos através do estrato córneo conseguindo, assim, atingir a microcirculação (FOLDVARI, 2000).

Tabela 2: Promotores de absorção e seus mecanismos de interação com a pele e aumento da permeabilidade de fármacos (FOLDVARI, 2000).

Classe	Compostos representativos	Mecanismo de interação com a pele e aumento da permeabilidade de fármacos
Água	Preparações tópicas hidratantes e oclusivas	Hidratam o EC, evidência no aumento da permeação de fármacos hidro e lipossolúveis, aumentam a fluidez ou desordem das bicamadas intercelulares.
	Produtos oclusivos	Veículos e produtos oclusivos previnem a TEWL, hidratando a pele.
Terpenos	Ascaridol 1,8 -Cineol L-Mentol D-limoneno	Desorganizam os lipídeos intercelulares; aumentam a condutividade elétrica, indicando a abertura de canais polares no EC.
Azona®	1-Dodecylhexahydro-2H-azepine-2-one e alguns derivados	Rompem os lipídeos da pele na região da cabeça polar e cauda apolar.
Fosfolipídeos (Lipossomas) Solventes orgânicos	Fosfatidilcolina da soja ou gema de ovo	Difundem no EC, perturbam os lipídeos intercelulares e aumentam a partição da droga na pele.
	Álcoois (etanol)	Transporte de fármacos pelos canais lipídicos, extração parcial de lipídeos do EC.
	Polióis (PG)	Ocupam o lugar da água no espaço intercelular, aumenta a penetração de fármacos lipofílicos.
	Sulfóxidos (DMSO)	Partição através do corneócito, ligando-se a queratina; aumentam a fluidez dos lipídeos em altas concentrações e rompe o empacotamento lipídico.
	Pirrolidonas	Interagem com a queratina e lipídeos do EC.
Ácidos graxos	Ácido oléico	Aumenta a fluidez dos lipídeos intercelulares: cadeias curtas (C ₁₀₋₁₂) e ácidos graxos de cadeias insaturadas são mais eficazes do que ácidos graxos saturados de cadeia longa; o veículo usado (por ex. PG) pode ter ação sinérgica.
Surfactantes	Tween® e Brij®	Penetram na pele, solubilização micelar do lipídeos do EC.
	DTA-B	Penetram na pele, extração dos lipídeos do EC.
	Lauril sulfato de sódio	Ligam-se à queratina intracelular dos corneócitos, removem alguns lipídeos intercelulares, aumentam a TEWL e alteram a reposição lipídica.

Dentre os promotores de absorção mais estudados podemos citar o dimetilsulfóxido (DMSO), água, etanol, ácido oléico, propilenoglicol, pirrolidona, surfactantes, uréia, N,N-diethyl-m-toluamida, miristato de isopropila e azona (BEHL *et al.*, 1994). Pode também ser utilizado como promotores de absorção alguns polímeros, enzimas, óleos naturais, niosomas, micelas fosfolipídicas e lipossomas (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

1.8.1. Óleos essenciais e terpenos como promotores de absorção cutânea

Os óleos essenciais são encontrados em plantas e flores. Apresentam odor característico, geralmente agradável (e por este motivo usados comercialmente como aromatizantes) e baixos pontos de ebulição. Nestes, geralmente, encontramos os terpenos.

Terpenos são compostos que, em sua maioria, apresentam em sua composição elementos químicos tais como carbono, hidrogênio e oxigênio (WILLIAMS e BARRY, 2004). Estes compostos apresentam algumas propriedades intrínsecas que geram um grande interesse em usá-los como potenciais promotores de permeação. Poderíamos citar, entre elas, baixas toxicidade sistêmica e ocorrência de irritação cutânea quando empregados em pequenas concentrações (1 a 5%). Também apresentam um grande potencial em aumentar a atividade permeadora (ASBILL e MICHNIAK, 2000).

Os terpenos atuam majorando os parâmetros de permeação cutânea de várias substâncias hidrofílicas quanto as lipofílicas. Acredita-se que estes atuem causando sua ação promotora devido à capacidade em romper a organização intercelular dos lipídeos do estrato córneo. Um aspecto muitíssimo relevante é que tal rompimento é completamente reversível e causa baixa irritação cutânea (ASBILL e MICHNIAK, 2000; CORNWELL, 1995; YAMANE, WILLIAMS e BARRY, 1995).

Krishnaiah (2006) estudou a ação promotora *in vitro* dos terpenos nerodilol, carvona e anetol sobre a permeação transdérmica do cloridrato de selegina e observou que estes tiveram um aumento marcante de aumento de permeação.

Lim *et al.* (2006) estudaram a influência dos terpenos limoneno (hidrocarboneto), linalol e 1,8-cianol (estes últimos compostos oxigenados) empregando-os como promotores de permeação em uma formulação organogel para a permeação do haloperidol. Concluiu que o limoneno foi o terpeno que apresentou maior efetividade como promotor para permeação cutânea e, também, o

que apresentou maior permeação e diminuição do *lag time*, em experimento empregando pele humana.

Amnuait (2005) empregou os terpenos mentol e 1,8-cianol visando aumentar a permeação de cloridrato de propanolol. Observou que estes, em particular o 1,8-cianol, aumentaram de forma altamente significativa a permeação do ativo, quando comparado à formulação controle (sem a presença de terpenos).

Narishetty e Panchagnula (2004) realizaram amplo estudo do efeito e do mecanismo de ação à liberação transdérmica da zidovudina (AZT) com vários terpenos (mais precisamente monoterpenos) e observaram que todos os terpenos empregados exibiram um aumento do fluxo transdérmico do fármaco. E demonstraram que tais monoterpenos têm a habilidade de formar ligações de hidrogênio com a cabeça polar dos lipídios, o que explica a capacidade destes em romper a estrutura lipídica do estrato córneo.

OTA (2003) estudou a permeação *in vitro* do midazolan empregando os terpenos l-mentol, D-limoneno, beta-citronelol e geraniol. Observou que a eficácia destes promotores é consideravelmente maior (principalmente para o limoneno) quando comparados a idênticas quantidades de outros promotores não-terpênicos. Os resultados dos estudos realizados *in vivo*, em ratos, mostraram que a formulação contendo midazolan e limoneno como promotor de absorção foi capaz de permear através da pele de rato. Tal fato não ocorreu com os demais terpenos testados.

WILLIAMS e BARRY (2004) em estudos com terpenos (mono e sesquiterpenos) obtiveram resultados que demonstram que os monoterpenos são mais eficazes em aumentar a permeação que os sesquiterpenos. Outra observação muito importante é que hidrocarbonetos ou terpenos apolares, como o limoneno, promovem maior aumento para fármacos lipofílicos. O oposto se observa quando do uso de terpenos contendo grupos polares como o mentol e 1,8-cineol, que apresentaram melhor performance como promotores de permeação para compostos hidrofílicos. Estes fatos podem sugerir que os possíveis mecanismos de ação dos terpenos estejam relacionados com a modificação da natureza solvente do estrato córneo e a otimização da partição do fármaco no tecido.

A associação destes terpenos com etanol foi estudada e observou-se que ocorreu um aumento do coeficiente de partilha dos fármacos tamoxifeno e propanolol. Acredita-se que tal efeito seja decorrente de um aumento da partição do fármaco no estrato córneo provocada por tal associação. Estudos de FTIR

(espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) demonstram modificações biofísicas ocorridas nos lipídios do estrato córneo e a diminuição no tamanho e na área dos picos referentes aos estiramentos das ligações C-H assimétricas e simétricas demonstrou que houve extração de lipídeos do EC (GAO e SINGH, 1997; ZHAO e SINGH, 1998; ZHAO e SINGH, 1999).

1.9. Emulsões

Um sistema de liberação de fármacos pode ser um instrumento imprescindível para o sucesso terapêutico de novas espécies químicas. Uma destas possibilidades é o uso de emulsões (DAVIS *et al.*, 1998).

Emulsão consiste num sistema heterogêneo de pelo menos um líquido imiscível disperso internamente em outro na forma de gotículas, através do auxílio de um terceiro componente, o agente emulsificante. O diâmetro da fase dispersa em gotículas geralmente está entre 0,1 e 10 μ m, embora gotículas menores de 0,01 μ m e maiores de 100 μ m sejam comuns (BECHER, 1965).

O termo também é definido como uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos essencialmente imiscíveis e caracterizados por uma terceira fase, um agente emulsificante (BECHER, 1965).

Em emulsões uma fase está totalmente dispersa numa segunda fase na forma de gotículas. Portanto, uma emulsão consiste em uma fase dispersa (fase interna ou descontínua), uma fase dispersante (fase externa ou fase contínua) e um terceiro componente conhecido como agente emulsionante (ALLEN, 1999).

Quando a fase dispersa é apolar (oleosa) e a fase dispersante é polar (aquosa), a emulsão é conhecida como emulsão óleo em água (O/A). Quando a fase dispersa é aquosa e a fase dispersante é oleosa, a emulsão é do tipo água em óleo (A/O) (ALLEN, 1999).

As emulsões água em óleo (A/O) são insolúveis em água; não são laváveis em água; podem absorver água e são oclusivas. As emulsões óleo em água (O/A) são miscíveis em água; são laváveis em água; podem absorver água e não são oclusivas (ALLEN, 1999).

As emulsões do tipo O/A podem comprometer a estrutura do estrato córneo e incrementar a penetração do fármaco (GLOOR, 2003). A solubilidade do ativo e dos componentes do veículo dependem da composição da matriz lipídica, que predominantemente controla a permeabilidade da barreira. Ceramidas e colesterol

reduzem a permeabilidade e a solubilidade, enquanto que triglicérides têm o efeito oposto (JAECKLE, 2003).

Para aplicações tópicas a composição do veículo pode acarretar um significativo impacto na permeação cutânea do fármaco. A possível razão para tal fato deve-se ao fenômeno da partição e difusão do mesmo (HADGRAFT, 2003).

Os excipientes utilizados na forma farmacêutica tópica podem evitar tratamentos dispendiosos e insatisfatórios, pois alteram a performance de liberação e permeação de um mesmo princípio ativo empregado (HEINEMANN, 2003).

Estudos com emulsões apresentando diferentes formulações foram realizados para se analisar a permeação de ditranol, tendo-se observado que ocorre maior permeação quando se utilizam excipientes mais hidrofóbicos, comparando-se à permeação obtida quando a emulsão é preparada utilizando-se excipientes mais hidrofílicos, em que se obteve uma pobre permeação (KAMMERAU, 1975).

5. CONCLUSÕES

- A metodologia analítica mostrou-se altamente adequada, sensível e reprodutível para o produto derivatizado do 5-ALA. A técnica de derivatização é rápida, fácil e emprega reagentes de baixo custo.
- A emulsão empregada apresentou-se estável por um tempo satisfatório, principalmente para o período de permeação.
- Os estudos de permeação cutânea *in vitro* para as formulações contendo 20 e 30% p/p de D-limoneno mostraram um aumento na permeação cutânea do 5-ALA (1% p/p) (1,45 e 2,03, respectivamente) em comparação à formulação controle, sem D-limoneno, acarretando um aumento também do fluxo.
- Os experimentos *in vitro* de retenção no estrato córneo para as formulações com D-limoneno apresentaram, de modo geral, um aumento da quantidade retida quando comparado ao valor obtido da formulação controle. Tal aumento é bem considerável quando se emprega formulação contendo 20 ou 30% de D-limoneno (2,973 e 4,2156, respectivamente) como promotor de permeação, respectivamente.
- Os experimentos *in vitro* de retenção na [epiderme + derme] para as formulações com D-limoneno apresentaram, de modo geral, um aumento da quantidade retida quando comparado ao valor obtido da formulação controle. Tal aumento é bem considerável quando se emprega formulação contendo 20 ou 30% de D-limoneno (3,61 e 4,64, respectivamente) como promotor de permeação.
- O estudo *in vitro* de retenção cutânea no estrato córneo e na [E + D] sem EC nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 12 horas mostraram resultados coerentes, com valores crescentes das quantidades acumuladas/retidas, em função do aumento do tempo.
- O método de quantificação por espectrofluorimetria para a PpIX também mostrou-se adequado para o projeto proposto e o fármaco apresentou linearidade na concentração de 0,5 a 100 ng/mL.
- Os experimentos de retenção no EC e na [epiderme + derme] para as formulações com D-limoneno foram satisfatórios, mostrando um aumento significativo da quantidade de fármaco retido tanto no EC como na [epiderme +

derme] sem EC em relação aos respectivos controles, para todas as formulações estudadas. Estes resultados mostram o efeito promotor do D-limoneno, que melhorou a passagem do fármaco através da barreira da pele.

➤ Os estudos *in vivo* em camundongos estão de acordo com os resultados obtidos com os experimentos *in vitro*, uma vez que houve um aumento significativo na quantidade de PpIX extraída da pele quando foram utilizadas formulações contendo D-limoneno.

➤ A formulação contendo 1% de 5-ALA contendo 20% de D-limoneno levou à maior produção da quantidade de PpIX comparando-se à formulação contendo 5% de 5-ALA.

➤ Uma vez que o 5-ALA é um fármaco de alto custo, a utilização desta formulação contendo 1% de 5-ALA com o promotor de absorção seria vantajosa, pois diminuiria os custos do tratamento, tornando mais viável a utilização da TFD-ALA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 571, p. 153–173, 2004.

AGUILELLA, V.; BAELAYA, M.; LEVADNY, V. Passive transport of small ions through human stratum corneum. **J. Control. Rel.**, v.44, p.11-18, 1997.

ALENCASTRE, J.B. Micropartículas de carboximetilcelulose/quitosana para liberação de vitamina E na pele. Caracterização, avaliação da estabilidade e estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2001.

ALLEN, L.V.; Manipulando cremes e loções. **Int. J. Pharm. Comp.** v. 3(2), p. 11-115, 1999.

ALLISON, R.R.; MOTA, H.C.; SIBATA, C.H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review, **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 1, pp. 263-277, 2004.

AMNUAIKIT C, IKEUCHI I, OGAWARA K, HIGAKI K, KIMURA T. Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal **Int. J. Pharm.** v. 289 (1-2), p.167-78, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas, Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª ed. São Paulo, Editorial Premier, 1999, p.397-400.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Amsterdam, v.63, p.8-18, 2001.

ASBILL, C.S., MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **PSTT**, Amsterdam, v. 3, p. 36-41, 2000.

BAGNATO, V.S., KURACHI, C., FERREIRA, J., MARCASSA, L.G., SIBATA, C.H., ALLISON, R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 2, p. 107-118, 2004.

BARON, J.A.; GREENBERG, E.R Prevention of nonmelanoma skin cancer, **Arch. Derm.**, v. 136, pp. 245-246, 2000.

BARRY. B. W. A Novel approach for identifying synergistics mixtures of skin penetration enhancers promises to transform development of transdermal products, including patches. **Nat. Biotechnol.**, v.22, fevereiro, 2004, p. 165-167.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug Delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 14, p. 102-114, 2001.

BARRY, B.W.; BENNETT, S.L. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin, **J. Pharm. Pharmacol.**, v.39, p.535-46, 1987.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption.** ENGLAND: MARCEL DEKKER, INC, P.1-233, 351-407, 1983.

BASHIR, S.J.; CHEW, A.L.; ANGIGBOGU, A.; DREHER, F.; MAIBACH, H.I. Physical and physiological effects of stratum corneum *tape stripping*. **Skin Res. Technol.**, v.4, p. 40-48, 2001.

BASTIAENS, M.T.; HOEFNAGEL, J.J.; BRUIJN, J.A.; WESTENDORP, R.G.; VERMEER, B.J.; BOUWES BAVINCK, J.N. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v.110, n.6, p.880-4. 1998.

BECHER, P. **“Emulsions: Theory and Practice”**, 2^a Ed., Reinhold Publishing Corp., New York, 1965.

BERSET, G.; GONZENBACH, H.; CHRIST, R.; MARTIN, R.; DEFLANDRE, A.; MASCOTTO, R.E.; JOLLEY, J.D.R.; LOWELL, W.; PELZER, R.; STIEHM, T. Proposed protocol for determination of photostability. Part I: cosmetic UV filters. **Int. J. Cosmet.**, v.18, p.167-177, 1996.

BODDÉ, H., KRUIHOF, M., BRUSSEE, J., KOERTEN, H. Visualisation small-angle X-ray scattering. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v.97, 1991.

BONNETT, R. Photosensitizers of porphyrin and phthalocyanines series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.**, v. 24, p.19–33, 1995.

BONNETT, R.; **Rev. Contemp. Pharmacother.** 10, 1. 1999.

BONINA, F.P.; MONTENEGRO, L.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; LISO, G. *In vitro* evaluation of N-acyllactam esters of indomethacin as dermal prodrugs. **Int. J. Pharm.**, v.124, p. 45-51, 1995.

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

BRUCE, A.J., BRODLAND, D.G. Overview of skin cancer detection and prevention for the primary care physician. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v.75, p.491-500, 2000.

BURREN, R.; SCALETTA, C.; FRENK, E.; PANIZZON, R.G.; APPIEGATE, L.A. Sunlight and carcinogenesis: Expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I + II and solar simulating radiations. **Int. J. Cancer**, v. 76, p. 201-206, 1998.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v.2, p.91-106, 2005.

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

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v.56, n.5, p.675-711, March 2004.

CHIEN, W.Y. **Novel drug delivery systems**, 2nd Ed, v.50. Cap 7, 1992.

CHRISTENSON, L. J., BORROWMAN, T.A.; VACHON, C.M.; TOLLEFSON, M.M.; OTLEY, C.C.; WEAVER, A.L.; ROENIGK, R.K. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. **JAMA**, 2005; v.294, p.681-690.

CORNWELL, P.A., BARRY, B.W., BOUWSTRA, J.A., GOORIS, G.S. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; Differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. **Intern. J. Pharm.**, v.127, p.9-26, 1996.

CORREA GARCÍA, S.; CASAS, A.; PEROTTI, C.; BATLLE, A.; BERMÚDEZ MORETTI, M.; Mechanistic studies on 5-aminolevulinic acid uptake and efflux in a mammary adenocarcinoma cell line. **Br. J. Cancer**, v.89, p.173, 2003.

CUMMINGS, S.R.; TRIPP, M.K.; HERRMANN, N.B. Approaches to the prevention and control of skin cancer, **Cancer Metastasis Rev.**, v. 16, pp. 309-327, 1997.

DAVIS, S.S., ILLUM, Drug delivery system for challenging molecules, **Int. J. Pharm.**, v.176, p.1-8, 1998.

DEGIM, I.T.; USLU, A.; HADGRAFT, J.; ATAY, T.; AKAY, C.; CEVEHEROGLU, S. **Int. J. Pharm.**, v.179, p.21-5, 1999.

DEMAS, J.N, BOWMAN, W.D. Determination of the quantum yield of the ferrioxalate actinometer with electrically calibrated radiometers. **J. Physical Chem.**, v.85, p.2766-2771, 1981.

DE ROSA, F.S.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic Therapy of Skin Cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharm. Res.**, Washington, v.17, p.1447-1455, 2000.

DE ROSA, F.S. Desenvolvimento de um veículo para o ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica: influência do dimetilsulfóxido como promotor de absorção cutânea. 1999. 108 p. **Dissertação de Mestrado**-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DEROSA; M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized Singlet Oxygen and its Applications. **Coord. Chem. Rev.**, 233-234, 351-371, 2002.

DOLMANS, D.E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**, v.3(5), p.380-7, 2003

DOUGUERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, **Cancer Res.**, v.38, p.2628-2635, 1978.

DOUGUERTY, T.J; COOPER, M.T.; MANG, T.S. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin, Lasers. **Surg. Med**, p.485-488, 1990.

DUMAY, O.; KARAM, A; VIAN, L. Ultraviolet exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: Partial protection by a broad spectrum sunscreen. **Br. J. Dermatol**, v.144, p.1161-1168, 2001.

ELDER, D.E. Human melanocytic neoplasm and their etiology relationship with sunlight. **J. Investi. Dermatol.**, Baltimore, v.92, p.297-303, 1989.

EPSTEIN, J.H. **Biological effect of sunlight**. In LOWE, NJ& SHAAT, N.A. Sunscreens:development , evaluation and regulatory aspect. Marcel Dekker, New York, 1990.

FIJAN, S.; HÖNIGSMANN, H.; ORTEL, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. **Br. J. Dermatol**. v.133, p.282-288, 1995.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, Amsterdam, v.3, p.417-425, 2000.

FOUNDATION SKIN CANCER-Melanoma. Disponível em: <<http://www.skincancer.org>> Acesso jan. 2008.

GAO, S., SINGH, J. *In vitro* percutaneous enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **J. Control. Rel.**, v.51, p.193-199, 1998.

GIBSON, S.L.; HAVENS, J.J.; NGUYEN, M.L.; HILF, R. δ -Aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy inhibits protoporphyrin IX biosynthesis and reduces subsequent treatment efficacy *in vitro*. **Br. J. Cancer**, v.80, p.998-1004, 1999.

GLOOR, M; HAUTH, A.; GEHRING, W. O/W emulsions compromise the stratum corneum barrier and improve drug penetration. **Pharmazie**, v.58 (10), p.709-715, 2003.

GODAR, D.E.; THOMAS, D.P; MILLER S.A.; LEE, W. Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis. **J. Photochem. and Photobiol.**, Oxford, v.57, p.12018-11026, 1993.

GOTTLOBER, P.; KRAHN, G.; BEZOLD, G.; PETER, R.U. Basal cell carcinomas occurring after accidental exposure to ionization radiation, **Br. J. Dermatol.**, v.141, p.383-385, 1999.

GREEN, D.; REED, J.C.M. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v.281, p.1309-1312, 1999.

GROSSMAN, D.; LEFFELL, D.J. The molecular basis of non-melanoma skin cancer, **Arch. Dermatol.**, v.133, p.1263-1270, 1997.

GUPCHUP, G.V.; ZATZ, J. Target delivery to pilosebaceous structures. **Cosm. & Toil.**, v.112, p.79-88, March 1997.

HADGRAFT, J.; WHITEFIELD, M.; ROSHER P.H. Skin penetration of topical formulations of ibuprofen 5%: an *in vitro* comparative study. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.** v.16(3), p.137-142, 2003.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier, **Int. J. Pharm.**, v.224, p.1-18, 2001.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.184, p.1-6, 1999.

HASAN, T.; MOOR, A.; ORTEL, B. Photodynamic Therapy of Cancer. In: Holland, J.F.; Frei III, E.; Bast Jr, R.C.; Kufe, D.W.; Morton, D.L.; Weichsenbaum, R.R. editors, **Cancer Medicine** 5th Edition, B.C. Decker, Inc., p.489-502, 2000.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does PDT work? **Photochem. Photobiol.**, v.55, p.145-157, 1992.

HEINEMANN, C.; ELSNER, P. Efficacy measurement of topical antihistamines: a review. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.** v.16(1), p.4-11. 2003.

HERBERT, A.A. Photoprotection in children. **Adv. Dermatol.** v.8, p.309-324. 1983

HORIOT, T.; MIYAUCHI, H.; SINDHIVANANDA, J.; SOH, H.; KUOKAVA, I.; ASADA, Y. The effect of ultra-violet (UVB and UVA) radiation on the expression of epidermal keratins. **Br. J. Dermatol.**, v.28, p.10-15, 1995.

HOUK, J.; GUY, R.H. Membrane models for skin penetration studies. **Chem. Rev.**, Washington, v.88, n.3, p.455-471, 1988.

HOWELL, B.G.; SOLISH, N.; LU, C.; WATANABE, H.; MAMELAKA A.J.; FREED, I.; WANG, B.; SAUDER, D.N. Microarray profiles of human basal cell carcinoma: Insights into tumor growth and behavior. **J. Dermatol. Sci.**, Japan, v.39, p.39-51, 2005.

HSIEH, D.S. Drug Permeation Enhancement – Theory and Applications. **Drugs Pharm. Sci.**, v.62, 1994, Marcel Dekker Inc.

HUMPHREYS, T. R. Skin cancer: recognition and management. **Clin. Cornerstone**, Bridgewater, v.4, n.1, p.23-32, 2001.

IBBOTSON, S.H.; MOSELEY, H.; BRANCALEON, L.; PADGETT, M.; O'DWYER, M.; WOODS, J.A.; LESAR, A.; GOODMAN, C.; FERGUSON, J. Photodynamic therapy in dermatology: Dundee clinical and research experience. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v.1, p.211-223, 2004.

INCA (Instituto Nacional do Câncer)-Ministério da Saúde. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer**. Disponível : <http://www.inca.gov.br>, Acesso jan. 2008.

JACOBI, U.; KAISER, M.; RICHTER, H.; AUDRING, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.18, p.175-179, 2005.

JAECKLE E.; SCHAEFER, U.F.; LOTH, H. Comparison of effects of different ointment bases on the penetration of ketoprofen through heat-separated human epidermis and artificial lipid barriers. **J. Pharm. Sci.**, v.92(7), p.1396-406, 2003.

JHAPPAN, C.; NOOMAN, F.P.; MERLINO, G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene**, Basingstoke, v.22, p.3099-3112, 2003.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. Pele e anexos. In: **Histologia Básica** 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.303-14, 1999.

JUZENAS, P., SORENSEN, R., IANI, V., MOAN, J. Uptake of topically applied 5 aminolevulinic acid and production of protoporphyrin IX in normal mouse skin: dependence on skin temperature. **Photochem. Photobiol.**, v.69, p.478-481, 1999.

KAJIWARA, M.; HARA, K.; TAKATORI, K.; MATSUMOTO, R. Revised structure of a 5-aminolevulinic acid derivative, **Clin. Chem.**, v.39, p.1867-1871, 1993.

KAMMERAU, B.; ZESCH, A.; SCHAEFER, H. Absolute concentrations of dithranol and triacetyl-dithranol in the skin layers after local treatment: *in vivo* investigations with four different types of pharmaceutical vehicles. **J. Invest. Dermatol.**, v.64 (3), p.145-149, 1975.

KANTARIA, S.; REES, G.D.; LAWRENCE, M.J. Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery **J. Control. Rel.**, v.60, p.355-365, 1999.

KAPPAS, A.; SASSA, S.; GALBRAITH, R A.; NORMAN, Y. The porphyrias, in: Scriver CR, Beaudet al.; Sly WS; Valle D (eds). **The metabolic basis of in herited disease**, McGraw-Hill, New York, 6th ed., p.1305-1366, 1989.

KITSON, N.; THEWALT, J.L. Hypothesis: the epidermal permeability barrier is a porous medium. **Acta Derm. Venereol.**, Supp 208, p.12-15, 2000.

KLOEK, J.; AKKERMANS, W.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin, **Photochem. Photobiol.**, v.67, p. 150-154, 1998.

KOH, H.K.; LEW, R.A. Sunscreens and melanoma: implications for prevention. **J. Natl. Cancer Inst.** v.86, p.78-79,1994.

KRAMMER, B. Vascular effects of photodynamic therapy. **Anticancer Res.**, v.21 (6B), p.4271-4277, 2001.

KRISHNAIAH, Y.S.; AL-SAIDAN; S.M.; JAYARAM, B. Effect of nerodilol, carvone and anethole on the *in vitro* transdermal delivery of selegiline hydrochloride. **Pharmazie**. v.61(1), p.46-53, 2006.

LARSSON, P.; ANDERSSON, E.; JOHANSSON, U.; OLLINGER, K.; ROSDAHL, I. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. **Exp. Dermatol.**, v.14, p.117-123, 2005.

LAUTH, M.; UNDEN, A.B.; TOFTGARD, R. Non-melanoma skin cancer: pathogenesis and mechanisms. **Drug Discov. Today**, v.1, n. 2, p.267-272, 2004.

LAZAR, G.M.; BAILLET, A.; FRUCTUS, A.E.; TOGKOZ, S.; VINCENT, C.M.; MARTY, J.P. Evaluation of percutaneous penetration and photochemical behaviour of sunscreens by stripping. **20th IFSCC Congress**, v.1, n.8, p.105-113, 1998.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HAFGRAFT, J.; HUMBERT, P.H. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. **Int. J. Pharm.**, v.269, n.2, p.323-328, 2003.

LEVANG, A.K.; ZHAO, K.; SINGH, J. Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin **Int. J. Pharm.**, v.181, p.255-63, 1999.

LINGE, C. Relevance of *in vitro* melanocytic cell studies to the understanding of melanoma. **Cancer Surveys**, v.26, p.71-87, 1996.

LIM P.F.; LIU, X.Y.; KANG, L.; HO, P.C.; CHAN, Y.W.; CHAN, S.Y. Limonene GP1/PG organogel as a vehicle in transdermal delivery of haloperidol. **Int J Pharm.** v.27; 311(1-2):157-64, 2006.

LIPSON, R.L.E. **Proceedings of the 9th International Cancer Congress**; Tokio, Japan, 1966.

LOPEZ, R.F.V. *et al* "Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH". **Pharm. Res.**, v.18 (3), p.311-15, 2001.

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

LOPEZ, R.F.V.; LANGE, N.; GUY, R.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic Therapy of Skin Cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and Its Esters. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v.56, p.77-94, 2004.

LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea **Cosmet. Toil.**, v.12, p.62-67, 2000.

MACCUBBIN, A.E.; PRZYBYSZEWSKI, J.; EVANS, M.S. DNA damage in UVB irradiated keratinocytes. **Carcinogenesis**, Oxford, v.16, p.1659-1660, 1995.

MANNE, S.; FASANELLA, N.; CONNORS, J.; FLOYD, B.; WAN, H.; LESSIN, S. Sun protection and skin surveillance practices among relatives of patients with malignant melanoma: prevalence and predictors. **Prev. Med.**, New York, v.39, p.36–47, 2004.

MATSUDA, H., ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v.36, p. 81-99, 1999.

MATSUI, M.S; DELEO, V.A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. **Cancer Cells.**, v.3, p.8-12, 1991.

MCGILLIS, S.T.; FEIN, H. Topical treatment strategies for non-melanoma skin cancer and precursor lesions. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, v.23, p.174-183, 2004.

MELNIKOVA, V.O.; ANANTHASWAMY, H.N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer, **Mutat. Res.**, v.571, p.91-106, 2005.

MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a non invasive method of drug delivery and diagnostics, **Biotechnol. Prog.**, v.16, p.488-492, 2000.

MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT, **Anticancer Res.**, v.23, p.3591-3600, 2003.

MOAN, J.; DAHLBACK, A; SETLOW, R.B. Epidemiological support for a hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. **Photochem. Photobiol.**, v.7, p.243-247, 1999.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin permeation enhancement and its quantification in vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.52, p.103-112, 2001.

NA, R.; STENDER, I.M.; WULF, H.C. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence, **Acta Dermatovenerol.**, v.81, p.246-249, 2001.

NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J. Control. Rel.**, v.95, p.367-379, 2003.

NAZAROVA, A. *et al.* Effect of substituents on photochemical and biological properties of 13, 15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6. **Russ. J. Bioorganic Chem.**, v.31, n.5, p.482-494, 2005.

NOVO, M.; HÜTTMANN, G.; DIDDENS, H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours, **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v.34, p.143-148, 1996.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, **Acta Bioch. Pol.**, v.52, p.339-352, 2005.

OISHI, H.; NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K.; TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. **J. Anal. Toxicol.**, v.20, p.106-110, 1996.

ORTEL, B.; CALZAVARA-PINTON, P.G.; SZEIMIES, R.M.; HASAN, T. Perspectives in cutaneous photodynamic sensitization. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Amsterdam, v.36, p.209-211, 1996.

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

PACKER, L. Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants In: Rice-Evans CA. Burdon RH. (eds.). **Free Radical Damage and its Control.** Elsevier Science, Amsterdam, 1994.

PARRISH, J.A.; ANDERSON, R.R.; URBACH, F.; PITTS, D. UV-A: biological effects of ultraviolet radiation with emphasis on human responses to longwave ultraviolet. **Plenum Press**, 1978.

PATEL, N.P.; HINGHTON, A.; MOY, R.L. Properties of topical sunscreen formulation: a review. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v.18, p.316-320, 1992.

PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHAL, H. Distribution of 5-aminolevulinic acid induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.**, v.62, p.906-913, 1995.

PENG, Q.; MOAN, J.; FARRANTS, G.; DANIELSEN, H. E.; RIMINGTON, C. Localization of potent PS in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy. **Cancer Lett.**, v.53, p.129-139, 1990.

PEREIRA, G.R. Estudo da monoleína como promotor de absorção cutânea para a progesterona: proposição de um sistema de liberação transdérmica. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1999.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **Oncologist**, USA, v.9, p.182-187, 2004.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Utah, v.38, n.1, p.90-95, 1993.

PHILLIPS, C.A., MICHNIAK, B.B. Transdermal delivery of drug with differing lipophilicities using azone analogs a dermal penetration enhancers. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.84, p. 1427-1433, 1995.

PHILLIPSON, R.P.; TOBI, S.E.; MORRIS, J.A.; MCMILLAN, T.J. UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. **Free Rad. Biol. Med.**, v.32, p.474-480, 2002.

PIERRE, M.B.R. Otimização da liberação cutânea do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da influência de promotores de absorção cutânea. 2004. 132 p. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIERRE, M.B.R.; RICCI, J.R.E.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy, **Pharm. Res.**, v.23, p.360-366, 2006.

PIROT, F.; KALIA, Y.N. ; STINCHCOMB, A.L.; KEATING, G.; BUNGE, A.; GUY, R.H. Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, v.94(4), p.1562-1567, 1997.

POLICARD, A.; **CR Soc. Biol.**, v.91, p.1423, 1924.

RAAB, O. Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol.** v.39, p.524-56, 1900.

RANADE, V.V. Drug delivery systems & transdermal drug delivery. **J. Clin. Pharmacol.**, v.31, p.401-418, 1991.

RANGARAJAN, M.; ZATS, J. Effect of formulation on the topical delivery of α -tocopherol. **J. Cosmet. Sci.**, v.54, p.161-174, 2003.

REDDY, L.H.; GHOSH, B. Enhancer aided *in vitro* permeation of atenolol and prazocin hydrochloride through mice skin. Indian **J. Exp. Biol.**, New Delhi, v.39, p.47-51, 2001.

ROBERTS, M.S. Structure-permeability considerations in percutaneous absorption. In **Prediction of Percutaneous Penetration**. v.2, IBC Technical Services, London, 1991, p.210-228.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Anatomia e fisiologia. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001, cap. 1, p.5.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **J. Pharm. Sci.**, v.80, p.104-107, 1991.

SCHARFETTFER, O; KOCHANKE, K; WLASCHEK, M; BRENNISEN, P; SCHAUEN, M.M.; BLAUDSCHUN, R; WENK, J. UV-Induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoageing. **Biol. Chem.**, v.378, p.1247-1257, 1997.

SCHEUPLEIN, R.J., BLANK, I.H. Permeability of the skin. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.51, p.702-747, 1971.

SCHMOOK, P.F.; MEINGASSNER, G.J.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in vitro* percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, v.215, p.51-56, 2001.

SHAH, V.P. Skin penetration enhancers: Scientific perspectives. In: HSIEH, D.S. **Drug Permeation Enhancement – Theory and Applications**. 1^a ed. New York: Marcel Dekker, 1994, p.19.

SHARMAN, W.M., VAN LIER, J.E., ALLEN, C.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v.56, p.53–76, 2004.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, **Methods Enzymol.**, v.319, p.376-400, 2000.

SHELTON, R.M. Skin cancer: a review and atlas for the medical provider. **Mt. Sinai J. Med.**, New York, v.68, n.4-5, p.243-52, 2001.

SINHA, V.R., KAUR, M.P. Permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v.26, n.11, p.1131-1140, 2000.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; **Fundamentals of analytical Chemistry**, 7th ed., Saunders College Publishing: New York, 1996.

SOUTHWELL, D.; BARRY, B.W. **J. Invest. Dermatol.**, v.80, p.507-514, 1983.

STAR, W.M.; AALDERS, M.C.G.; SAC, A.; STERENBORG, H.J.C.M. **Photobiol.**, v.75, p.424-32, 2002.

STELUTI, R.; DE ROSA, F.S.; COLLET, J.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Topical glycerol monooleate/propylene glycol formulations enhance 5-aminolevulinic acid *in vitro* skin delivery and *in vivo* protoporphyrin IX accumulation in hairless mouse skin, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.60, p.439-444, 2005.

STENDER, M.; WULF, H.C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. **Br. J. Dermatol.**, v.135, p.454-456, 1996.

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C.; **Tetrahedron**, v.54, p.4151. 1998.

STRINGER, M.; MOGHISSI, K. Photodiagnosis and fluorescence imaging in clinical practice, **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.1, p.9-12, 2004.

SUHONEN, T.M., BOUWSTRA J.A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structure. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v.59, p.149–161, 1999.

SVAASAND, L., TROMBERG, B., WYSS-DESSERICH, M., TADIR, Y., BERNIS, M. Light and drug distribution with topically administered photosensitizers. **Lasers Med. Sci.**, v.11, p.261-264, 1996.

SZEIMIES, R M.; KARRER, S.; SAUERWALD A.; LANDTHALER, M. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of keratoses: an initial clinical study. **Dermatol.**, v.192, p.246-251, 1996.

SZEIMIES, RM.; SASSY, T.; LANDTHALER, M. Penetration potency of topical applied 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma, **Photochem. Photobiol.**, v.59, p.73-73, 1994.

SZNITOWSKA, M.; DABROWSKA, E.A.; JANICKI, S. Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin. **Intern. J. Pharm.**, v.246 (1-2), p.203-206, 2002.

TAYLOR, C.R.; STERN, R.S; LEYDEN, J.J; GILCHREST, B.A. Photoaging, photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.22, p.1-15, 1990.

The Merck Index; BUDAVARI, S., ed.; Merck & Co. Inc.: EUA, 1989.

URBACH, F. Incidence of nonmelanoma skin cancer. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v.9, p.751-755, 1991.

VANQUERP, V.; RODRIGUEZ, C.; COIFFARD, C.; COIFFARD, L.J.M. High performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. **J. Chromatogr. A.**, v.832, p.273-277, 1999.

VON TRAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit Fluorescierenden Stoffen. **Munch. Med. Wochenschr.**, v.47, p.2042-2044, 1903.

WAGNIERES, G.; HADJUR, C.; GROSJEAN, P.; BRAICHOTTE, D.; SAVARY, I F.; MONNIER, P.; VAN DEN BERGH, H. Clinical evaluation of the cutaneous phototoxicity of 5,10,15,20-tetra(m-hydroxy phenyl)chlorine. **Photochem. Photobiol.**, v.68, p 382-387, 1998.

WALTERS, K.A. **Transdermal Drug Delivery: development issues and researches initiatives.** Marcel and. Dekker Inc, New York, 1989, p.197-246, p.197-246, 1989.

WANG, L; BAUER, B.; ANDERSON-ENGELS, S.; SVANBERG, S.; SVANBERG, K. Photodynamic therapy utilizing topical - aminolevulinic acid in non-melanoma skin malignancies of the eyelid and the periorcular skin, **Acta Ophthalmol. Scan.**, v.77, p.182-188, 1999.

WEBBER, J.; KESSEL, D.; FROMM, D. Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.37, p.151- 153, 1997.

WEIGAMANN, H.J.; ULRICH, J.; SCHANZER, S.; JACOBI, U.; SCHAEFER, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.18, n.4, p.180-185, 2005.

WENNBERG, A.M.; LINDHOLM, L.E.; ALPSTEN, M.; LARKO, O. Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolevulinic acid and a filtered xenon lamp. **Arch. Dermatol. Res.**, v.288, p.561- 564, 1996.

WESTER, R.C.; MAIBACH, H.I. Percutaneous absorption of drugs. **Clin. Pharmacokinet.**, v.23, p.253-266, 1992.

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

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (estradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil). **Int. J. Pharm.**, v.74, p.157-168, 1991b.

WOLF, P; YAROSH, D.B; KRIPKE, M.L. Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice. **J. Invest. Dermatol.**, v.101(4), p.523-527, 1993.

WONG, T.W.; AIZAWA, K.; SHEYHEDIN, I.; WUSHUR, C.; KATO, H. Pilot study of topical delivery of mono-l-aspartyl chlorine e6 (NPe6): Implication of topical NPe6-photodynamic therapy. **J. Pharmacol. Sci.**, Japan, v. 93, p. 136-142, 2003.

YAMANE, M.A., WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W. Terpenes penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.47 (12A), p.978-989, 1995.

ZEITOUNI, N.C.; OSEROFF, A.R.; SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.39, p.1133-1136, 2003.

ZEITOUNI, N.C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A.R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. **Cli. Dermatol.**, v.19, p.328-339, 2001.

ZENZEN, V.; ZANKL, H. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of the 5-aminolevulinic acid hexylester-mediated photodynamic therapy. **Mut. Research**, v.561, p.91-100, 2004.

ZHAO, K., SINGH, J. Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, limonene and menthone. **J. Control. Rel.**, v.55, p.253-260, 1998.

ZHAO, K., SINGH, J. *In vitro* percutaneous absorption enhancement of propranolol hydrochloride through porcine epidermis by terpenes/ethanol. **J. Control. Rel.**, v.62, p.359-366, 1999.